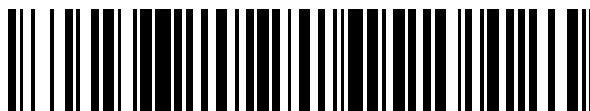


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 290**

51 Int. Cl.:

A61L 27/06	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01)
A61L 27/50	(2006.01)
A61L 27/28	(2006.01)
A61L 31/02	(2006.01)
A61L 31/08	(2006.01)
A61L 31/14	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2009 PCT/EP2009/056666**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2009 WO09144313**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2009 E 09753968 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2310059**

54 Título: **Implantes recubiertos con PUFA**

30 Prioridad:

29.05.2008 US 56978

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.07.2017

73 Titular/es:

**NUMAT BIOMEDICAL S.L. (100.0%)
ParcBIT Edificio18 (Naorte) Bloque A Módulo C-
21 Número 4 Cra . Valldemossa Km 7.4
07121 Palma de Mallorca (Islas Baleares), ES**

72 Inventor/es:

**LYNGSTADAAS, STÅLE PETTER;
MONJO, MARTA;
PETZOLD, CHRISTIANE y
ELLINGSEN, JAN EIRIK**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 627 290 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

Implantes recubiertos con PUFA

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un implante de metal recubierto que se utiliza como implante médico y/o dental, que facilita activamente la adhesión controlada de tejido duro y/o mineralizado al implante debido a que al menos parte de su superficie está recubierta con una capa de baja concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) e irradiados con luz UV antes y/o después del recubrimiento.

Antecedentes de la invención

Los implantes médicos, tales como los implantes dentales, implantes ortopédicos, prótesis y stents vasculares se fabrican comúnmente de titanio y/o una aleación de titanio. El titanio es el material más frecuentemente utilizado como implante en el hueso, ya que posee excelentes propiedades físicas y biológicas, como baja densidad, resistencia mecánica y resistencia química contra los líquidos corporales.

Los implantes dentales se utilizan en procedimientos de restauración dental en pacientes que han perdido uno o más de sus dientes. Un implante dental comprende un dispositivo de fijación dental, que se utiliza como un reemplazo artificial de la raíz del diente. Por lo tanto, el dispositivo de fijación dental sirve como raíz para un diente nuevo. Generalmente, el dispositivo de fijación dental es un tornillo de titanio que tiene una superficie rugosa para expandir el área de contacto tisular. El tornillo de titanio se implanta quirúrgicamente en la mandíbula, donde después el tejido óseo crece alrededor del tornillo. Este proceso se llama osteointegración, porque los osteoblastos crecen sobre y en la superficie rugosa del tornillo implantado. Mediante la osteointegración se consigue una instalación rígida del tornillo.

Una vez que el tornillo de titanio está firmemente anclado en la mandíbula, se puede prolongar mediante la fijación de un pilar al tornillo. El pilar puede estar hecho al igual que el tornillo de titanio o una aleación de titanio. La forma y el tamaño del pilar utilizado se ajustan de manera que llega precisamente hasta el borde de la encía después de la fijación al tornillo. Una restauración dental tal como una corona, puente o dentadura puede entonces ser unida al pilar. Como alternativa, el tornillo de titanio tiene tal forma y tamaño que llega hasta el borde de la encía después de la implantación, por lo que no se necesita un pilar y una restauración dental tal como una corona, puente o dentadura puede fijarse directamente al tornillo.

Los implantes ortopédicos se utilizan para la preservación y restauración de la función en el sistema musculoesquelético, en particular las articulaciones y los huesos, incluyendo el alivio del dolor en estas estructuras. Los stents vasculares son implantes tubulares dispuestos para su inserción en vasos sanguíneos con el fin de prevenir o contrarrestar una constricción de flujo localizada, es decir, que contrarrestan disminuciones significativas en el diámetro de los vasos sanguíneos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el titanio (Ti) es el material de implante de elección para su uso en aplicaciones dentales y ortopédicas y en stents vasculares. Se ha descrito que su excelente biocompatibilidad es atribuible a los óxidos estables que se forman fácilmente sobre las superficies de Ti. Sin embargo, también se ha descrito que la respuesta ósea a las superficies del implante dependía de las propiedades químicas y físicas de las superficies de Ti, afectando de este modo al éxito del implante. Como tal, la atención se ha centrado en la preparación de la superficie de los implantes de Ti.

La superficie del Ti es solo bioinerte, por lo tanto las investigaciones actuales sobre la modificación de las superficies de los implantes se centra en hacer que los materiales prácticamente bioinertes se vuelvan bioactivos, o más bien para influir en los tipos de proteínas absorbidas en la superficie inmediatamente después de la implantación. La serie de modificaciones de la superficie varía desde recubrimientos no biológicos, tales como carburo, flúor, calcio, hidroxilapatita o fosfato de calcio, hasta recubrimientos que imitan el entorno biológico usando monocapas o bicapas de lípidos, factores de crecimiento, proteínas y/o péptidos.

En el estado de la técnica se han divulgado recubrimientos para dispositivos médicos implantables que contienen ácidos grasos insaturados. En particular, las solicitudes de patente de los Estados Unidos US2006088596, US2007202149 y US2008118544 divulgan recubrimientos que comprenden ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA) y vitamina E. También se divulga un proceso para la preparación de los dispositivos médicos recubiertos que comprende exponer el revestimiento a luz UV.

Por otra parte, la solicitud de patente de los Estados Unidos US2007299512 divulga un implante que tiene un recubrimiento que contiene colesterol y ésteres de colesterol que se pueden recubrir adicionalmente con ácidos grasos poliinsaturados o vitaminas. Y la solicitud de patente de los Estados Unidos US2008118544 divulga superficies hemocompatibles de productos médicos recubiertos con ácidos grasos insaturados que se preparan exponiendo el revestimiento a luz UV.

Se han empleado varias técnicas, tales como pulverización de plasma, deposición por láser, mezclado dinámico de haz iónico, deposición por haz de iones, pulverización magnética, prensado isostático en caliente, deposición electroforética, sol-gel, implantación iónica, tratamiento con NaOH y métodos electroquímicos para depositar hidroxiapatita (HA) o recubrimientos de fosfato de calcio sobre superficies de Ti.

5 Se ha descrito que los implantes recubiertos con hidroxiapatita (HA) potencian la osteoinducción. El rendimiento superior de estos implantes se atribuye a una osteointegración más rápida y al desarrollo de una mayor resistencia interfacial, lo que tiene como resultado una fijación esquelética temprana y un aumento del contacto óseo con la superficie del implante.

10 Especialmente se ha empleado con frecuencia la pulverización de plasma, sin embargo con numerosos problemas, incluyendo la variación en la resistencia de unión entre el recubrimiento y el sustrato metálico, la no uniformidad en el espesor de la capa y la mala adherencia entre el recubrimiento y la superficie metálica (Satsangi et al. 2004).

15 También se ha propuesto mejorar la biocompatibilidad de las prótesis o implantes uniendo o integrando diversas biomoléculas activas a la superficie de la prótesis, p. ej., sobre la superficie metálica de una prótesis de titanio. Ha sido el objetivo con implantes preparados de esta manera que tengan un mayor ajuste, presenten mayor adherencia al tejido y una mayor compatibilidad con el tejido, que tengan una superficie biológicamente activa para aumentar el crecimiento, la diferenciación y la maduración celular, que muestren una menor inmunoreactividad, que presenten actividad antimicrobiana, que presenten mayores capacidades de biomineralización, que tengan una mejor cicatrización de heridas y/o del hueso, que aumenten la densidad ósea, que tengan un menor "tiempo hasta la carga" y causen menos inflamación. A menudo se ha propuesto que esta unión se realice utilizando, por ejemplo, reactivos químicos que tengan dos funcionalidades reactivas tales como formalina o glutaraldehído, pero la naturaleza reactiva de estos agentes conduce a menudo a que las biomoléculas se vuelvan biológicamente inactivas y/o aumente la inmunoreactividad, lo cual es indeseable .

20 Una modificación de la superficie alternativa es usar un recubrimiento de fosfolípidos que supuestamente induce la deposición de fosfato cálcico. El papel de los fosfolípidos también se ha sugerido en el inicio de la deposición de fosfato de calcio en el cartílago, el hueso, la curación de callos de fracturas y bacterias calcificantes. Se ha propuesto que una superficie del implante recubierta con fosfato de calcio-fosfolípido debe ser capaz de atraer la hidroxiapatita.

30 Se supone que los revestimientos superficiales de monocapas o bicapas de lípidos imitan las superficies celulares y con ello previenen las reacciones de cuerpo extraño. Se ha demostrado que los revestimientos lipídicos influyen en la adhesión de proteínas a una superficie que se produce inmediatamente después de la implantación y que se ha observado que previenen la adhesión celular y la formación de coágulos sanguíneos (Kim et al., 2005). Además se informó que ciertos fosfolípidos disminuían la adhesión bacteriana.

40 Los revestimientos lipídicos se basan generalmente en la adhesión física, donde se obtienen capas ordenadas, p. ej., utilizando la técnica de Langmuir-Blodgett. Los lípidos de la membrana celular no solo forman un entorno pasivo para las proteínas incorporadas en las membranas, sino que influyen en el metabolismo celular activamente. Los métodos químicos para el recubrimiento de sustratos metálicos con una capa de moléculas biológicas implica habitualmente una etapa previa para obtener grupos reactivos sobre superficies (Khan W et al., 2007, Muller R. et al., 2006) para unir las moléculas biológicamente activas sin alterar su estructura y con ello posiblemente su función en el cuerpo.

Aun así, los recubrimientos mencionados anteriormente se enfrentan a varios puntos negativos, debido a dificultades técnicas no resueltas.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención describe por primera vez un implante de metal recubierto para ser utilizado como implante médico y/o dental, que facilita activamente el control de la adhesión de tejido duro y/o mineralizado al implante, tal como la adición de hueso, cartílago o dentina a la superficie del implante.

55 Un implante típico de la presente invención facilita activamente el control de la adhesión de tejido duro y/o mineralizado al implante, controla la adición de hueso a la superficie del implante, aumenta la remodelación ósea y/o la biocompatibilidad del implante. El efecto del implante sobre la adhesión del tejido mineralizado y/o duro es directamente atribuible a que al menos parte de su superficie esté recubierta con una capa de baja o alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

60 Por lo tanto, la invención se refiere a un implante de metal recubierto para la adhesión controlada de tejido mineralizado y/o duro, en el que al menos parte de la superficie del implante está recubierta con PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) químicamente unidos por luz UV a una concentración de 10 nanogramos/mm², o menos, en el que el implante de metal recubierto puede obtenerse por un método que comprende: i) pulir el implante de forma especular, ii) lavar, iii) esterilizar en autoclave, a) tratar el implante con una solución que comprende PUFA y

b) irradiar al menos parte de la superficie del implante con luz UV de 100 a 315 nm durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 segundos y 30 minutos y opcionalmente c) lavar dicho implante, en el que las etapas a) y b) se realizan simultáneamente o en cualquier orden.

- 5 La presente invención divulga al mismo tiempo un implante de metal con mayor biocompatibilidad que puede facilitar una incorporación sólida en el hueso y un implante que es fácil de retirar de nuevo, en el que la alta concentración de dobles enlaces disponibles de los ácidos grasos poliinsaturados dificulta la adherencia del tejido a un implante semi-permanente y/o temporal, el denominado implante "resbaladizo".
- 10 La invención divulga además un método para fabricar dicho implante de metal con efecto controlado sobre la adhesión del tejido duro y/o mineralizado y/o la remodelación tisular, en el que el implante está recubierto con PUFA a una concentración específica y se irradia con luz UV, ya sea antes, simultáneamente con, o después de la etapa de recubrimiento.
- 15 Por consiguiente, la invención se refiere a un nuevo y sencillo método de modificación de la superficie para unir químicamente moléculas de PUFA a una superficie que comprende Ti o un óxido de titanio utilizando irradiación UV. Por lo tanto, se presenta un método para fabricar un implante de metal que facilita la adhesión controlada de tejido duro y/o mineralizado, la adición controlada de hueso, un efecto mejorado en la remodelación ósea y/o biocompatibilidad, en el que el implante se recubre con PUFA a una concentración específica y se irradia con luz UV
- 20 antes y/o después del revestimiento.

Los objetos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de las reivindicaciones y de la siguiente descripción detallada considerada conjuntamente con los dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que los dibujos están diseñados únicamente con fines de ilustración y no como una definición de los límites de la

25 invención, para lo cual se debe hacer referencia a las reivindicaciones adjuntas.

Leyendas de las Figuras

- 30 Figura 1: Modificación de los 3 grupos de superficies de moneda. Cada grupo contiene un control sin EPA en la superficie y superficies a las que se ha aplicado 3,2 nmol de EPA/mm² o 16,3 nmol de EPA/mm² a las respectivas superficies.
- Figura 2: Ángulo de contacto con el agua frente al tiempo de irradiación UV (promedio para 3 superficies). Después de un ligero aumento durante aproximadamente 10 minutos de irradiación, el AC con el agua disminuyó. El punto negro indica el ángulo de contacto después de 30 min, donde se encontró una disminución
- 35 para todas las superficies. Después de 60 minutos, la disminución del AC con el agua se estabilizó.
- Figura 3: Ángulos de contacto medidos en monedas de los 3 grupos diferentes con diferentes concentraciones de soluciones de EPA utilizadas para la modificación superficial. A - superficies no lavadas y no irradiadas con una capa gruesa de EPA unido físicamente; B - superficies no irradiadas y lavadas con una fina capa de EPA adsorbido físicamente; C – superficies irradiadas y lavadas con una fina capa de EPA unido covalentemente.
- 40 Figura 4: Observación profilométrica de gotas de EPA sobre superficies de Ti pulidas. Se aplicó 3,2 nmol de EPA/mm² a la superficie y se tomaron imágenes a) antes de la irradiación UV y b) después de 30 minutos de irradiación con luz UV. Las imágenes se tomaron con una ampliación de 50x.
- Figura 5: Cambios en los espectros FTIR de EPA y EPA después de la irradiación durante 30 min. Los números del 1 al 8 destacan los principales cambios en la estructura a los que se hace referencia en el texto.
- 45 Figura 6: Resultados para los recuentos de centelleo de monedas revestidas con ¹⁴C-EPA que no fueron irradiadas o irradiadas con luz UV durante 30 min. Las monedas no se lavaron, se lavaron una vez y se lavaron dos veces, respectivamente.
- Figura 7: Cantidad de células en las superficies después de 24 h con respecto al plástico (100 %) calculado a partir de la cantidad de ADN en las superficies respectivas. A - superficies no lavadas y no irradiadas con una
- 50 capa gruesa de EPA unido físicamente; B - superficies no irradiadas y lavadas con una fina capa de EPA adsorbido físicamente; C - superficies irradiadas y lavadas con una fina capa de EPA unido covalentemente.
- Figura 8: Toxicidad de las modificaciones superficiales relativas al plástico (0 % de toxicidad) y Triton X-100 al 0,1 % (100 % de toxicidad), medida por el nivel de LDH en las superficies respectivas. A - superficies no lavadas y no irradiadas con una capa gruesa de EPA unido físicamente; B - superficies no irradiadas y lavadas con una
- 55 fina capa de EPA adsorbido físicamente; C – superficies irradiadas y lavadas con una fina capa de EPA unido covalentemente.
- Figura 9: Mecanismo propuesto para la fotooxidación de EPA y TiO₂ que dio como resultado una capa delgada de EPA unido covalentemente y productos de fotooxidación de EPA. A) el EPA se oxida dando como resultado la
- 60 generación de óxidos y sus radicales, peróxidos y sus radicales, peroxiácidos y perésteres dentro de la estructura de EPA por irradiación con luz UV y degradación de moléculas de EPA en ácidos carboxílicos y dicarboxílicos; b) la fotooxidación de superficies de TiO₂ condujo a la hidroxilación, así como a la reducción de grupos hidróxido; C) unión entre productos de fotooxidación de EPA reactivos y grupos reactivos sobre las superficies de TiO₂ irradiadas mediante la formación de grupos éster, peréster, éter y peróxido. R1-4 – cadena principal del EPA restante de diversas longitudes y con varios números de enlaces dobles.
- 65 Figura 10. Mediciones de la prueba de extracción de las superficies ensayadas después de un período de 10 semanas de cicatrización. Los diagramas de caja representan el valor de la mediana y la distribución de las

diferentes mediciones (n = 6) de cada grupo.

Figura 11. Cambios en la densidad mineral ósea volumétrica (DMOV) del sub-implante de hueso cortical después de 10 semanas de tiempo de cicatrización usando micro-CT. Los valores representan las medias \pm EEM (n = 6).

Figura 12. Actividad LDH medida en el líquido de la herida recogido del sitio del implante después de 10 semanas de tiempo de cicatrización.

Figura 13. Actividad de ALP medida en el líquido de la herida recogido del sitio del implante después de 10 semanas de tiempo de cicatrización.

Figura 14. Proteína total medida en el líquido de la herida recogido del sitio del implante después de 10 semanas de tiempo de cicatrización.

Figura 15. Expresión génica de osteocalcina en el tejido óseo periimplantario unido a los implantes de titanio modificados.

Figura 16. Expresión del gen de la IL-6 en el tejido óseo periimplantario unido a los implantes de titanio modificados.

Figura 17. Expresión del gen TRAP en el tejido óseo periimplantario unido a los implantes de titanio modificados.

Figura 18. Cambios en las áreas de los picos de diferentes absorbancias en el espectro FTIR causados por la irradiación UV de PUFA.

Figura 19. α -tocoferol y algunos de sus posibles productos de fotooxidación (según Yamauchi et al, 2002).

Figura 20. Cambio en las áreas de los picos a absorciones típicas de α -tocoferol durante la irradiación UV.

Figura 21. Cambios de las áreas de los picos con tiempo de irradiación UV cuando se añadía 50 % en moles de α -tocoferol a EPA o DHA, ilustrando el efecto antioxidante del α -tocoferol sobre los PUFAs.

Figura 22. Cambios de las áreas de los picos con una absorbancia máxima a 3300 cm^{-1} para los PUFAs con diferentes cantidades añadidas de α -tocoferol.

Figura 23. Esquema de la transformación de 7DHC a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Figura 24. Espectros FTIR para 7-DHC que fue irradiado con luz UV durante diferentes períodos de tiempo.

Figura 25. Espectros FTIR para el colecalciferol que fue irradiado con luz UV durante diferentes períodos de tiempo.

Figura 26. Cambios en las áreas de los picos con tiempo de irradiación UV para los espectros de absorbancia de 7-DHC y colecalciferol.

Figura 27. Los espectros de las mezclas de 7-DHC + EPA sobre las superficies de Ti antes y después de la irradiación UV durante 15, 30 y 60 min.

Figura 28. Cambios en las áreas de los picos de la mezcla de 7-DHC + EPA sobre las superficies de Ti durante la irradiación UV durante hasta 60 min en comparación con los cambios de las áreas de los picos de EPA solo y 7-DHC solo.

Figura 29. Configuración para irradiar muestras de Ti con luz UV después de la aplicación de mezclas de PUFA y/o vitaminas.

Descripción detallada

La presente invención describe por primera vez un nuevo y sencillo método de modificación de la superficie para unir químicamente moléculas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a un metal, tal como a una superficie que comprende Ti y/o un óxido de titanio utilizando irradiación UV.

En una realización particular, el PUFA utilizado es el ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3 (EPA), que es un ácido graso con efectos positivos sobre la homeostasis ósea *in vivo*, tales como la remodelación ósea, la formación ósea y/o la reabsorción ósea. La luz UV se emplea en la presente memoria para inducir sitios de unión reactivos sobre al menos parte de una de las superficies de Ti de un implante médico (efecto fotocatalítico) y/o dentro de las moléculas de EPA, por lo que se prevé que la radiación UV del implante ocurra antes y/o después del recubrimiento de la superficie de Ti con PUFA.

Como se documenta en la sección experimental (véase por ej., el Ejemplo 2), el recubrimiento superficial de un implante así recubierto y expuesto a irradiación UV (PUFA unido químicamente) se ha caracterizado por la medición del AC, FTIR y recuento de centelleo. El rendimiento de las superficies recubiertas se ha probado adicionalmente *in vitro* con el cultivo de células MC3T3-E1 durante 24 h y se han comparado con superficies con EPA adsorbido físicamente (es decir, PUFA adsorbidos físicamente) o con superficies de Ti no modificadas, así como a superficies de Ti expuestas a irradiación UV sin pre-recubrimiento con PUFA. Sorprendentemente, se demostró que las superficies con EPA unido químicamente tienen un rendimiento significativamente mejor en términos de adhesión celular en comparación con superficies de Ti no modificadas o solo irradiadas con luz UV, así como en comparación con superficies con EPA adsorbido físicamente. Lo que es más, incluso exhibieron una toxicidad comparativamente baja.

En el presente contexto, el término "implante" incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo destinado a ser implantado en el cuerpo de un animal vertebrado, en particular un mamífero tal como un ser humano. Ejemplos no limitativos de tales dispositivos son dispositivos médicos que reemplazan a la anatomía o restauran una función del cuerpo tal como la articulación de cadera femoral, cabeza femoral, copa acetabular; stents vasculares, codo incluyendo vástagos, cuñas, insertos articulares; rodilla, incluyendo los componentes femoral y tibial, vástago, cuñas, insertos articulares o componentes rotulianos; hombros incluyendo vástago y cabeza; muñeca; tobillos; mano;

5 dedos; dedos de los pies; vértebras; discos vertebrales; articulaciones artificiales; implantes dentales; implantes osiculoplásticos; implantes de oído medio incluyendo implantes del yunque, martillo, estribo, yunque-estribo, martillo-yunque, martillo-yunque-estribo; implantes cocleares; dispositivos de fijación ortopédicos tales como clavos, tornillos, grapas y placas; válvulas cardíacas; marcapasos; catéteres; vasos; implantes para el relleno de espacio; implantes para la retención de audífonos; implantes para fijación externa y también dispositivos intrauterinos (DIU) y dispositivos bioelectrónicos tales como dispositivos intracocleares o intracraneales. Los implantes médicos también pueden ser denominados como dispositivos protésicos médicos. Generalmente, un implante médico está compuesto de una o varias partes del implante.

10 En el presente contexto, la expresión “implante ortopédico” incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo destinado a ser implantado en el cuerpo de un animal vertebrado, en particular un mamífero tal como un ser humano, para la conservación y restauración de la función del sistema musculoesquelético, especialmente las articulaciones y los huesos, incluyendo el alivio del dolor en estas estructuras.

15 En el presente contexto, la expresión “implante dental” incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo destinado a ser implantado en la cavidad bucal de un animal vertebrado, en particular un mamífero tal como un ser humano, en procedimientos de restauración de dientes. Los implantes dentales también se pueden designar como dispositivos protésicos dentales. Generalmente, un implante dental está compuesto por una o varias partes del implante. Por ejemplo, un implante dental comprende habitualmente un dispositivo de fijación dental acoplado a partes secundarias del implante, tal como un pilar y/o una restauración dental tal como una corona, un puente o una dentadura. Sin embargo, cualquier dispositivo, tal como un accesorio dental, destinado a la implantación, puede referirse solo como un implante incluso si se van a conectar otras partes. Los implantes dentales son actualmente realizaciones preferidas.

25 La presente invención se refiere a un implante de metal recubierto que se utiliza como implante médico y/o dental, que facilita activamente la adhesión controlada de tejido duro y/o mineralizado al implante, por ej., que induce activamente la adhesión de tejido duro y/o mineralizado al implante y/o exhibe un efecto mejorado en la remodelación ósea y/o biocompatibilidad del implante debido a que al menos parte de su superficie está recubierta con una capa de baja concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). En una realización particular, al menos parte de su superficie está recubierta con una capa de baja concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en combinación con un fosfolípido, una vitamina y/o un antioxidante.

35 La presente invención divulga al mismo tiempo un implante de metal que se utilizará como implante médico y/o dental, que inhibe activamente la adhesión del tejido duro y/o mineralizado al implante, tal como la fijación ósea, debido a que al menos parte de su superficie está recubierta con una capa de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en una alta concentración. Se entiende además que la última realización de la presente invención, es decir, el implante que inhibe activamente la adhesión del tejido duro y/o mineralizado al implante, tal como la fijación ósea, debido a que al menos parte de su superficie está recubierta con una capa de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en una concentración alta, puede inducir y/o promover activamente la remodelación ósea en tejidos que no están en contacto directo con el implante. De este modo, en una realización de este tipo, se genera un implante resbaladizo que se puede extraer fácilmente del sitio de implantación, que todavía muestra un efecto beneficioso sobre el crecimiento de tejido mineralizado y/o duro en la vecindad general del sitio de implantación. Sin el deseo de limitar el alcance de la presente invención a una teoría particular, el efecto beneficioso discutido anteriormente de un recubrimiento de PUFA de alta concentración de un implante resbaladizo sobre el cierre mediante tejido mineralizado y/o duro es muy probablemente debido a la dilución natural del PUFA una vez que se libera en el tejido circundante del implante, lo que generará, por supuesto, una concentración suficientemente baja de PUFA a una distancia fácilmente calculable de la superficie de contacto real del implante.

50 La invención divulga adicionalmente un método para fabricar dicho implante de metal con efecto inductor o inhibidor sobre la adhesión de tejido duro y/o mineralizado y/o la remodelación ósea, en el que el implante está recubierto con PUFA a una concentración específica e irradiado con luz UV.

55 El dispositivo o implante de acuerdo con la invención se puede usar para una serie de propósitos. Ejemplos de tales propósitos incluyen el uso para: inducir formación de tejido duro y/o mineralizado local (por ejemplo, tejido óseo) en el sitio de implantación; controlar el crecimiento microbiano y/o la invasión en el sitio de implantación o sistémicamente; reducir la inflamación en el sitio de implantación o sistémicamente; estimular la reparación, regeneración o formación del ligamento; inducir la formación de cartílago; nuclear, controlar y/o modelar la biomineralización; mejorar la adhesión entre implantes y tejidos; mejorar la osteointegración de los implantes; mejorar la adherencia del tejido a un implante; dificultar la adherencia del tejido a un implante (semi permanente o temporal); mejorar el contacto entre tejidos o tejidos e implantes, mejorar el sellado de tejido de una herida (quirúrgica); inducir la apoptosis (muerte celular) en células no deseadas (por ejemplo, células cancerosas); inducir una diferenciación y/o maduración celular específicas, aumentar la resistencia a la tracción de los tejidos; mejorar la cicatrización de heridas; acelerar la cicatrización de heridas; modelar la formación de tejidos; guiar la formación de tejidos; terapia génica local; estimular el crecimiento nervioso; mejorar la vascularización en tejidos adyacentes a un implante; estimular la síntesis de la matriz extracelular local; inhibir la descomposición de la matriz extracelular local; inducir la liberación del factor de crecimiento local; aumentar el metabolismo local de los tejidos; mejorar la función

de un tejido o parte del cuerpo; reducir el dolor local y la molestia. El propósito dependerá del tipo de implante, así como de la naturaleza y/o concentración de los PUFA.

Las realizaciones actualmente preferidas pueden mejorar la osteointegración de implantes; es decir, mejoran la adherencia del tejido a un implante, mejoran la remodelación ósea, impiden la adherencia del tejido a un implante (semipermanente o temporal), reducen la remodelación ósea y/o mejoran el contacto entre tejidos o tejidos e implantes. En la actualidad se prevé que un implante presente un efecto estimulante o amortiguador sobre la remodelación ósea y/o la osteointegración, pero también es posible producir un implante que muestre estos efectos contrarios en diferentes partes del implante.

La expresión "tejido duro y/o mineralizado" se emplea en el presente contexto para describir una variedad de diferentes tipos de tejidos naturales que se han mineralizado y/o tejido que tiene una sustancia intercelular firme. Un tejido duro y/o mineralizado de acuerdo con la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cartílago, hueso, esmalte dental, tejido tipo dentina, tejido duro dental y tejido cortical.

En general, el tejido mineralizado es vital para muchos fenotipos adaptativos característicos en vertebrados. Tres tejidos primarios, esmalte (enamelóide), dentina y hueso, se encuentran en la armadura corporal de los antiguos agnatos y dientes de mamíferos, lo que sugiere que estos dos órganos son homólogos. El esmalte de los mamíferos se forma en las proteínas específicas del esmalte, como la amelogenina, mientras que la dentina y la forma ósea en el colágeno y muchas proteínas ácidas, como SPP1, regulan de forma coordinada su mineralización.

En una realización actualmente preferida, el implante comprende al menos el 90 % del peso de un material metálico.

Se prefiere actualmente que el material metálico sea titanio o una aleación del mismo, por ej., una aleación con zirconio, tantalio, hafnio, niobio, aluminio, vanadio, cromo, cobalto, magnesio, hierro, oro, plata, cobre, mercurio, estaño o zinc. En una realización particularmente preferida, el material metálico es titanio.

En una realización. El material metálico del implante de metal recubierto se selecciona del grupo que consiste en titanio, aleación de titanio, circonio, hafnio, tantalio, niobio y mezclas de dos o más de zirconio, hafnio, tantalio y niobio.

Además, preferiblemente el material metálico es zirconio, hafnio, tantalio, niobio o mezclas de dos o más de estos. El material metálico preferiblemente también es un hidruro metálico, tal como TiH, hidróxido metálico, tal como TiOH, un hidruro de una aleación, o un hidróxido de una aleación. Como alternativa, el material puede ser un óxido de un metal. Además, el material del implante puede ser de aluminio, oro o níquel de acero quirúrgico.

El término "cp" es bien conocido por el experto en la técnica y significa "comercialmente puro" y se refiere al nivel de pureza del metal empleado, tal como Ti.

Cuando el material metálico es una aleación de titanio, zirconio, tantalio, hafnio o niobio, puede ser una aleación entre uno o más de estos elementos metálicos; o puede ser una aleación que contiene uno o más metales tales como aluminio, vanadio, cromo, cobalto, magnesio, hierro, oro, plata, cobre, mercurio, estaño o zinc; o ambos.

En una realización actualmente preferida, el implante comprende al menos el 90 % en peso de titanio y/o una aleación de titanio.

En una realización de la invención, el implante que comprende Ti se expone a radiación UV antes, simultáneamente y/o después de revestimiento con un PUFA. El TiO₂ es un fotocatalizador bien conocido (Nakamura et al., 2002). Si la superficie es irradiada con luz UV, se generan pares de electrones-agujeros, se liberan compuestos de oxígeno reactivos y las moléculas de agua se disocian y adsorben en la superficie. Esos grupos hidróxido causan una hidrofobicidad aumentada de la superficie. La eficacia de la irradiación UV se ha demostrado previamente mediante mediciones del ángulo de contacto (AC) y, en cierta medida, mediante mediciones FTIR (Nakamura et al., 2002; Miyauchi et al., 2002).

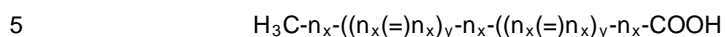
En una realización, la presente invención se refiere a un método para recubrir un implante médico de Ti cp con una capa delgada de PUFA, por ej., como se demuestra en los Ejemplos 1 y 2 con ácido eicosapentaenoico (EPA), como alternativa el implante se expone adicionalmente a irradiación UV y lavado (recubrimiento de PUFA unido químicamente) o solo lavado (recubrimiento de PUFA adsorbido físicamente). En los ejemplos actualmente presentados, las características de superficie cambiadas del implante de Ti cp se detectan y caracterizan con métodos físicos y químicos.

En el presente contexto PUFA significa ácidos grasos poliinsaturados, un término bien conocido por el experto en la materia que incluye un grupo bien definido de ácidos grasos.

Tabla 1. Ácidos grasos comunes

Nombres químicos y descripciones de algunos ácidos grasos comunes				
Nombre común	Átomos de carbono	Dobles enlaces	Nombre científico	Fuentes
Ácido butírico	4	0	Ácido butanoico	grasa de la leche
Ácido caproico	6	0	Ácido hexanoico	grasa de la leche
Ácido caprílico	8	0	Ácido octanoico	aceite de coco
Ácido cáprico	10	0	Ácido decanoico	aceite de coco
Ácido láurico	12	0	Ácido dodecanoico	aceite de coco
Ácido mirístico	14	0	Ácido tetradecanoico	aceite de semilla de palma
Ácido palmítico	16	0	Ácido hexadecanoico	aceite de palma
Ácido palmitoleico	16	1	Ácido 9-hexadecenoico	grasas animales
Ácido esteárico	18	0	Ácido octadecanoico	grasas animales
Ácido oleico	18	1	Ácido 9-octadecenoico	aceite de oliva
Ácido ricinoleico	18	1	Ácido 12-hidroxi-9-octadecenoico	aceite de ricino
Ácido vacénico	18	1	Ácido 11-octadecenoico	grasa de la leche
Ácido linoleico	18	2	Ácido 9,12 - octadecadienoico (n-6)	aceite de semilla de uva
Ácido alfa-linolénico (ALA)	18	3	Ácido 9,12,15 - octadecatrienoico (n-3)	aceite de semilla de lino (linaza)
Ácido gamma-linolénico (GLA)	18	3	Ácido 6,9,12-octadecatrienoico (n-6)	aceite de borraja
Ácido araquídico	20	0	Ácido eicosanoico	aceite de cacahuete, aceite de pescado
Ácido gadoleico	20	1	Ácido 9-eicosenoico	aceite de pescado
Ácido araquidónico (AA)	20	4	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (n-6)	grasas de hígado
EPA	20	5	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (n-3)	aceite de pescado
Ácido behénico	22	0	Ácido docosanoico	aceite de colza
Ácido erúcido	22	1	13-docosenoico	aceite de colza
DHA	22	6	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (n-3)	aceite de pescado
Ácido lignocérico	24	0	Ácido tetracosanoico	pequeñas cantidades en la mayoría de las grasas

Como es bien conocido en la técnica, un PUFA típico puede describirse mediante la siguiente fórmula:



en la que:

n es cualquier C natural y/o modificado artificialmente y/o cualquier otro elemento natural y/o artificial que puede formar un doble enlace y

(=) representa un doble enlace y

x es un número entre 0 y x, y

5 y es un número entre 1 y x, y

en la que la posición del doble enlace es variable a lo largo de la cadena de n.

Los dobles enlaces pueden estar todos en *cis* o todos en *trans*, o en configuraciones mixtas.

10

Los ácidos grasos poliinsaturados tienen efectos en diversos procesos fisiológicos que afectan la salud normal y las enfermedades crónicas. Las fuentes predominantes de PUFA son los aceites vegetales y el pescado. Químicamente, los PUFA pertenecen a la clase de los lípidos simples, al igual que los ácidos grasos con dos o más dobles enlaces en posición *cis*. La ubicación del primer doble enlace, contado a partir del extremo metilo del ácido graso, se designa con el número omega o n.

15

Los PUFA existen en animales, plantas, algas, hongos y bacterias y se encuentran ampliamente distribuidos en muchos compuestos lipídicos tales como membranas, aceites de almacenamiento, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y lipoproteínas. Los PUFA se producen comercialmente a partir de plantas de semillas seleccionadas, y algunas fuentes marinas.

20

Hay dos familias principales de PUFA, n-3 y n-6 (ver Tabla 1).

Los PUFA típicos son:

25

PUFA de la serie 3, n-3: ácido alfa-linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA)

PUFA de la serie 6, n-6: ácido linoleico, ácido gamma-linolénico (GLA), ácido araquidónico (AA)

Preferiblemente, el PUFA se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos n-3 y n-6.

30

A los PUFA de la dieta se les ha atribuido durante mucho tiempo la capacidad de ejercer influencias únicas en las vías metabólicas y en el crecimiento celular. Por ejemplo, pueden actuar como hormonas y controlar la actividad de los factores de transcripción. Además, se descubrió que los PUFA provocan cambios en la expresión génica que precede a los cambios en la composición de la membrana al controlar directamente la actividad de los factores de transcripción nucleares. Los efectos ejercidos por los PUFA están más probablemente mediados por cambios en la composición de la membrana, alteración de la liberación de la hormona o señalización y/o interacción ligando/receptor.

35

En general, los ácidos grasos (AG), los módulos básicos de los lípidos tienen una gran influencia en las propiedades de la membrana celular (por ejemplo, la fluidez) y en el metabolismo celular. Se ha demostrado que los AG de la dieta influyen en el modelado y la remodelación óseos. Especialmente, la relación n-6/n-3 de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) es de importancia implícita. El EPA (ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3) es un precursor en la producción de eicosanoides en el cuerpo, un grupo de moléculas de señalización que también pueden ser sintetizadas a partir de otros PUFA n-3 y n-6, tales como AA (ácido araquidónico 20:4 n - 6) y DHA (ácido docosahexaenoico 22:6 n-3). Esos PUFA tienen efectos opuestos sobre, entre otros, el metabolismo y la inflamación óseos.

40

45

En una realización, el PUFA utilizado en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en ácido eicosapentaenoico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico y mezclas de los mismos.

50

Preferiblemente, el PUFA utilizado en la presente invención comprende o consiste en EPA.

Aunque en una realización actualmente preferida, se eligió EPA como sustancia de recubrimiento para una superficie metálica, tal como una superficie de Ti de un implante, está bien documentado en el campo que el DHA actúa de manera similar con respecto a la estimulación del tejido óseo. Así, en otra realización, el DHA o mezclas entre EPA y DHA se contemplan también como recubrimiento superficial.

55

El hueso es un órgano multifuncional que consiste en un marco estructural de matriz mineralizada y contiene poblaciones heterogéneas de condrocitos, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos, linfocitos y células hematopoyéticas. El crecimiento óseo está regulado por interacciones complejas entre diferentes actores intercelulares y extracelulares. Sin la intención de estar limitado por una hipótesis científica específica, se prevé que los PUFA en una concentración baja tienen un efecto beneficioso sobre el crecimiento, la formación, la reabsorción y/o la adhesión óseas, mientras que una alta concentración de PUFA es repelente e inhibe activamente el crecimiento, formación y/o adhesión óseos.

60

65

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un implante de metal que se utilizará como implante médico y/o

dental, que facilita activamente la adhesión controlada del hueso al implante, por ej., el cual induce activamente la adhesión del hueso al implante y/o presenta un efecto mejorado sobre la remodelación y/o biocompatibilidad óseas del implante debido a que al menos parte de su superficie está recubierta con una capa de baja concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) e irradiada con luz UV, antes y/o después del recubrimiento. La presente invención divulga al mismo tiempo un implante de metal que se utiliza como implante médico y/o dental, el cual inhibe activamente la adhesión ósea al implante, tal como la fijación ósea, debido a que al menos parte de su superficie está recubierta con una capa de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en una alta concentración. La invención divulga además un método para fabricar dicho implante de metal con efecto inductor o inhibidor sobre la adhesión y/o remodelación óseas, en el que el implante se recubre con PUFA a una concentración específica y se irradia con luz UV.

La invención también divulga un método para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, que comprende

- a) tratar el implante con una solución que comprende PUFA y
- b) irradiar al menos parte de la superficie del implante con luz UV durante al menos 30 segundos.

Además, la invención divulga un método para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, que comprende

- a) irradiar al menos parte de la superficie del implante con luz UV durante al menos 30 segundos y
- b) tratar el implante con una solución que comprende PUFA.

La invención también divulga un método para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, que comprende

- a) pulir y/o someter a granallado el implante,
- b) lavar,
- c) esterilizar en autoclave,
- d) tratar el implante con una solución que comprende PUFA y
- e) irradiar al menos parte de la superficie del implante con luz UV durante al menos 30 segundos.

Además, la invención divulga un método para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, que comprende

- a) pulir y/o someter a granallado el implante,
- b) lavar,
- c) esterilizar en autoclave,
- d) irradiar al menos parte de la superficie del implante con luz UV durante al menos 30 segundos y
- e) tratar el implante con una solución que comprende PUFA.

En los métodos para la fabricación de un implante de la invención, solo una parte del implante se puede tratar con una solución que comprende PUFA.

Preferiblemente, la al menos parte de la superficie del implante irradiada con luz UV es la parte tratada con una solución que comprende PUFA.

En los métodos de la invención para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, comprendiendo la solución que comprende PUFA preferiblemente EPA.

Preferentemente, en los métodos para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, el implante comprende preferiblemente titanio.

En una realización actualmente preferida, la invención describe así un método para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, en el que la superficie es irradiada con luz UV caracterizada por Fluo.link, $A = 312 \text{ nm}$.

En una realización igualmente preferida, la invención divulga adicionalmente un método para fabricar un implante de metal con un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido mineralizado y/o duro al implante, en el que la intensidad de la luz UV con la que se irradia la superficie es de aproximadamente 6 mW/cm^2 .

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* documentados en la sección experimental (véase el Ejemplo 1) para probar la citotoxicidad y la adhesión celular de células MC3T3-E1 a implantes de titanio modificados con EPA. La caracterización superficial de los implantes descritos en la presente memoria demuestra que la estructura superficial del titanio no cambió durante el procedimiento, mientras que las propiedades químicas de las superficies de titanio y de FA se cambiaron para formar enlaces químicos. Se observó que en las superficies de los implantes irradiados

con UV quedaban cantidades significativas de ^{14}C -EPA en comparación con los implantes no irradiados después de un lavado exhaustivo con metanol. Los resultados *in vitro* en células MC3T3-E1 mostraron que una alta cantidad de EPA era tóxica para las células. Sin embargo, las superficies con cantidades menores de EPA unido a la superficie irradiada con luz UV mostraban menor toxicidad y mayor adhesión celular en comparación con los implantes no tratados y los implantes sin recubrimiento.

En conclusión, los presentes resultados demuestran que la luz UV es un método adecuado para unir PUFA, por ej., EPA, y para crear una capa delgada de PUFA sobre la superficie de, por ejemplo, implantes de titanio, lo que se ha demostrado que mejora la viabilidad celular y la adhesión de osteoblastos.

Para la presente invención se prefiere una luz UV en el intervalo de UV C (100 nm - 280 nm) y/o luz UV B (280 nm - 315 nm). Por ejemplo, se ha demostrado que 254 nm y 302 nm funcionan bien para la presente invención. La actividad del titanio se reduce de aproximadamente 350 nm a 400 nm. Por consiguiente la UV B es un área segura para la activación del TiO_2 (S.M. Oh et al., 2003).

El EPA es susceptible a la oxidación inducida por la luz debido a la insaturación en la estructura. Especialmente la luz UV altamente energética conduce a la oxidación y generación de grupos óxido reactivos. Como se muestra en el Ejemplo 2, el análisis de los espectros FTIR mostró que se producían cambios en la estructura del EPA. Las mediciones de la cantidad de EPA marcado con ^{14}C en las superficies mostraron que sobre las superficies no irradiadas e irradiadas quedaba una cantidad medible de ^{14}C -EPA. Sin embargo, la diferencia significativa en las señales de ^{14}C medidas indicó que el recubrimiento de superficie irradiado era estable frente a un lavado exhaustivo y con ello quedaba unido químicamente. La película de ácido graso sobre las superficies irradiadas puede consistir en una combinación de EPA unido químicamente y físicamente. La rugosidad de la superficie de las muestras de Ti cp pulidas excluyó el análisis detallado de la estructura del recubrimiento con, por ejemplo, reflectometría de rayos X de incidencia rasante, donde se requiere una S_a no superior a 1 nm; tal rugosidad superficial baja podría, por ejemplo, obtenerse pulverizando una fina capa de Ti sobre superficies lisas de Si.

En el Ejemplo 2, los 2 grupos de referencia con EPA adsorbido físicamente en sus superficies mostraron que grandes cantidades de EPA (grupo A) tenían un efecto tóxico sobre las células y pequeñas cantidades de EPA (grupo B) no tenían un efecto significativo sobre la unión celular. Para el grupo C se encontró que la irradiación UV de TiO_2 solo (control en el grupo C) tuvo un efecto ligeramente negativo sobre la adhesión celular no afectando a la toxicidad.

El EPA unido químicamente en el grupo C tuvo un efecto positivo sobre la adhesión celular y demostró no ser tóxico. Por lo tanto, se puede sugerir que el EPA es eficaz aunque esté químicamente unido a las superficies y por lo tanto no está directamente disponible para las células. Un revestimiento de superficie con EPA puede cambiar las características de la capa de proteína fácilmente adsorbida sobre las superficies de las muestras cuando están en contacto con medios que contienen proteínas. Una posible explicación de este fenómeno es que el EPA es propenso a la autooxidación en el aire debido a su insaturación, por lo tanto, los resultados de las pruebas *in vitro*, que mostraron un efecto positivo del revestimiento por irradiación.

Además, se incluyen estudios que investigan superficies de Ti, las cuales se activan solas con irradiación UV y tales superficies a las que se aplica el EPA posteriormente. Mediante esta medida específica, puede reducirse la alteración de las moléculas de ácido graso.

Las superficies del implante están expuestas a fuertes fuerzas de fricción durante el implante, por lo que un revestimiento de superficie debe ser delgado y firme para soportar altas fuerzas de abrasión. Por lo tanto, la presente invención en una realización actualmente preferida se refiere a implantes con un recubrimiento de superficie química de PUFA.

Como se demostró en la medición del AC en la sección experimental, los parámetros de rugosidad de la superficie no cambiaron debido al procedimiento de modificación de superficie, lo que indica que todos los cambios de ángulos de contacto de superficie discutidos fueron causados más probablemente por cambios en la química superficial.

Un disolvente de limpieza preferido, tal como metanol, deja una fina capa de residuos carbonáceos sobre las superficies. Se ha informado que un mayor contenido de carbono en superficies metálicas aumenta la hidrofobicidad de dichas superficies. Esto explica el aumento del AC para el control positivo en el grupo B. El AC comparativamente más bajo de las monedas recubiertas superficialmente en el grupo B indicó que lo más probable, y de acuerdo con la cantidad de ^{14}C -EPA medido en esas superficies, quedaba una capa delgada de EPA adsorbida físicamente después de lavar con metanol. Para el recubrimiento químico (grupo C), los sitios reactivos tuvieron que ser generados tanto en la superficie del Ti como dentro de las moléculas de EPA para crear una capa superficial delgada y estable. El efecto fotocatalítico de la luz UV sobre el TiO_2 se utilizó para la generación de grupos hidróxido reactivos sobre las superficies de las monedas de Ti. Como es bien conocido en la técnica, el TiO_2 se convierte en anfífilo debido a la irradiación UV, con una estructura que contiene fases hidrófilas y lipófilas coexistentes. En los experimentos presentados, las mediciones del AC con agua mostraron que las superficies de TiO_2 irradiadas se convirtieron en más hidrófilas.

El análisis con el perfilómetro mostró que el EPA estaba distribuido de manera irregular sobre superficies no irradiadas (grupo A); se observaron estructuras parecidas a gotas o regiones con una capa de EPA más o menos gruesa (datos no mostrados). Sin embargo, los ácidos grasos se extendieron uniformemente sobre las superficies después de la irradiación de las muestras, lo que se debió muy probablemente a propiedades lipófilas de las superficies.

Por consiguiente, la presente invención en un aspecto se refiere a un implante médico recubierto, que está recubierto, al menos en parte, con una capa delgada de PUFA uniformemente extendida e irradiada con luz UV, antes y/o después del revestimiento como se define en la presente memoria. Dicho implante está en una realización actualmente preferida recubierta con PUFA unido químicamente, tal como con EPA, AA y/o DHA. Un implante correspondiente a dicha realización particular se caracteriza adicionalmente por presentar un efecto mejorado sobre la adhesión de tejido duro y/o mineralizado y/o la formación, remodelación, adición y/o biocompatibilidad óseas.

En el presente contexto, una capa delgada de PUFA representa una monocapa de un PUFA, por ej., EPA, lo que representa aproximadamente $1-5 \times 10^{15}$ de enlaces no saturados unidos por mm^2 de superficie de titanio, tal como aproximadamente 3×10^{15} de enlaces no saturados unidos por mm^2 de superficie de titanio.

Generalmente, un metal con una alta concentración de PUFA por mm^2 , por ej., la superficie de titanio, representa aproximadamente 1-5 nanomoles de PUFA/ mm^2 de superficie de titanio, tal como 3,2 nanomoles de PUFA/ mm^2 de superficie de titanio. Un recubrimiento de alta concentración comprende así aproximadamente 0,1-5 μg de PUFA/ mm^2 de superficie de titanio, tal como al menos 1 μg de PUFA/ mm^2 de superficie de titanio. Generalmente dicho PUFA es EPA.

A su vez, una baja concentración de PUFA por mm^2 de superficie de titanio representa menos de 0,5 nanomoles de PUFA/ mm^2 de superficie de titanio. Un recubrimiento de baja concentración comprende de este modo aproximadamente 1-100 nanogramos de PUFA/ mm^2 de superficie de titanio, como máximo 10 nanogramos de PUFA/ mm^2 de superficie de titanio o como máximo 1 nanogramo/ mm^2 de superficie de titanio. Generalmente dicho PUFA es EPA. En una realización, el implante de metal recubierto se recubre con PUFA a una concentración comprendida entre 1 y 10 nanogramos/ mm^2 .

Una realización actualmente preferida es, por lo tanto, un implante de metal para la adhesión controlada del tejido mineralizado, en el que al menos parte de la superficie del implante está recubierta con PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) a una concentración inferior a 0,01 μmol , tal como menos de 0,001 μmol .

En los datos del experimento, en el Ejemplo 1 se muestra una mejor unión y diferenciación celular *in vitro*.

Por el contrario, en el Ejemplo 3 se muestra *in vivo* una disminución de la fuerza de adhesión ósea con los implantes que fueron irradiados con luz UV (con y sin PUFA). Los resultados indican que el tratamiento superficial con luz UV, en presencia o ausencia de EPA, reduce la adhesión ósea y la densidad mineral ósea volumétrica en el tejido óseo periimplantario. Ninguno de los tratamientos de superficie presentados mostró niveles incrementados de actividad LDH como resultado de necrosis tisular en el hueso adyacente. Además, la expresión génica de los marcadores de formación ósea muestra mayores niveles de ARNm en los irradiados con luz UV (con y sin PUFA). De este estudio se puede concluir que la funcionalización superficial de los implantes Ti con luz UV y EPA es un recubrimiento biocompatible para reducir la capacidad de unión ósea del Ti y mantener una nueva formación ósea.

El objetivo del Ejemplo 3 era producir superficies de Ti con una capa de EPA unido químicamente usando radiación UV que mantenga el proceso de cicatrización del hueso cortical simultáneamente con una unión baja, para ser aplicable como placas de fractura ósea. Estas aplicaciones requieren el desarrollo de superficies que impidan la adhesión de tejidos blandos y la irritación, lo que permite el deslizamiento del tejido, pero manteniendo sus propiedades biocompatibles. El titanio puro es uno de los materiales más elegidos para las placas óseas, debido a su excelente biocompatibilidad y resistencia a la corrosión. La única estrategia disponible hoy para minimizar la integración ósea es usar superficies con rugosidad mínima puliendo placas de fijación de titanio. Aunque la rugosidad de la superficie ha sido considerada como el principal determinante en la osteointegración, la química superficial también juega un papel importante. El recubrimiento de Ti con una capa uniforme de EPA usando irradiación UV proporciona un ejemplo para investigar cómo la modificación de la química superficial interactúa en su efecto sobre las células e influye en la osteointegración.

Además, otra realización preferida es un implante de metal recubierto con PUFA y además caracterizado por que al menos la parte del implante recubierta con PUFA ha estado expuesta a la radiación UV durante al menos 30 segundos, tal como durante al menos 10 minutos o durante al menos 30 minutos. El tratamiento UV puede tener lugar antes, después o simultáneamente del recubrimiento del implante con PUFA.

En una realización, la funcionalidad del implante se mejora adicionalmente mediante la unión y/o integración de uno o más diversos elementos activos y/o sustancias a la superficie del implante, ya sea antes, simultáneamente y/o después del recubrimiento con PUFA y tratamiento UV alternativo del implante. Tales uniones se llevan a cabo preferiblemente usando, por ejemplo, reactivos químicos que tienen dos funcionalidades reactivas tales como

formalina o glutaraldehído. Generalmente, un elemento o sustancia a unir a la superficie del implante se selecciona del grupo que consiste en vitaminas (tales como vitamina E, C, D, A), en particular vitaminas solubles en grasa, antioxidantes, iones (tales como fluoruro, calcio, fosfatos, carbonatos) y antibióticos (tales como antibióticos solubles en grasa, microclinas, tetraciclina).

5 En una realización, el implante de metal recubierto de la invención comprende adicionalmente vitaminas liposolubles, tales como la vitamina E.

10 La vitamina E está preferiblemente presente en el implante o dispositivo durante la irradiación UV ya que impide la oxidación de PUFA (como se demuestra en el Ejemplo 4).

15 El 7-dehidrocolesterol (7-DHC, provitamina D₃) se convierte en colecalfiferol (vitamina D₃) a través de la previtamina D₃ en la piel humana. La conversión adicional a 25(OH)D₃ ocurre principalmente en el hígado. Sin embargo, dado que la enzima hidroxilasa CYP27A1 se expresa de forma ubicua en otros tejidos, el sistema para la producción local también puede estar disponible en el hueso (Aiba I et al., 2006). Además de los riñones, también se ha demostrado que la 1 α ,25(OH)₂D₃ se sintetiza localmente en el hueso a partir de 25(OH)D₃ (Ichikawa et al., 1995, Atkins et al., 2007). Una representación esquemática de la conversión se puede encontrar como la Figura 23. La 1 α ,25(OH)₂D₃ es la forma activa biológica de la vitamina D₃ y actúa como una hormona para regular los niveles séricos de calcio y fosfato y es un factor importante durante el crecimiento y la mineralización óseos (St-Arnaud R, 2008).

20 La deficiencia de vitamina D se ha considerado como factor de riesgo sistémico para la reducción de la densidad mineral ósea, la osteoporosis y la osteointegración deteriorada. El envejecimiento tiene como resultado una serie de cambios en el metabolismo óseo y del calcio que pueden afectar potencialmente a la osteointegración. La secreción de hormona paratiroidea aumenta con la edad. Por el contrario, hay una disminución en la calcitonina y la absorción de vitamina D con la edad. El principal problema con la deficiencia de vitamina D es que es muy difícil calcular a partir de la ingesta dietética y de la exposición al sol cuál será el nivel en sangre.

30 Por lo tanto, el recubrimiento con 7-DHC de los implantes de titanio y la activación de la conversión de 7-DHC en colecalfiferol con luz UV, con o sin PUFA, pueden afectar positivamente a la consolidación ósea y mejorar la consolidación ósea periimplantaria en pacientes normales y osteoporóticos. El colecalfiferol se convertirá en calcidiol y calcitriol en el hueso con sus propias hidroxilasas cuando sea necesario. El 7-DHC tiene la ventaja de tener una toxicidad mucho menor comparada con el colecalfiferol y las formas hidroxiladas de la vitamina D. Además, la irradiación de 7-DHC da directamente el producto final que se puede modificar posteriormente en el cuerpo, mientras que el calcitriol podría oxidarse a otros compuestos sobre las superficies de titanio.

35 Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un implante de metal en el que el implante comprende adicionalmente 7-dehidrocolesterol. La invención también divulga un implante recubierto con 7-dehidrocolesterol y posteriormente irradiado con luz UV para formar colecalfiferol (vitamina D₃). Dicho implante puede tener o no también PUFA en su superficie. En el Ejemplo 5, las superficies de titanio (Ti) se recubrieron con 7-DHC (con o sin PUFA en forma de EPA) o con colecalfiferol para analizar su transición iniciada por luz UV.

40 Para la conversión de 7-DHC, la irradiación más eficaz tiene longitudes de onda de 270 a 300 nm, aunque también se prefiere el intervalo de longitud de onda de UV C (100 nm - 280 nm) y UV B (280 nm - 315 nm).

45 Generalmente, el dispositivo o espécimen de implante se produce de forma aséptica y/o estéril, se deja secar al aire y luego se envasa en una bolsa de plástico estéril hermética en la que se almacena hasta su uso para su implantación. Sin embargo, a veces se puede desear un sistema de almacenamiento húmedo, por ej., como enlatado o almacenamiento en un líquido como solución salina o simplemente un electrolito del proceso de fabricación. Aunque el recubrimiento se puede hacer utilizar en condiciones asépticas o incluso estériles, puede evitarse la necesidad de hacer esto mediante la inclusión de una etapa de esterilización antes del uso, utilizando métodos convencionales tales como radiación ionizante, calentamiento, esterilización en autoclave o gas óxido de etileno, etc. La elección del método dependerá de las características y propiedades específicas del implante.

50 Antes del tratamiento del recubrimiento, el implante debe limpiarse a fondo. Esto consiste generalmente en el pretratamiento mecánico del implante mediante electropulido o limpieza con chorro de arena para modificar la estructura de la superficie si se desea y posteriormente limpiar a fondo con sosa cáustica caliente seguido de una etapa de desengrasamiento, por ejemplo, en tricloroetileno, etanol o metanol concentrados, antes de tratarse en una solución de decapado, por ej., ácido fluorhídrico, para eliminar óxidos e impurezas indeseables en la superficie. Después del decapado, el espécimen del implante se lava completamente en agua caliente, de intercambio de iones doblemente destilada.

60 Aunque la presente invención se refiere principalmente al recubrimiento de implantes metálicos con PUFA a concentraciones específicas altas o bajas, se prevé igualmente que por ejemplo una variedad de lípidos naturales que se caracterizan por comprender múltiples dobles enlaces se puedan usar de manera similar. En este contexto, se consideraría que una fina capa de lípidos naturales representa una monocapa de un lípido natural, lo que representa aproximadamente 1-5x10¹⁵ de enlaces insaturados unidos por mm² de superficie de titanio, tal como

3x10¹⁵ de enlaces insaturados unidos por mm² de superficie de titanio.

En una realización, cuando el implante comprende al menos el 90 % en peso de titanio y/o una aleación de titanio, el PUFA comprende o es EPA (ácido eicosapentaenoico), entonces el recubrimiento comprende de 1 a 5x10¹⁵ de enlaces insaturados unidos por mm² de superficie de titanio.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Sección experimental

Ejemplo 1

Implante de superficie rugosa

Matriz:			
Tipo de moneda	Concentración de EPA	Tratamiento	Nº de monedas
Pulida	0 mM	irradiada con luz UV sin irradiación	in vitro 6-5 = 30 car. 6-3 = 18
	10 mM		
	50 mM		
Sometida a granallado	0 mM	irradiada con luz UV sin irradiación	in vitro 6-5 = 30 car. 6-3 = 18
	10 mM		
	50 mM		
Número total de monedas			96

Limpieza

1. Monedas enjuagadas con agua pura
2. Monedas lavadas con etanol
3. Ultrasonido de monedas en agua durante 5 min
4. Las monedas se enjuagan de nuevo con agua pura
5. Las monedas se dejan secar en una cabina de flujo laminar
6. Esterilización en autoclave de las monedas

Modificación de la superficie

1. Trabajar en una cabina de flujo laminar
2. La solución de EPA se filtra (0,2 µm de tamaño de poro) para esterilizarla
3. Se aplican 10 µl de la solución respectiva de EPA en metanol sobre la superficie de las monedas
4. La moneda se deja secar en una cabina de flujo laminar
5. Parte de las monedas se irradian con luz UV después de que el disolvente se ha evaporado → Fluo.link, λ = 312 nm
→ Tiempo de irradiación: 30 min (el primer ensayo mostró que el ángulo de contacto va en aumento hasta 10 min de irradiación y disminuye posteriormente)
→ Intensidad de irradiación aprox. 6 mW/cm²
6. Lavar las monedas irradiadas con luz UV con metanol para eliminar los ácidos grasos no unidos

Caracterización

1. Perfilómetro: 150x, 3 monedas, 3 lugares en cada moneda, área de medición de 200x160 µm² (es decir, un cuadrado de 3x3), son importantes la imagen de plµ y el parámetro de rugosidad superficial calculado con SensoMap
2. Ángulo de contacto: Gota de 3 µl en la moneda, se mide el AC, la gota se agranda 2x con 1 µl de agua pura, después de cada ampliación se mide el AC de la superficie, el AC no se mide después de secar la moneda ya que esto podría cambiar la estructura de los ácidos grasos en la superficie de la moneda y con ello el AC
3. FT IR (DRIFT) para caracterizar los ácidos grasos en la superficie, diferencia antes y después de la irradiación UV.

Ejemplo 2**Implante de superficie lisa**

5 El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del recubrimiento con EPA sobre la superficie de Ti sobre la respuesta de los osteoblastos *in vitro*. Se compararon los métodos para adsorber físicamente o unir químicamente la capa con EPA, siendo el último producido por irradiación UV de superficies de TiO₂ y EPA. Dichos recubrimientos superficiales se detectaron y caracterizaron por métodos analíticos físicos y químicos. Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para probar la citotoxicidad y la capacidad de las superficies de Ti modificadas con EPA para promover la adhesión celular y la diferenciación osteogénica de las células MC3T3-E1.

Materiales y métodos**Productos químicos**

15 El EPA se adquirió en Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), el EPA marcado radiactivamente [¹⁴C]-EPA se obtuvo de American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, EE.UU.).

Implantes de titanio y tratamientos

20 Se mecanizaron implantes de Ti Cp con un diámetro de 6,25 mm y una altura de 2 mm a partir de varillas de Ti Cp y posteriormente se trituraron y pulieron (Phoenix 4000, Buehler GmbH, Düsseldorf, Alemania) en siete secuencias. Se usó un soporte especial para pulir 96 implantes en el momento para evitar las diferencias de lote en la futura caracterización de la superficie. Los papeles de carburo de silicio, el neopreno poroso para el pulido final y la suspensión de sílice coloidal abrasiva (OP-S) fueron suministrados por Struers GmbH (Willich, Alemania). La primera etapa consistió en moler todos los implantes con P500 en agua hasta que fueron nivelados, con 65 N de presión y una contra-rotación a 250 rpm. El tiempo de molienda se ajustó después a 10 min y el tamaño del grano disminuyó con papeles: P800; P1200 y P2500. Para el papel pulidor P4000 se utilizó además la suspensión de pulido OP-S. Para la última etapa, se utilizó un neopreno especial poroso (MD-Chem) a 200 rpm y 50 N de presión durante 9 min en co-rotación con la suspensión OP-S y 1 min en co-rotación con agua.

35 Después del pulido, las monedas de titanio se limpiaron antes de la esterilización. Se lavaron juntas en un vaso de precipitados con agua desionizada durante 30 s, con etanol al 70 % durante 30 s y en baño de ultrasonidos a 40 °C durante 5 min en agua desionizada. Los implantes se colocaron posteriormente en solución de NaOH al 40 % en un baño de agua a 40 °C durante 10 min, se sometieron a ultrasonidos en agua desionizada durante 5 min, y después se lavaron con agua desionizada hasta que el pH alcanzó 6. Posteriormente, los implantes se sonicaron en agua desionizada a 50 °C durante 5 min, se colocaron en una solución de HNO₃ al 50 % a 50 °C durante 10 min y se sonicaron en agua desionizada durante otros 5 min. Los implantes se lavaron con agua desionizada hasta que el pH alcanzó 6 y se almacenaron en etanol al 70 % hasta su uso. Antes de su uso, las monedas se enjuagaron con agua, se aclararon con etanol, se sonicaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se aclararon con agua desionizada. Las monedas de titanio se esterilizaron luego en autoclave a 121 °C durante 15 min.

45 Para la modificación superficial de los implantes de titanio, se disolvió EPA en una solución de metanol 10 mM y 50 mM. Las soluciones de EPA se filtraron con un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm antes de su uso. Se prepararon tres grupos de monedas; monedas no irradiadas y no lavadas (grupo A), monedas no irradiadas y lavadas (grupo B) y monedas irradiadas con luz UV y lavadas (grupo C). En la Tabla 2 y en la Figura 1 se presenta una visión general de los tres diferentes grupos.

Tabla 2: Modificación de los diferentes grupos de monedas utilizados para experimentos *in vitro*.

Grupo	Modificación	Lavado	Cantidad de EPA
A	no irradiada no lavada	-	0 µmol
			0,1 µmol
			0,5 µmol
B	no irradiada lavada	2 x 1 ml de metanol	0 µmol
			0,1 µmol
			0,5 µmol
C	irradiada lavada	2 x 1 ml de metanol	0 µmol
			0,1 µmol
			0,5 µmol

Estos 3 grupos se eligieron para mostrar los efectos de una capa gruesa de EPA no irradiada y por ello físicamente

adsorbida (A), para mostrar el efecto de una capa delgada de EPA no irradiada y por ello físicamente unida (B) y el efecto de una capa delgada de EPA irradiada y por ello químicamente unida (C). Para cada grupo se utilizó como referencia una moneda de Ti cp sin ningún revestimiento superficial con EPA. Si se administraba EPA a la superficie, se usaban 10 μl de la solución de EPA respectiva, lo que equivale a una cantidad de 3,2 nmol de EPA/ mm^2 o 0,99 μg de EPA/ mm^2 para la solución 10 mM y 16,3 nmol de EPA/ mm^2 o 4,93 μg de EPA/ mm^2 para la solución 50 mM. Las monedas se dejaron secar al aire durante 15 minutos en una campana de flujo laminar. Las monedas del grupo C se irradiaron con luz UV durante 30 min (Fluo.link, $\lambda = 312 \text{ nm}$, $I = 6 \text{ mW/cm}^2$). Las monedas del grupo B y C se lavaron con metanol para eliminar el EPA no unido. El Grupo B se lavó después del secado y el grupo C después de la irradiación durante 30 min. Para el lavado, se introdujo 1 ml de metanol en un tubo de microcentrífuga, se añadió la moneda y se agitó en vórtex durante 10 s. Esto se repitió una vez con metanol fresco. Se dejó que las monedas se secaran al aire durante 15 min en la campana de flujo laminar y se usaron inmediatamente para análisis ulterior o cultivo celular.

15 **Perfilometría**

Las superficies de las monedas se visualizaron utilizando el perfilómetro de luz azul PL μ 2300 (Sensofar, Terrassa, España). Las imágenes se tomaron con una ampliación de 50 x y la imagen final consta de 3 x 3 fotos montadas (663 x 497 μm^2). Se tomaron tres imágenes no superpuestas en cada moneda en posiciones aleatorias.

20 **Mediciones del ángulo de contacto**

Los ángulos de contacto (AC) de las superficies de los diferentes implantes de titanio se analizaron utilizando un sistema de ángulo de contacto basado en vídeo (OCA 20, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania). El líquido utilizado fue agua desionizada. Se añadió una gota de 6 μl a la superficie con una velocidad de 0,6 $\mu\text{l s}^{-1}$. La forma de la gota se registró con una cámara (4,17 imágenes s^{-1}) y los ángulos de contacto se midieron después de grabar las imágenes. Las mediciones se realizaron a 22 °C. Se analizaron tres muestras para cada grupo de modificación. Se colocó una gota en cada muestra.

30 **Espectroscopía infrarroja de reflexión difusa por transformada de Fourier (DRIFT)**

Las películas gruesas de lípidos y los cambios causados por la irradiación UV se analizaron con un aparato FTIR Spectrum 100, Perkin Elmer (EE.UU.). Se utilizó la unidad de reflectancia difusa (DRIFT) para registrar los espectros. Una moneda de Ti pulida, limpia, esterilizada, pero no modificada sirvió de referencia. Se añadieron 10 μl de solución de EPA 50 mM a la superficie de una moneda de Ti pulida. Los espectros FTIR se registraron antes y después de la irradiación con luz UV en diferentes puntos de tiempo de irradiación. Los espectros se registraron a partir de 4000 cm^{-1} a 450 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} . Cada espectro fue el resultado de 8 espectros individuales. Los espectros fueron corregidos con el programa Spectrum (Versión 6.1.0) de PerkinElmer.

40 **Cantidad de EPA en las superficies de los implantes**

Con el fin de determinar la cantidad de EPA marcado con ^{14}C sobre las superficies de monedas pulidas en los diferentes grupos, sus superficies se modificaron con 10 μl de una solución de EPA 10 mM que contenía [^{14}C]-EPA. Las monedas no fueron irradiadas o fueron irradiadas durante 30 minutos con luz UV antes del lavado. Se produjeron tres monedas para cada grupo. Cada moneda se transfirió a 5 ml de fluido de centelleo líquido Insta-gel II Plus (Packard, Groningen, Holanda), se incubó durante la noche y luego se midió durante 3 minutos en un contador de centelleo líquido (1500 Tri-Carb Liquid scintillation Analyzer, Packard Instrument Co, EE.UU.).

50 **Cultivos celulares**

Se usó la línea celular de osteoblastos murinos MC3T3-E1 (DSMZ, Braunschweig, Alemania) como modelo in vitro. Las células se cultivaron rutinariamente a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5 % y se mantuvieron en alfa-MEM (PAA Laboratories GmbH, Austria) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (PAA Laboratories GmbH, Austria) y 50 UI de penicilina/ml y 50 μg de estreptomycin/ml (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) Las células se subcultivaron 1:4 antes de alcanzar la confluencia usando PBS (PAA Laboratories GmbH, Austria) y tripsina/EDTA (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Para probar las diferentes modificaciones superficiales de los implantes de titanio con EPA, las monedas se colocaron en una placa de 96 pocillos y se sembraron 10^4 células en cada moneda. El mismo número de células se cultivó en paralelo en plástico en todos los experimentos.

60 **Estudio de viabilidad celular**

La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) se usó como un índice de citotoxicidad en el medio de cultivo. Después de 24 h, los medios de cultivo se recogieron, se centrifugaron a 500 x g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se almacenó a 4 °C. La actividad LDH se determinó espectrofotométricamente de acuerdo con las instrucciones del kit del fabricante (kit de detección de citotoxicidad, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y se presentó en relación con la actividad LDH en el medio de células sembradas en plástico (control bajo, 0 % de muerte celular) y en plástico añadiendo Triton X-100 al 1 % (control alto, muerte celular 100 %), después de restar el valor

de la absorbancia obtenido en el medio de cultivo solo sin células (control de fondo), usando la ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = (\text{valor exp.} - \text{control bajo}) / (\text{control alto} - \text{control bajo}) \times 100$$

5 Estudio de adhesión celular

El número de células unidas a cada moneda se midió usando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, EE.UU.), que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice para la purificación rápida y eficiente del ADN celular total sin extracción orgánica o precipitación con etanol. El sistema de tampón está optimizado para permitir la lisis celular directa seguida por unión selectiva de ADN a la membrana DNeasy. El número de células unidas a los implantes se calculó después de medir la concentración de ADN a 260 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) y teniendo en cuenta que el contenido de ADN en 10^6 células de ratón es de aproximadamente 5,8 µg.

15 Aislamiento de ARN y RT-PCR en tiempo real

El ARN total se aisló usando una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó a 260 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.).

La misma cantidad de ARN total (0,5 µg) de cada muestra se transcribió inversamente a ADNc a 42 °C durante 60 minutos en un volumen final de 40 µl, utilizando el kit iScript cDNA Synthesis (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) que contiene tanto oligo(dT) como hexámeros aleatorios. Cada ADNc se diluyó 1/5 y se congelaron alícuotas (-20 °C) hasta que se llevaron a cabo las reacciones de PCR. La PCR en tiempo real se realizó para dos genes constitutivos: ARN ribosómico 18S (ARNr 18S), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y cinco genes diana: osterix (Osx), fosfatasa alcalina (ALP), colágeno tipo I (col-I), osteocalcina (OC) y sialoproteína ósea (BSP). Las secuencias de cebadores sentido y antisentido fueron las siguientes: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (SEQ ID NO:2) para ARNr 18S; 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' (SEQ ID NO:3) y 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3' (SEQ ID NO:4) para GAPDH; 5'-AGAGCATGACCGATGGATTC-3' (SEQ ID NO:5) y 5'-CCTTCTTGAGGTTGCCAGTC-3' (SEQ ID NO:6) para col-I; 5'-ACTGGCTAGGTGGTGGTCAG-3' (SEQ ID NO:7) y 5'-GGTAGGGAGCTGGGTTAAGG-3' (SEQ ID NO:8) para Osx; 5'-AACCCAGACACAAGCATTCC-3' (SEQ ID NO:9) y 5'-GAGAGCGAAGGGTCAGTCAG-3' (SEQ ID NO:10) para ALP; 5'-CCGGGAGCAGTGTGAGC-TTA-3' (SEQ ID NO:11) y 5'-TAGATGCGTTTGTAGGCGGTC-3' (SEQ ID NO:12) para OC; 5'-GAAAATGGAGACGGCGATAG-3' (SEQ ID NO:13) y 5'-ACCCGAGAGTGTGGAAAGTG-3' (SEQ ID NO:14) para BSP.

La PCR en tiempo real se realizó en el iCycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) utilizando la detección con SYBR Green. Cada reacción contenía 5 µl de ADNc, 500 nM de cebadores específicos sentido y antisentido (para todos, excepto para el colágeno-I que era 300 nM), 12,5 µl de 2X iQ SYBR Green Supermix en un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación consistió en una etapa de preincubación para la desnaturalización del ADNc molde (3 min 95 °C), seguido por 40 ciclos que consistían en una etapa de desnaturalización (15s 95 °C), una etapa de hibridación (15s 60 °C, para todos, excepto para ALP que era 65 °C) y una etapa de extensión (30s 72 °C). Después de cada ciclo, se midió la fluorescencia a 72 °C. Se analizó un control negativo sin molde de ADNc en cada ensayo. Las muestras se realizaron por duplicado.

Las eficiencias en tiempo real se calcularon a partir de las pendientes dadas en el software iCycler usando diluciones en serie, mostrando todas las transcripciones investigadas elevadas tasas de eficiencia de PCR en tiempo real y elevada linealidad ($r > 0,99$) cuando se usaban diferentes concentraciones. Los productos de PCR se sometieron a un análisis de la curva de fusión en el iCycler y posteriormente electroforesis en gel de agarosa/TAE al 2 % para confirmar la especificidad de la amplificación, T_m y el tamaño del amplicón, respectivamente.

Estadística

Todos los datos se presentan como valores medios \pm EEM. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student utilizando el programa SPSS® para Windows, versión 14.0. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0,05$ (indicado como *) y $p < 0,01$ (indicado como **).

Resultados

60 Efecto de la irradiación UV sobre la hidrofobicidad de la superficie

Se examinó el efecto de la irradiación UV sobre el AC de las superficies de TiO₂ para obtener información sobre el tiempo de irradiación que debe aplicarse en los experimentos posteriores. El AC del agua se midió antes de la irradiación y después de un tiempo de irradiación de 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180 y 240 min. El AC medio de las 3 monedas en cada punto de tiempo se muestra en la Figura 2. El AC aumentó durante la irradiación temprana y disminuyó posteriormente. Después de 30 minutos de irradiación, el AC fue menor que el AC inicial para todas las

monedas medidas. Por lo tanto, en los experimentos posteriores se utilizó un tiempo de irradiación de 30 min.

Efecto de la modificación superficial con EPA sobre la rugosidad y la hidrofobicidad

5 Los cambios en la hidrofobicidad superficial causados por la modificación superficial fueron detectados por las mediciones del AC. Los valores del AC para los 3 grupos se dan en la Figura 3.

10 El AC con el agua de las superficies de Ti limpiadas y esterilizadas en autoclave (control A) fue $75,5^\circ \pm 7,0^\circ$. Si se añadía $3,2 \text{ nmol de EPA/mm}^2$ a esas superficies, no se observaban cambios significativos en el AC para las superficies no irradiadas ($73,8^\circ \pm 0,3^\circ$); sin embargo, se midió un AC significativamente mayor de $100,5^\circ \pm 5,5^\circ$ para superficies con $16,3 \text{ nmol de EPA/mm}^2$ adicional.

15 Las superficies sin EPA en el grupo B (control B) tenían un AC de $88,9^\circ \pm 7,5^\circ$, que era mayor comparado con el control A. Las monedas de Ti que fueron recubiertas con EPA y lavadas posteriormente con metanol tenían un AC de $68,6^\circ \pm 9,3^\circ$ y $68,4^\circ \pm 8,2^\circ$ para $3,2 \text{ nmol de EPA/mm}^2$ y $16,3 \text{ nmol de EPA/mm}^2$, respectivamente; un AC que era menor en comparación con la superficie del control B.

20 Como se esperaba de experimentos previos, la irradiación con luz UV durante 30 minutos seguido de lavado con metanol condujo a una ligera disminución del ángulo de contacto superficial hasta $54,5^\circ \pm 2,4^\circ$ (control C) en comparación con el control A. El recubrimiento con EPA, la irradiación durante 30 min y el lavado con metanol condujo a un aumento del AC de $65,8^\circ \pm 5,2^\circ$ para el recubrimiento con $3,2 \text{ nmol de EPA/mm}^2$ y $66,8^\circ \pm 1,5^\circ$ para el recubrimiento con $16,3 \text{ nmol de EPA/mm}^2$, en comparación con el control C.

25 El análisis de las superficies con profilometría láser mostró que los parámetros de rugosidad superficial no cambiaban por irradiación ni por recubrimiento de las superficies con una capa delgada de EPA (es decir, todas las superficies del grupo B y del grupo C y el Control A). La rugosidad media S_a para esas superficies fue de $19 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Sin embargo, el recubrimiento con una capa gruesa de EPA aumentó la S_a hasta $54,2 \text{ nm} \pm 13 \text{ nm}$ cuando se aplicaba $3,2 \text{ nmol de EPA/mm}^2$ a la superficie. Las observaciones profilométricas de las gotas de EPA muestran que el EPA estaba distribuido de manera irregular en las superficies no irradiadas (grupo A) que tenían estructuras de tipo gota de diferentes dimensiones (Figura 4a). Sin embargo, el EPA se distribuía uniformemente sobre toda la superficie después de la irradiación con luz UV durante 30 min (Figura 4b).

Efecto de la irradiación UV sobre el espectro IR del EPA

35 Se utilizaron los cambios en los espectros IR para obtener información sobre cómo la estructura química del EPA cambiaba debido a la irradiación UV. Los espectros de absorbancia para el EPA no irradiado y el EPA que fue irradiado con luz UV durante 30 min se dan en la Figura 5. De especial interés son los cambios en la región $-3680-2900 \text{ cm}^{-1}$ (1 en la Figura 5), los cambios de los picos $1850-1550 \text{ cm}^{-1}$ (2-4 en la Figura 5) y los cambios de algunas absorbancias en la región de la huella dactilar (5-8 en la Figura 5).

40 El pico 1 a $3680 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ no se observó en el espectro del EPA no irradiado pero sí aparece en el espectro del EPA que se irradió durante 30 min. El pico en la región $1850-1550 \text{ cm}^{-1}$ parece ser el resultado de tres absorbancias. Dos de estas tres absorbancias cambiaron su posición o cambiaron ligeramente su intensidad debido a la irradiación. El pico 2 con un máximo de -1730 cm^{-1} era solo un hombro de intensidad media en la muestra no irradiada. Sin embargo, su intensidad se incrementó después de la irradiación durante 30 minutos con luz UV, lo que condujo al ensanchamiento del pico aparente. El Pico 3, con un máximo a -1713 cm^{-1} fue muy fuerte tanto antes como después de la irradiación con luz UV. Ni la intensidad ni la posición de esta absorción cambiaron. En tercer lugar, se observó un pico de intensidad débil a media con un máximo a -1650 cm^{-1} en el espectro de absorbancia del EPA no irradiado, en la Figura 5 denominado pico 4. Este pico no fue visible como un pico definido después de la irradiación, pero contribuyó al aspecto ensanchado del pico 3.

50 Se detectaron muchas diferencias en los espectros de absorbancia del EPA no irradiado e irradiado en la región de la huella dactilar de los espectros. Las más destacadas fueron el aumento de las intensidades a 1170 cm^{-1} (Pico 5) y 1070 cm^{-1} (Pico 6) después de la irradiación UV, el aumento de la absorbancia a -970 cm^{-1} (Pico 7) y la disminución de la absorbancia a 710 cm^{-1} (Pico 8).

Cantidad de EPA en las superficies de los implantes

60 Se usó el recuento de centelleo de EPA marcado con ^{14}C para cuantificar la cantidad de EPA en las superficies de Ti y para investigar la eficacia de la luz UV para unirse químicamente al EPA (Figura 6). Los resultados muestran que después del primer lavado en metanol, la cantidad de EPA disminuyó al mismo nivel tanto para las monedas no irradiadas como para las irradiadas. Después del segundo lavado en metanol, el EPA estaba todavía presente en monedas no irradiadas e irradiadas, pero había significativamente más EPA en las superficies irradiadas en comparación con las superficies no irradiadas.

65

Adhesión de células a las superficies de los implantes

El número de células MC3T3-E1 adheridas a los implantes se cuantificó midiendo el contenido de ADN (Figura 7). No se detectaron diferencias significativas en la cantidad de ADN entre las 3 modificaciones del grupo A y del grupo B. La cantidad relativa de células presentes en las superficies del grupo C que no contenía EPA era ligeramente inferior en comparación con las superficies de Ti puras del grupo A. Sin embargo, la cantidad relativa de células en las superficies del grupo C recubiertas con 3,2 nmol de EPA/mm² y con 16,3 nmol de EPA/mm² era significativamente mayor en comparación con el control del grupo C (p=0,002 y p=0,003, respectivamente) y también significativamente mayor en comparación con el control en el grupo A (p=0,004 y p=0,009 para las superficies recubiertas con 3,2 nmol de EPA/mm² o 16,3 nmol de EPA/mm², respectivamente). La cantidad de células fue más alta en las superficies recubiertas con 3,2 nmol de EPA/mm².

Efecto de la modificación superficial con EPA en la viabilidad celular

Para determinar si diferentes modificaciones de la superficie con EPA podrían afectar a la supervivencia de los osteoblastos, la actividad de LDH se midió después de 24 h de cultivo (Figura 8). Los resultados mostraron un aumento significativo en la actividad LDH solo en el grupo A con implantes que tenían una capa gruesa de EPA en sus superficies, mientras que las capas delgadas de EPA físicamente o químicamente unido no eran tóxicas para las células.

Discusión

En este estudio comparamos diferentes métodos para cubrir las superficies del implante de Ti con EPA por adsorción física y unión covalente usando luz UV. Hemos demostrado que la luz UV es un método adecuado para generar sitios de unión reactivos sobre el TiO₂ y dentro de la estructura de las moléculas de EPA. Además, los ensayos in vitro mostraron que los implantes con EPA unido por luz UV eran capaces de mejorar la adhesión celular de células MC3T3-E1.

Las superficies del implante están expuestas a fuertes fuerzas de fricción durante el implante; por lo tanto, para ser clínicamente adecuado, un recubrimiento superficial debe ser delgado y firme para soportar altas fuerzas de abrasión. Por lo tanto, un recubrimiento superficial covalente podría ser una opción interesante. Tal capa delgada de moléculas unidas covalentemente puede cambiar las propiedades superficiales del material, tales como la hidrofobicidad, el pH cercano a la superficie y la estructura de la capa acuosa adyacente. Esas propiedades influyen fuertemente en la interacción entre las biomoléculas y las superficies poco después de la implantación y pueden facilitar así la unión y diferenciación de los osteoblastos, lo que mejoraría el rendimiento de los implantes.

Las superficies de TiO₂ se hicieron anfífilas por irradiación con luz UV durante 30 min, lo cual concordaba con los hallazgos previos 29. Las mediciones del AC con el agua mostraron una mayor hidrofiliidad después de una disminución inicial. La disminución de la hidrofiliidad después de 15 minutos de irradiación con luz UV aún no se ha descrito en la literatura y podría explicarse por la contaminación de las superficies con carbono, un aumento en el espesor de la capa de oxígeno o ligeros cambios en la rugosidad superficial no trazables por profilometría. Las imágenes perfilométricas mostraron que las gotas de EPA se extendían sobre las superficies de TiO₂ después de la irradiación UV durante 30 min, lo que indica un aumento de la lipofiliidad de las superficies de TiO₂. Estos resultados mostraron que 30 min era un tiempo apropiado para la irradiación superficial con luz UV ya que el EPA, el cual se distribuía de manera desigual sobre las superficies de TiO₂ antes de la irradiación, estaba cubriendo toda la superficie de la muestra después de 30 minutos de irradiación UV.

El AC de la superficie depende de la química y de la rugosidad de las superficies. Dado que la rugosidad superficial media S_a no cambió debido a la irradiación UV, el recubrimiento de las superficies con EPA y el posterior lavado con metanol (como en el grupo B y C), todos los cambios de los ángulos de contacto de la superficie medidos para estos grupos fueron debidos probablemente a cambios en la química superficial. Las moléculas de EPA son hidrófobas y las capas delgadas de EPA aumentaban así el AC del agua de las superficies. Las capas gruesas de EPA (3,2 nmol EPA/mm² y 16,3 nmol de EPA/mm² en el grupo A) dieron como resultado superficies blandas pero más rugosas donde el EPA estaba distribuido de manera desigual. Las moléculas de EPA se disolvieron en agua en pequeñas cantidades, lo que disminuyó la tensión superficial del agua utilizada para las mediciones y disminuyó con ello la AC resultante. Los disolventes de limpieza como el metanol dejan una fina capa de residuos carbonáceos en las superficies (Brunette et al., 2001). Se ha observado que un mayor contenido de carbono en las superficies metálicas aumenta la hidrofobicidad de las superficies (Hirani et al., 2007). Esto explica el aumento del AC para el control en el grupo B que se lavó con metanol.

La hidrofiliidad comparativamente más alta de las monedas revestidas superficialmente en el grupo B de acuerdo con la cantidad de ¹⁴C-EPA medida en esas superficies indicó que después de lavar con metanol, quedaba una capa delgada de EPA adsorbido físicamente. La disminución de la hidrofiliidad de las superficies revestidas con EPA en comparación con su control y junto con el recuento de centelleo de las superficies revestidas con ¹⁴C-EPA indicó que después de la irradiación UV quedaba una capa delgada de EPA unido covalentemente en las superficies.

El análisis de los espectros FTIR mostró los cambios que ocurrieron en la estructura del EPA por irradiación con luz UV. La absorbancia en la región de 3680-2900 cm^{-1} estaba fuertemente relacionada con la aparición de grupos hidróxido (-OH), así como con la generación de grupos peróxido (-OO-) y peroxiácido (-CO-OOH) (Socrates et al., 2001) causada por irradiación UV. La absorbancia a 1730 cm^{-1} estaba causada por la vibración de estiramiento C=O de los ésteres (Socrates et al., 2001). El aumento del pico de éster indicó la formación de grupos éster, pero también la aparición de grupos peréster (CO-O-O-) después de la irradiación con luz UV (Socrates et al., 2001). La absorbancia a 1713 cm^{-1} fue causada por vibraciones de estiramiento C=O de grupos ácido carboxílico y no cambió en intensidad o posición (Guillén et al., 1997).

La absorbancia con una intensidad máxima de 1650 cm^{-1} se asoció con vibraciones de estiramiento de los enlaces C=C y sus cambios en los espectros indicaron la aparición de enlaces dobles trans causados por la irradiación UV (Socrates et al., 2001). El aumento de la absorbancia a 1170 cm^{-1} y 1070 cm^{-1} mostró de nuevo la generación de grupos éster (extensión CO-O-C asimétrica y simétrica, respectivamente) por irradiación UV (Socrates et al., 2001). El aumento de la absorbancia a 970 cm^{-1} junto con una reducción de la absorbancia a 710 cm^{-1} indicó la transformación de dobles enlaces C=C cis en dobles enlaces C=C trans causada por la irradiación UV (Socrates et al., 2001). En conjunto, los grupos reactivos, es decir, los óxidos y sus radicales, los peróxidos y sus radicales, los peroxiácidos y perésteres se generaron dentro de la estructura del EPA por irradiación con luz UV. El EPA es susceptible a autooxidación y fotooxidación debido a insaturaciones en la estructura. Especialmente la luz UV de alta energía conduce a la oxidación y generación de grupos de óxido reactivos (Guillén et al., 1997, Cheng et al., 2003, Melø et al., 1988). La fotooxidación del EPA puede cambiar la estructura química de las moléculas de varias maneras. Una posibilidad es la formación de grupos óxido a través de radicales peróxido y peróxidos en la posición 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17 o 18, junto con la formación de dobles enlaces trans en las posiciones respectivas (Chacon et al. Al., 2000). Otra forma es la degradación del EPA a través de radicales óxido que se forman en las mismas posiciones que para la primera posibilidad, seguida de fragmentación en aldehídos y la formación subsiguiente de ácidos carboxílicos y ácidos dicarboxílicos (Rontani et al., 1998) o aldehídos tales como malondialdehído, el producto final volátil de la oxidación de ácidos grasos al que se asoció con efectos negativos sobre el metabolismo celular, por ejemplo, por la reacción de proteínas in vivo (Refsgaard et al., 2000). Se describió que el EPA protege la piel de los ratones in vivo contra la irradiación UV y, por tanto, protege contra la fotocarcinogénesis (Moison et al., 2001). Esos grupos reactivos pueden haber causado la reducción de grupos hidróxido y la generación de radicales grupos óxido sobre las superficies de TiO_2 . Se plantea la hipótesis de que parte de los peróxidos del EPA o sus productos de descomposición que fueron generados por irradiación UV se unan covalentemente a las superficies de TiO_2 a través de enlaces éster, peréster, peróxido y éter (Figura 9).

Las mediciones de la cantidad de EPA marcado con ^{14}C en superficies mostraron que una cantidad medible de ^{14}C -EPA quedaba sobre las superficies tanto no irradiadas como irradiadas. Sin embargo, la diferencia significativa en las señales de ^{14}C medidas indicó que el recubrimiento superficial irradiado era más estable frente a un lavado exhaustivo que el recubrimiento sobre superficies no irradiadas. La película de ácido graso sobre superficies irradiadas puede consistir en una combinación de EPA y productos de fotooxidación del EPA unidos químicamente y físicamente. Los datos no apoyan ninguna especulación acerca de cómo se estructura la capa de EPA o sobre cómo el EPA irradiado con UV se une exactamente a la superficie. La rugosidad de la superficie de las muestras de Ti cp pulidas impidió el análisis detallado de la estructura de recubrimiento con, por ejemplo, reflectometría de rayos X de incidencia rasante, rayos X de incidencia rasante, donde se requiere un S_a no superior a 1 nm; tal rugosidad superficial baja podría, por ejemplo, obtenerse pulverizando una fina capa de Ti sobre las superficies de Si lisas (Kim et al., 2004).

Las mediciones de los valores de LDH y la cantidad de ADN en las superficies mostraron que grandes cantidades de EPA (3,2 nmol EPA/ mm^2 y 16,3 nmol de EPA/ mm^2 en el grupo A) tuvieron un efecto tóxico sobre las células, mientras que pequeñas cantidades de EPA unido físicamente (grupo B) no tuvieron efecto tóxico aunque un efecto significativo sobre la adhesión celular. El efecto tóxico de altas dosis de EPA sobre la viabilidad celular ha sido descrito en otras líneas celulares y está de acuerdo con los resultados del presente estudio.

El EPA unido químicamente en el grupo C tuvo un efecto positivo sobre la adhesión celular y se demostró que no era tóxico. Por lo tanto, se puede sugerir que el EPA podría haber afectado a la adhesión celular, a pesar de que estaba químicamente unido a las superficies y por lo tanto no estaba directamente disponible para las células. Las superficies recubiertas con EPA pueden haber cambiado las características de la capa de proteína fácilmente adsorbida sobre las superficies de las muestras cuando están en contacto con medios que contienen proteínas. La dependencia de la adsorción de proteínas y células de las modificaciones superficiales también ha sido examinada por otros grupos (Kim et al., 2005, Cooper et al., 2001, Svedhem et al., 2003, Iwasaki et al., 2003, Willumeit et al., 2007). Se ha descrito que los lípidos autooxidados y fotooxidados tienen efectos negativos sobre las células si se ingieren, ya que los peróxidos y los productos finales de la fotooxidación (tales como malondialdehído, 4-hidroxi-alquenos) generan radicales óxido que a su vez causan daño al ADN y a las proteínas (Refsgaard et al., 2000, Cheung et al., 2007). Por otra parte, los epóxidos de AA, otro eicosanoide, han demostrado tener importantes funciones biológicas (Capdevila et al., 2000). El EPA, al igual que el AA, es propenso a la autooxidación y la fotooxidación en el aire debido a sus insaturaciones en la cadena de carbono; por lo tanto, los resultados de los ensayos in vitro, que mostraron un efecto positivo del recubrimiento por irradiación, son de interés y se investigarán adicionalmente en ensayos in vitro a largo plazo y en estudios in vivo. En estudios posteriores se podría probar un

método de recubrimiento donde las superficies de Ti solas se activan con irradiación UV y el EPA se administra a las superficies posteriormente. Con esto se puede reducir la alteración de las moléculas de ácido graso y comparar los resultados con la presente investigación.

5 Ejemplo 3

Experimentos realizados *in vivo* con implantes de titanio que contienen una dosis alta de EPA adsorbido físicamente y una dosis baja de EPA unido químicamente.

10 Materiales y métodos

Monedas de titanio

Los implantes de titanio mecanizados comercialmente puros (cp) con un diámetro de 6,25 mm y una altura de 1,95 mm se limpiaron y esterilizaron antes de su uso. En resumen, los implantes se lavaron juntos en un vaso de precipitados de vidrio con agua desionizada durante 30 s, luego con etanol al 70 % durante 30 s y después con baño de ultrasonidos a 40 °C durante 5 min en agua desionizada. Los implantes se colocaron posteriormente en solución de NaOH al 40 % en un baño de agua a 40 °C durante 10 min, se sometieron a ultrasonidos en agua desionizada durante 5 min y después se lavaron con agua desionizada hasta que el pH alcanzó 6. Posteriormente, los implantes se sonicaron en agua desionizada a 50 °C durante 5 min, se colocaron en una solución de HNO₃ al 50 % a 50 °C durante 10 min y se sonicaron en agua desionizada durante otros 5 min. Los implantes se lavaron con agua desionizada hasta alcanzar pH = 6 y se conservaron en etanol al 70 %. Antes de su uso, las monedas se enjuagaron con agua, se aclararon con etanol, se sonicaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se enjuagaron con agua desionizada. Las monedas de titanio se esterilizaron después en el autoclave a 121 °C durante 15 min.

25

Preparación de implantes

Para la modificación superficial de los implantes de titanio, se disolvió EPA en una solución de metanol 10 mM. La solución de EPA se filtró con un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm para esterilizarlo antes de su uso. Se prepararon cuatro grupos de monedas; monedas no irradiadas y no lavadas (control), monedas con dosis altas de EPA (EPA), monedas irradiadas con luz UV (UV) y monedas con dosis bajas de EPA después de irradiación UV y lavado (UV + EPA). Cuando se aplicaba EPA a la superficie, se usó 10 µl de la respectiva solución de EPA 10 mM, lo que equivale a un total de 3,2 nmol de EPA/mm². Las monedas se dejaron secar al aire durante 15 minutos en una campana de flujo laminar (los cuatro grupos de monedas). Las monedas de los grupos UV y UV-EPA se irradiaron a continuación con luz UV durante 30 minutos (Fluo.link, λ = 312 nm, I = 6 mW/cm²). Estos últimos grupos de monedas (grupos UV y UV-EPA) se lavaron después con metanol para eliminar el EPA no unido y para seguir el mismo procedimiento para las monedas de control irradiadas con UV y sin EPA. Las monedas se dejaron secar al aire durante 15 minutos en la campana de flujo laminar y se envasaron en tubos de microcentrífuga estériles.

40 Materiales y métodos para el análisis XPS

Se usó un aparato Kratos Axis Ultra DLD XPS (Kratos, Manchester, Reino Unido) para realizar el análisis superficial de las superficies de los implantes modificados. Se utilizaron rayos X monocromáticos Al Kα con una corriente de 10 mA y una tensión de 15 kV. Se analizó un área de 300 x 700 µm² en una muestra por cada grupo, con una energía de paso de 80,0 eV para los espectros generales y 20,0 eV para las exploraciones elementales de resolución de alta energía de Ti 2p, C 1 s, O 1 s y N 1 s. Las áreas de los picos se calcularon con el programa CasaXPS 3.2.12. La escala de energía de enlace se calibró asignando el pico de hidrocarburo a una energía de enlace de 284,8 eV. El fondo de Shirley se usó para cuantificar los espectros generales y se usaron fondos de Shirley y lineales mezclados para la cuantificación de las exploraciones elementales detalladas.

50

Estudio en animales y análisis de extracción

En este estudio se utilizaron seis conejos hembra New Zealand White de 6 meses de edad y un peso de 3,0-3,5 kg (ESF ProdukterEstuna AB, Norrtälje, Suecia).

55

Los implantes con dosificación alta de EPA (n=6) y sus controles (n=6) y los implantes con una dosificación baja de EPA unido químicamente después de la irradiación con luz UV (n=6) y sus controles irradiados con luz UV (n=6) se colocaron en defectos óseos corticales calibrados en la tibia de los conejos (New Zealand White). Los métodos utilizados fueron todos de acuerdo con un modelo normalizado y validado establecido para el estudio de la adhesión ósea a las superficies de implante de titanio (Rønold y Ellingsen, 2002). Cada conejo recibió cuatro implantes, dos en cada hueso de la tibia. La ubicación de los implantes de prueba y control fue aleatoria y el operador actuó siguiendo un protocolo enmascarado. A las 10 semanas después de la implantación se sacrificaron los conejos y se extirparon los huesos de la tibia con los implantes unidos. Directamente después de extirpar el hueso de la tibia se fijó en una plantilla especialmente diseñada y los implantes se separaron utilizando un procedimiento de extracción calibrado. La carga se aplicó hasta el aflojamiento del implante y se registró en un gráfico de carga frente a tiempo. El hueso tibial restante se utilizó para estudiar la densidad mineral ósea volumétrica (DMOV) utilizando tomografía

65

micro-computarizada (micro-TC). El líquido de la herida se recogió del sitio del implante después de la eliminación de los implantes para determinar la actividad LDH, ALP y proteína total. Los implantes se transfirieron directamente a un tubo estéril y se procesaron para la extracción de ARN, para el análisis de expresión génica de marcadores inflamatorios y óseos.

5

Análisis de microtomografía

La tibia se fijó en formaldehído tamponado neutro al 4 % y luego se mantuvo en etanol al 70 %. Las muestras de hueso se escanearon con un escáner de micro-CT de escritorio disponible comercialmente. Se estudió la densidad mineral ósea en el hueso cortical por debajo del implante después de la extracción del implante, para estudiar los cambios ocurridos en la mineralización en el hueso periimplantario, desde hueso nuevo (menor en DMOv) hasta hueso más maduro (mayor en DMOv).

10

Análisis del líquido de la herida: actividad LDH, actividad ALP y proteína total

15

La actividad LDH y la proteína total se analizaron en el fluido de la herida recogido del sitio del implante después de un período de cicatrización de 10 semanas. La liberación de LDH es un marcador sensible para la necrosis tisular (Williams et al., 1983) y, por tanto, la biocompatibilidad de los implantes. Se ha propuesto que la actividad de ALP desempeña un papel importante en el inicio del proceso de mineralización alrededor de los implantes de titanio. La cantidad de proteína total se usó para indicar la cantidad de líquido de la herida presente en la interfase con los implantes y para correlacionar con la fuerza de adhesión entre hueso e implante.

20

Expresión génica in vivo de marcadores inflamatorios y óseos: IL-6, osteocalcina y TRAP

La expresión génica de IL-6, osteocalcina y TRAP se estudió mediante RT-PCR en tiempo real como una indicación de inflamación (IL-6), formación de hueso (osteocalcina) o resorción ósea (TRAP) en el tejido óseo periimplantario adherido a la superficie de los diferentes grupos de implantes.

25

Conclusión

30

Las composiciones elementales de las superficies se calcularon a partir de los espectros generales de la muestra respectiva y se dan en la Tabla 3. El contenido de C aumentó con la adición de EPA a las superficies, mientras que las señales de Ti disminuyeron para esas muestras, lo que indica que después del lavado quedaba una capa delgada de EPA sobre las superficies. El espectro general mostró también una clara reducción de la señal de N después de la irradiación con luz UV. El N y varios contaminantes tales como Na, Zn, Mg y Si se detectaron en trazas, probablemente debido a contaminaciones superficiales del aire. Los espectros detallados revelaron más detalles sobre los estados de enlace de los elementos (para C1s véase la Tabla 4 y para O1s véase la Tabla 5). Hasta 4 picos (3 para Control, UV y EPA) se ajustaron en el espectro detallado de C1 s. Las señales C-C y C-H se detectaron a una EE (energía de enlace) de 284,8 eV (Han et al., 2008; Viornery et al., 2002). La intensidad de esta señal disminuyó ligeramente para la superficie del EPA, y más claramente para la superficie UV + EPA. La intensidad de la señal C-O para una EE = 285,8 eV (Han et al., 2008; Viornery et al., 2002) se mantuvo aproximadamente similar en todas las superficies analizadas. Solo se detectó una señal para los estados de enlace C=O a 287,9 eV [22] para las superficies del grupo UV + EPA. La señal asignada a -O-C=O a 288,8 eV (Han et al., 2008; Viornery et al., 2002) era baja en las superficies de control, aumentó para todas las otras superficies y fue la más alta para las superficies UV + EPA. Hasta 5 picos (4 picos de control y UV) se ajustaron en el espectro detallado de O1s. La señal de TiO₂ fue asignada una EE = 529,9 eV (Viornery et al., 2002; Lu et al., 2000). Se redujo para la superficie de EPA e incluso fue menor para la superficie UV + EPA. TiO y TiOH dieron una señal para la misma EE; 531.2 eV (Viornery et al., 2002; Lu et al., 2000). Se incrementó ligeramente para la superficie del grupo UV y fue aproximadamente 2 veces más para la superficie del grupo UV + EPA. El porcentaje del pico para C-O, C=O y C-OH a 532,4 eV (Viornery et al., 2002) se redujo ligeramente en las superficies UV en comparación con el control, aumentó en las superficies EPA y disminuyó en las superficies UV + EPA en comparación con el control. El O que estaba unido en combinaciones que contenían -O-C=O se ajustó a 533,7 (Beamson et al., 1992). Esta variación estuvo presente solo en superficies de EPA y UV + EPA.

40

45

50

55 Tabla 3: Resultados del análisis elemental de los espectros generales XPS sobre las superficies de implante modificadas de forma diferente.

Muestra	Composición elemental [en %]				
	C	O	Ti	N	Contaminantes
Control	52,2	31,8	12,6	1,4	2,1
EPA	60,4	27,4	7,2	1	3,8
UV	46,5	35,2	13,5	ND	4,8
UV + EPA	62,6	28,3	6,3	ND	2,8
ND – No detectado					

Tabla 4: Porcentaje de área para los picos ajustados en los espectros detallados de los picos C1s.
Porcentaje de áreas de los picos deconvolucionados

Muestra	Energía de enlace [eV]	284,8 eV	285,8 eV	287,9 eV	288,8 eV
	Posibles estados de enlace	C-C / C-H	C-O	C=O	-O-C=O
Control		71,3	26,5	ND	2,2
EPA		69,2	25,8	ND	5,0
UV		71,4	24,3	ND	4,3
UV + EPA		66,8	25,0	2,9	5,4

Tabla 5: Porcentaje de área para los picos ajustados en los espectros detallados de los picos O1s.
Porcentaje de áreas de los picos deconvolucionados

Muestra	Energía de enlace [eV]	529,8 eV	531,2 eV	532,4 eV	533,8 eV
	Posibles estados de enlace	TiO ₂	TiO / TiOH	C-O / C=O / C-OH	-O-C=O
Control	61,7	23,1	15,2	ND	
EPA	47,4	19,5	26,0	7,1	
UV	59,0	28,1	12,9	ND	
UV + EPA	36,8	47,4	7,9	7,8	

5 Los implantes recubiertos con una dosificación baja de EPA unidos químicamente después de la irradiación con luz UV y sus controles irradiados con luz UV mostraron una adhesión inferior al hueso cortical. Se observó una DMOV inferior del hueso cortical en ambos tipos de implantes, lo que podría estar relacionado con las diferencias en las propiedades biomecánicas del hueso cortical periimplantario encontrado con los valores de extracción. La cantidad de proteína total en el líquido de la herida, mayor en los implantes recubiertos con una dosis baja de EPA unido químicamente después de la irradiación con luz UV y sus controles irradiados con luz UV, también podría estar relacionada con sus valores de extracción más bajos. No se observaron diferencias en la actividad LDH (biocompatibilidad) con los cuatro grupos diferentes de implantes, pero se observó un aumento en la expresión génica del marcador inflamatorio IL-6 en el grupo de implantes con altas dosis de EPA. No se encontraron diferencias en la expresión génica de TRAP, lo que sugiere que la resorción ósea no se veía afectada de manera diferente con los implantes probados. Los implantes recubiertos con una dosificación baja de EPA unido químicamente después de la irradiación con luz UV y sus controles irradiados con luz UV mostraron una expresión más alta del marcador pro-osteogénico osteocalcina y una actividad ALP más alta, lo que indicando que la actividad osteoblástica y la formación ósea en curso había aumentado en estas muestras. Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 10-17.

20 Ejemplo 4

Se revistieron superficies de titanio (Ti) con dos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-3 diferentes, sin y en combinación con α -tocoferol (vitamina E) para analizar las propiedades antioxidantes del α -tocoferol en los PUFAs durante la irradiación UV. El α -tocoferol es una sustancia que las autoridades consideran segura como aditivo alimentario. El α -tocoferol ha demostrado tener efectos anti-inflamatorios in vitro Inhibiendo la liberación de IL-1 β a partir de monocitos. Al mismo tiempo, se observó una disminución en la adhesión celular (Reno et al, 2005). Se planteó la hipótesis de que el recubrimiento de las superficies de Ti con PUFAs en combinación con α -tocoferol podría prevenir la oxidación de PUFA y dar lugar a una superficie Ti con propiedades mejoradas.

30 Materiales y métodos

Las sustancias de recubrimiento se adquirieron en Sigma-Aldrich con el grado más alto de pureza disponible. Se recubrieron superficies de discos de Ti (c.p. grado IV), de 6,25 mm de diámetro, con diferentes sustancias y mezclas de las mismas. Las superficies se secaron al aire y posteriormente se irradiaron con luz UV ($\lambda = 302$ nm, P=6 W, distancia a las superficies 43 mm, lámpara comprada en VWR, Oslo, Noruega). Las muestras se analizaron con espectroscopía FTIR (DRIFT) después de 0 min, 15 min, 30 min y 60 min de irradiación. Un disco de Ti igualmente irradiado, no recubierto se utilizó como fondo para las mediciones FTIR. Se aplicaron mezclas a los implantes y se irradiaron durante 0 min, 15 min, 30 min y 60 min. Los espectros obtenidos por espectroscopía FTIR se analizaron para determinar las absorbancias típicas relacionadas con la fotooxidación de los recubrimientos superficiales. Las áreas de los picos típicas fueron cuantificadas y se comparan y describen en este documento.

Las sustancias utilizadas como recubrimiento fueron:

- 5 EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5, n-3); 10 µl de solución 50 mM en etanol
 DHA (ácido docosahexaenoico, 22:6, n-3); 10 µl de solución 50 mM en etanol
 EPA + DHA; 1:1 - 10 µl en total
 α-tocoferol; 10 µl de solución 50 mM en etanol
 EPA + α-tocoferol; 1:1 - 10 µl en total
 DHA + α-tocoferol; 1:1 - 10 µl en total
 EPA + DHA + α-tocoferol; 1:1:1 - 10 µl en total

10 La presentación de los resultados del análisis se organiza de la siguiente manera:

- 15 1. Irradiación UV de los PUFAs n-3 EPA, DHA y EPA + DHA
 2. Irradiación UV del α-tocoferol
 3. Combinación de α-tocoferol y los PUFAs n-3

1. Irradiación UV de los PUFA n-3 EPA, DHA y EPA + DHA

20 Las absorbancias más importantes que mostraron cambios en la estructura química de los PUFAs n-3 debido a la irradiación UV se dan en la siguiente tabla (Tabla 6):

Tabla 6: Cambios importantes de absorbancias en espectroscopia FTIR para los PUFAs

Número de onda (absorbancia máxima)	Grupo	Cambios causados por la irradiación UV
3300 cm ⁻¹	-OH	aumento
1710 cm ⁻¹	C=O	aumento
1065 cm ⁻¹	CO-O-C	cambio
974 cm ⁻¹	C=C trans	aspecto y aumento
710 cm ⁻¹	C=C cis	disminución

25 La Figura 18 muestra cómo están cambiando las absorbancias mencionadas. Los valores mostrados se calculan a partir de las áreas de los picos de absorbancia y se dan como % en comparación con la muestra no irradiada. Muy interesantes son las tendencias opuestas de las absorbancias de C=C cis y C=C trans, que indican la formación de ácidos grasos trans a partir de ácidos grasos cis. Se observó oxidación causada por irradiación UV.

2. Irradiación UV del α-tocoferol

30 La química del proceso de oxidación del α-tocoferol fue descrita por Wang X, 1999: TOH → TO[•] (α-tocoferol → α-tocoferoxiloxil) y Yamauchi R, 2002 (ver Fig. 19):

Según estas fuentes, las absorbancias siguientes son de interés, ya que podrían estar cambiando durante la irradiación UV (Tabla 7):

35

Número de onda (absorbancia máxima)	Grupo	Cambios causados por la irradiación UV
1676 cm ⁻¹ , 1646 cm ⁻¹	Quinonas	aspecto/aumento
1620 cm ⁻¹	C=C aromático	aumento
1250 cm ⁻¹	C-O de epóxidos	aspecto/aumento

40 Como se puede ver en la Figura 20, las absorbancias de quinonas se incrementaron durante la irradiación con UV, mientras que las áreas de absorbancia para los epóxidos no cambiaron, indicando que no se formaron epóxidos a partir de α-tocoferol durante la irradiación con UV, sino quinonas como α-tocoferilquinona. La absorbancia de los grupos aromáticos C = C disminuyó durante la irradiación UV, lo que indica que esos enlaces se redujeron por fotooxidación.

3. Combinación de α-tocoferol y los PUFAs n-3

45 Se ensayó la adición de α-tocoferol a EPA, DHA y EPA + DHA. La Figura 21 muestra los cambios de las áreas de los picos de las absorbancias características para los promedios de las áreas de los picos de EPA y DHA con α-tocoferol. Los cambios de las áreas de los picos con el tiempo de irradiación UV fueron muy leves comparados con los cambios de las áreas de los picos para los PUFAs solos, lo que indica un efecto protector del α-tocoferol.

50

El efecto antioxidante del α -tocoferol dependía de la cantidad de α -tocoferol añadido, como se pudo demostrar, por ejemplo, en el ejemplo de las absorbancias de OH a 3300 cm^{-1} (Figura 22). El aumento del área del pico fue mucho más pronunciado para los PUFAs solos comparado con mezclas 1:1 con 50 % de α -tocoferol (EPA + α -tocoferol, DHA + α -tocoferol) o mezclas 1:1:1 (EPA + DHA + α -tocoferol, 33 % en moles de α -tocoferol).

5

Conclusión

Se demostró que la irradiación UV cambiaba la estructura molecular de los PUFAs fotosensibles tales como EPA y DHA de una manera similar. En cuanto a un proceso típico de fotooxidación, las intensidades de absorbancia aumentaron para los grupos OH, CO-O-C, C=O y C=C trans, mientras que la intensidad de absorbancia disminuyó para el grupo C=C cis. El α -tocoferol parecía estar menos afectado por la irradiación UV hasta 1 h, solo se observó la aparición de una débil absorbancia de quinona. Esto está de acuerdo con una vía de oxidación propuesta por Yamauchi et al. La adición de α -tocoferol a los PUFAs en 2 concentraciones diferentes indicó un efecto protector dependiente de la concentración del α -tocoferol.

10

Ejemplo 5

El 7-dehidrocolesterol (7-DHC, provitamina D₃) se convierte en colecalciferol (vitamina D₃) a través de la previtamina D₃ en la piel humana. La conversión adicional a 25(OH)D₃ ocurre principalmente en el hígado, pero dado que la enzima hidroxilasa CYP27A1 se expresa de forma ubicua en otros tejidos, el sistema para la producción local también puede estar disponible en el hueso (Aiba I et al., 2006). También se ha demostrado que la 1 α ,25(OH)₂D₃ se sintetiza localmente en el hueso a partir de 25(OH)D₃ (Ichikawa et al., 1995, Atkins et al., 2007). Una representación esquemática de la conversión se puede encontrar como la Figura 23. La 1 α ,25(OH)₂D₃ es la forma activa biológica de la vitamina D₃ y actúa como una hormona para regular los niveles séricos de calcio y fosfato y es un factor importante durante el crecimiento y la mineralización óseos (St-Arnaud R, 2008). Por lo tanto, la adición de 7-DHC como un recubrimiento de superficie a implantes de titanio irradiados con luz UV, con o sin PUFA, podría afectar positivamente a la curación ósea.

15

20

25

Las superficies de titanio (Ti) se recubrieron con 7-DHC o con colecalciferol para analizar su transición iniciada por luz UV. Nuestro objetivo era determinar hasta qué punto era específica la conversión iniciada por la irradiación UV de 7-DHC en colecalciferol y qué tiempo de irradiación sería el más adecuado. Además, las superficies se recubrieron con una mezcla de EPA

30

(que representa un PUFA n-3) y 7-DHC para analizar posibles interacciones entre las 2 sustancias durante la irradiación UV.

35

Materiales y métodos:

El EPA, el 7-DHC y el colecalciferol se adquirieron en Sigma-Aldrich con el grado más alto de pureza disponible. Las superficies de discos de Ti (c.p. grado IV), de 6,25 mm de diámetro, se recubrieron con 7-DHC o con colecalciferol o con una mezcla de 7-DHC + EPA (1:1). Las superficies se secaron al aire y posteriormente se irradiaron con luz UV ($\lambda = 302\text{ nm}$, $P = 6\text{ W}$, distancia a las superficies 43 mm, lámpara adquirida en VWR, Oslo, Noruega). Las muestras se analizaron con espectroscopia FTIR (DRIFT) después de 0 min, 15 min, 30 min y 60 min de irradiación. Un disco de Ti igualmente irradiado, no recubierto se utilizó como fondo para las mediciones FTIR. Los espectros obtenidos por espectroscopia FTIR se analizaron para determinar las absorbancias típicas relacionadas con la fotooxidación de los recubrimientos superficiales. Las áreas de los picos típicas fueron cuantificadas en la medida de lo posible y se comparan y discuten en este documento.

40

45

Resultados

50

Las absorbancias más importantes que mostraron cambios en la estructura química del 7-DHC y del colecalciferol debido a la irradiación UV se dan en la siguiente tabla (Tabla 8):

Tabla 8: Cambios importantes de absorbancias en espectroscopia FTIR para el 7-DHC y el colecalciferol

Número de onda (absorbancia máxima)	Grupo	Cambios causados por la irradiación de	
		7-DHC y colecalciferol	7-DHC + EPA
3300 cm^{-1}	-OH	sin cambios	aumento
1730 cm^{-1}	grupos éster C=O	aumento	
1710 cm^{-1}	ácidos carboxílicos C=O	aumento	
1680 cm^{-1}	C=C trans	aspecto y aumento	
1650 cm^{-1}	C=C cis	aumento	

Número de onda (absorbancia máxima)	Grupo	Cambios causados por la irradiación de	
		7-DHC y colecalciferol	7-DHC + EPA
1625 cm ⁻¹	C=C aromático	aumento	

a) irradiación UV de 7-DHC y colecalciferol

5 Las siguientes figuras 24 y 25 muestran cómo los espectros de absorbancia de 7-DHC y colecalciferol estaban cambiando con el tiempo debido a la irradiación UV. Como las estructuras químicas de las 2 sustancias son muy parecidas, los espectros de absorbancia parecen ser bastante similares. También su comportamiento con el tiempo de irradiación UV parecía ser comparable (Tabla 8).

10 A partir de los espectros de absorbancia y los cambios de las áreas de los picos medidos (Figura 26), podemos suponer que no se generaron grupos -OH debido a la irradiación. El área del pico a 3300 cm⁻¹ fue estable con el tiempo de irradiación UV. El área del pico a aproximadamente 1700 cm⁻¹ (incluyendo el área de 1850 cm⁻¹ a 1550 cm⁻¹) aumentaba claramente para ambas sustancias, lo que indica la formación de dobles enlaces C=C (aromáticos, cis y trans), así como la formación de grupos éster C=O y carboxílicos.

15 b) irradiación UV de 7-DHC + EPA

20 Los espectros de la mezcla de 7-DHC y EPA parecían representar ambas sustancias en sus absorbancias típicas (Figura 27). Los cambios en las áreas de los picos (Figura 28) confirman esta observación. A 3300 cm⁻¹ se observamos un aumento en el área del pico que se encuentra entre los valores de 7-DHC (sin cambios) y los valores de EPA (aumento claro). A 1700 cm⁻¹ se encontró el mismo resultado, que solo se hace evidente en los valores absolutos que de nuevo se encuentran entre los valores medidos para 7-DHC (aumento lento del área de pico pequeña) y EPA (aumento pronunciado del área de pico grande).

25 **Conclusiones**

30 Ninguno de los espectros de absorbancia de 7-DHC después de la irradiación UV era completamente similar al espectro de absorbancia del colecalciferol no irradiado. Una explicación probable de esto es que se forme una mezcla de varios productos de fotooxidación debido a la irradiación UV como se describe en la literatura (véase la Figura 23). La conversión de 7-DHC a colecalciferol es solo de aproximadamente 0,8 % (Olds et al., 2008) y, por tanto, puede no ser detectable con FTIR. Esto no es un problema, ya que todos los productos de fotooxidación producidos por irradiación UV también evolucionan en el cuerpo humano y son biológicamente inactivos, evitando así la hipervitaminosis de vitamina D₃.

35 La combinación de cantidades iguales de 7-DHC y EPA sobre las superficies de Ti no produjo ninguna interacción química entre las 2 sustancias que se podían medir con espectroscopía FTIR. La irradiación de la mezcla dio como resultado espectros que tenían el aspecto y las áreas del pico de absorbancia que eran una combinación de los espectros y las áreas del pico de 7-DHC y EPA. No se espera que el uso de otros PUFA distintos al EPA tenga como resultado diferentes hallazgos a este.

40 **Ejemplo 6**

Este ejemplo demuestra cómo se pueden fabricar implantes lisos y rugosos con PUFA y/o vitaminas.

45 **A.1. Implantes lisos:**

50 Se trituraron y pulieron discos de titanio comercialmente puros (cp) con un diámetro de 6,25 mm y una altura de 2 mm (Phoenix 4000, Buehler GmbH, Düsseldorf, Alemania) en siete secuencias. Los papeles de carburo de silicio, el neopreno poroso para el pulido final y la suspensión de sílice coloidal abrasiva (OP-S) fueron suministrados por Struers GmbH (Willich, Alemania). La primera etapa consistió en moler todos los implantes con P500 en agua hasta que fueron nivelados, con 65 N de presión y una contra-rotación a 250 rpm. El tiempo de molienda se ajustó después a 20 min y el tamaño del grano disminuyó con papeles: P800; P1200 y P2500. Para el papel pulidor P4000 se utilizó además la suspensión de pulido OP-S. Para las dos últimas etapas, se utilizó un neopreno especial poroso (MD-Chem) a 200 rpm y 50 N de, 14 min en co-rotación con la suspensión OP-S y 1 después 1 min en co-rotación con agua. La molienda/pulido era necesaria para crear superficies planas y limpias uniformes antes de la modificación. Después del pulido, todos los discos se lavaron alternativamente con NaOH a 40 vol. % y HNO₃ al 50 % en volumen en el baño ultrasónico. Después se lavó con agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro y se conservó a temperatura ambiente en etanol a 70 % en vol.

A. 2. Implantes rugosos:

Los discos de titanio comercialmente puros (cp) con un diámetro de 6,25 mm y una altura de 2 mm se granallaron con partículas de dióxido de titanio (TiO₂) con un tamaño de partícula de 180-220 µm (Blasmaster™ polvo de óxido, F.J. Brodmann&CO, L.L.C., Los Angeles, EE.UU.) después de pulir. La distancia desde los implantes hasta los chorros era de aproximadamente 20 mm durante el procedimiento de granallado y la corriente de partículas de TiO₂ golpeó la superficie con un ángulo de 90°. La presión de aire utilizada para el granallado se ajustó a 0,5 MPa. Después de pulir y granallar, todos los discos se lavaron alternativamente con NaOH a 40 % en vol y HNO₃ a 50 % en vol en un baño ultrasónico. Después se lavó con agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro y se conservó a temperatura ambiente en etanol a 70 % en vol.

B. Modificación superficial de implantes lisos y rugosos con PUFA y/o vitaminas

Para la modificación superficial de los implantes lisos y rugosos con PUFA y/o vitaminas:

1. Trabajar en una campana de flujo laminar.
2. Las soluciones de las sustancias respectivas se preparan con etanol.
3. Las soluciones de trabajo se filtran (tamaño de poro de 0,2 µm) para esterilizarlas.
4. Se añaden 10 µl de solución respectiva a la superficie de las monedas (con la concentración seleccionada y combinación de PUFA/vitaminas).
5. Las monedas se dejan secar en la campana de flujo laminar durante 15 min.
6. Las muestras se irradian con luz UV (luz UV C 100 nm - 280 nm y luz UV B 280 nm - 315 nm). La configuración se muestra en la Figura 29. Un problema es irradiar las muestras de todos los lados. Se puede doblar una hoja de aluminio reflectante y usarla para acceder a las muestras desde abajo y a los lados si las muestras se colocan sobre una superficie transparente a los rayos UV (por ejemplo, cuarzo). La Figura 29 muestra un ejemplo de configuración para irradiar muestras de Ti con luz UV.

D. Caracterización de implantes lisos y rugosos modificados con PUFA y/o vitaminas:

1. Perfilómetro: se utiliza un perfilómetro láser de luz azul (Sensofar Plµ 2300, Terrassa, España) para escanear áreas de 200 x 160 µm² con un objetivo Nikon (Nikon, Tokio, Japón) de 150x (150x/0,95 Lu Plan Apo, EPI). Los parámetros de rugosidad y ondulación de cada moneda fueron calculados con un software avanzado (SensoMap Plus 4.1, Sensofar, Terrassa, España) y se eligieron imágenes representativas de las diferentes superficies.
2. Ángulo de contacto: medido al menos 24 horas después del final de la irradiación UV. Los ángulos de contacto (AC) de las superficies de los diferentes implantes de titanio se analizan utilizando un sistema de ángulo de contacto basado en vídeo (OCA 20, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania). El líquido utilizado fue agua desionizada. Se administró una gota de 3 µl a la superficie con una velocidad de 0,6 µl s⁻¹. La forma de la gota se registra con una cámara (4,17 imágenes s⁻¹) y los ángulos de contacto se midieron después de las imágenes grabadas. Se añade una gota de 3 µl en la moneda, se mide el AC, la gota se agranda 2x con 1 µl de agua pura, después de cada aumento se mide el AC con la superficie, el AC no se mide después de secar la moneda ya que esto podría cambiar la estructura del PUFA en la superficie de la moneda y con ello el AC.
3. FT IR (reflectancia difusa) para caracterizar la diferencia antes y después de la irradiación UV del PUFA y las vitaminas. Se analizaron las películas de PUFA y/o los cambios causados por la irradiación UV con un FTIR Spectrum 100, Perkin Elmer (EE.UU.) La unidad de reflectancia difusa (DRIFT) se utiliza para registrar los espectros. Una moneda limpia, esterilizada, pero con Ti pulido no modificado sirvió de referencia. Los espectros de FTIR se recogen antes y después de la irradiación con luz UV en diferentes momentos de irradiación. Los espectros se registraron desde 4000 cm⁻¹ hasta 450 cm⁻¹ con una resolución de 2 cm⁻¹. Cada espectro fue el resultado de 8 espectros individuales. Los espectros fueron corregidos respecto al basal con el programa Spectrum (Versión 6.1.0) de PerkinElmer.
4. La FTIR-microscopía se realiza para responder a las siguientes preguntas:
 - ¿Cómo se distribuyen los componentes antes y después de la irradiación UV?
 - ¿Hay alguna diferencia si los componentes están solos en la superficie o en diferentes combinaciones?
 - ¿Cómo es la estructura cristalina de las monedas de Ti?
 - ¿Existe alguna correlación entre la distribución de los componentes y los cristales?
5. La XPS se realiza para obtener información sobre la composición atómica de las superficies. Se usa un aparato Kratos Axis Ultra DLD XPS (Kratos, Manchester, Reino Unido) para realizar el análisis superficial de las superficies de los implantes modificados. Se utilizaron rayos X monocromáticos Al Kα con una corriente de 10 mA y una tensión de 15 kV. Se analizó un área de 300 x 700 µm² en una muestra por cada grupo, con una energía de paso de 80,0 eV para los espectros generales y 20,0 eV para las exploraciones elementales de resolución de alta energía de Ti 2p, C 1 s, O 1 s y N 1 s. Las áreas de los picos se calcularon con el programa CasaXPS 3.2.12. La escala de energía de enlace se calibró asignando el pico de hidrocarburo a una energía de enlace de 284,8 eV. El fondo de Shirley se usó para cuantificar los espectros generales y se usaron fondos de Shirley y lineales mezclados para la cuantificación de las exploraciones elementales detalladas

Referencias

- Guillén MD, Cabo N. Infrared Spectroscopy in the Study of Edible Oils and Fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1997; 75:1-11.
- 5 Kim HK, Kim K, Byun Y. Preparation of a chemically anchored phospholipid monolayer on an acrylated polymer substrate. *Biomaterials* 2005; 26(17):3435-3444.
- 10 Nakamura M, Sirghi L, Aoki T, Hatanaka Y. Study on hydrophilic property of hydro-oxygenated amorphous TiO_x:OH thin films. *Surface Science* 2002; 507-510:778-782.
- Rønold HJ, Ellingsen JE. The use of a coin shaped implant for direct in situ measurement of attachment strength for osseointegrating biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2002; 23(10):2201-2209.
- 15 Satsangi N, Satsangi A, Glover R, Ong JL, Satsangi RK. Osteoblast response and calcium deposition on phospholipid modified surfaces. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15(6):693-7.
- Miyauchi M, Watanabe T, Hashimoto K, Kieda N, Hishita S, Mitsuhashi T, Nakajima A. Reversible wettability control of TiO₂ surface by light irradiation. *Surface Science* 2002; 511:401-407.
- 20 Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2005; 74A(1):49-58.
- 25 Wang R, Hashimoto K, Fujishima A, Chikuni M, Kojima E, Kitamura A, Shimohigoshi M, Watanabe T. Photogeneration of Highly Amphiphilic TiO₂ Surfaces. *Advanced Materials* 1998; 10(2):135-138.
- Moison RM, Steenvoorden DP, Beijersbergen van Henegouwen GM. Topically applied eicosapentaenoic acid protects against local immunosuppression induced by UVB irradiation, cis-urocanic acid and thymidine dinucleotides. *Photochem Photobiol* 2001; 73(1):64-70.
- 30 Khan W, Kapoor M, Kumar N. Covalent attachment of proteins to functionalized polypyrrole-coated metallic surfaces for improved biocompatibility. *Acta Biomaterialia* 2007; 3(4):541-549;
- 35 Muller R, Abke J, Schnell E, Scharnweber D, Kujat R, Englert C, Taheri D, Nerlich M, Angele P. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials* 2006; 27(22):4059-4068)
- 40 Cooper SL, Tegoulia VA, Rao W, Kalambur AT, Rabolt JF. Surface Properties, Fibrinogen Adsorption, and Cellular Interactions of a Novel Phosphorylcholine-Containing Self-Assembled Monolayer on Gold. *Langmuir* 2001; 17:4396-4404.
- Svedhem S, Dahlborg D, Ekeröth J, Kelly J, Hook F, Gold J. In Situ Peptide-Modified Supported Lipid Bilayers for Controlled Cell Attachment. *Langmuir* 2003; 19:6730-6736.
- 45 Iwasaki Y, Tojo Y, Kurosaki T, Nakabayashi N. Reduced adhesion of blood cells to biodegradable polymers by introducing phosphorylcholine moieties. *J Biomed Mater Res A* 2003; 65(2):164-169
- Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomson P. *Titanium in Medicine*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2001.
- 50 Hirani N, Chvedov D, Jones R. Characterization of organic monolayers on the surface of aluminum in the process of thermal treatment. *Thin Solid Films* 2007; in press.
- Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*: John Wiley & Sons Ltd; 2001.
- 55 Cheng H, Jiang W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Sztatkowski, J.P., Yoon Park, J., He, T.-C.. Osteogenic Activity of the Fourteen Types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). *The Journal of Bone and Joint Surgery* 2003; 85:1544-1552.
- 60 Melø TB, Mahmoud GS. Radicals Induced by Illumination of a Mixture of Unsaturated Fatty Acids with Ultraviolet Light at 77K. *Magnetic Resonance in Chemistry* 1988; 26:947-954.
- Chacon JN, Gaggini P, Sinclair RS, Smith FJ. Photo- and thermal-oxidation studies on methyl and phenyl linoleate: anti-oxidant behaviour and rates of reaction. *Chemistry and Physics of Lipids* 2000; 107(1):107-120.

- Rontani JF. Photodegradation of unsaturated fatty acids in senescent cells of phytoplankton: photoproduct structural identification and mechanistic aspects. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1998; 114(1):37-44.
- 5 Refsgaard HH, Tsai L, Stadtman ER. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(2):611-616.
- Kim B-H, Lee J-Y, Choa Y-H, Higuchi M, Mizutani N. Preparation of TiO₂ thin film by liquid sprayed mist CVD method. *Materials Science and Engineering B* 2004; 107(3):289-294.
- 10 Willumeit R, Schuster A, Iliev P, Linser S, Feyerabend F. Phospholipids as implant coatings. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(2):367-380.
- Cheung SC, Szeto YT, Benzie IF. Antioxidant protection of edible oils. *Plant Foods Hum Nutr* 2007; 62(1):39-42.
- 15 Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. Volume 41; 2000. p 163-18.
- Williams DL, Marks V. *Biochemistry in Clinical Practice*. London: William Heineman Medical Books; 1983.
- 20 Han, Y, Chen, D, Sun, J, Zhang, Y, Xu, K. UV-enhanced bioactivity and cell response of micro-arc oxidized titania coatings. *Acta Biomater* 2008;4:1518-1529.
- Viorner, C et al. Surface Modification of Titanium with Phosphonic Acid To Improve Bone Bonding: Characterization by XPS and ToF-SIMS. vol. 18, 2002. 2582-2589.
- 25 Lu, G, Bernasek, SL, Schwartz, J. Oxidation of a polycrystalline titanium surface by oxygen and water. *Surface Science* 2000;458:80-90.
- 30 Beamson, G, Briggs, D. High resolution XPS of organic polymers : the Scienta ESCA300 database by New York: John Wiley & Sons, 1992.
- Reno F, Aina V, Gattia S, Cannas M, Effect of vitamin E addition to poly(D,L) lactic acid on surface properties and osteoblast behaviour. *Biomaterials* 26 (2005) 5594-5599.
- 35 Wang X, Quinn PJ, Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research* 38 (1999) 309-336.
- Yamauchi R, Noro H, Shimoyamada M, Kato K, Analysis of Vitamin E and Its Oxidation Products by HPLC with Electrochemical Detection. *Lipids* 37(5) (2002) 515-522.
- 40 Aiba I, Yamasaki T, Shinki T, Izumi S, Yamamoto K, Yamada S, Terato H, Ide H, Ohyama Y, Characterization of rat and human CYP2J enzymes as Vitamin D 25-hydroxylases. *Steroids* 71, 849-856, 2006.
- Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino ACW, O'Loughlin PD, Morris HA, Metabolism of vitamin D₃ in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Bone* 40, 1517-1528, 2007
- 45 Ballard JM, Zhu L, Nelson ED, Seburg RA, Degradation of vitamin D₃ in a stressed formulation: The identification of esters of vitamin D₃ formed by a transesterification with triglycerides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 142-150, 2007 Holick MF, *Photobiology of Vitamin D in Vitamin D, 2nd Edition* (Feldman, Pike, Glorieux), Elsevier 2005.
- 50 Holick MF, *Photobiology of Vitamin D in Vitamin D, 2nd Edition* (Feldman, Pike, Glorieux), Elsevier 2005.
- 55 Ichikawa F, Sato K, Nanjo M, Nishii Y, Shinki T, Takahashi N, Suda T, Mouse Primary Osteoblasts Express Vitamin D₃, 25-Hydroxylase mRNA and Convert 1 α -Hydroxyvitamin D₃, into 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Bone* 16, 129-135, 1995
- Olds WJ, McKinley AR, Moore MR, Kimlin MG, In vitro model of vitamin D₃ (Cholecalciferol) synthesis by UV radiation: Dose-response relationships. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 93, 88-93, 2008
- 60 St-Arnaud R, The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473, 225-230, 2008.
- S.-M. Oh et al. 2003 *Thin Solid Films* 435 (2003) 252-258, página 256.
- 65 Patente de los Estados Unidos US2006088596.

Patente de los Estados Unidos US2007202149.

Patente de los Estados Unidos US2008118544.

5 Patente de los Estados Unidos US2007299512.

Patente de los Estados Unidos US2008118544.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> NUMAT AS
 <120> Implantes recubiertos con PUFA
 15 <130> PD53788PC00
 <150> US61/056.978
 <151> 29-05-2008
 20 <160> 14
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 1
 gtaacccggt gaacccatt 20
 35 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 45 ccatccaatc gtagtagcg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 3
 55 acccagaaga ctgtgatgg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 65 <400> 4
 cacattgggg gtaggaacac 20

ES 2 627 290 T3

	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5		
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 5	
10	agagcatgac cgatggattc	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 6	
20	ccttcttgag gttgccagtc	20
	<210> 7	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30		
	<400> 7	
	actggctagg tgggtgcag	20
	<210> 8	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador	
	<400> 8	
	ggtagggagc tgggtaagg	20
45		
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 9	
55	aaccagaca caagattcc	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 10	
65	gagagcgaag ggtcagtcag	20

ES 2 627 290 T3

5	<210> 11 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	
10	<400> 11 ccgggagcag tgtgagc	17
	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
20	<400> 12 tagatgcgtt ttaggcggt c	21
	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<400> 13 gaaaatggag acggcgatag	20
	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador	
40	<400> 14 acccgagagt gtggaaagtg	20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un implante de metal recubierto para la adhesión controlada de tejido mineralizado y/o duro, en el que al menos parte de la superficie del implante está recubierta con PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) unidos químicamente por luz UV a una concentración de 10 nanogramos/mm² o menos, en el que el implante de metal recubierto se puede obtener por un método que comprende:
- 10 i) pulir el implante,
ii) lavar,
iii) esterilizar en autoclave,
- 15 a) tratar el implante con una solución que comprende PUFA e
b) irradiar al menos parte de la superficie del implante con luz UV de 100 a 315 nm durante un período de tiempo comprendido entre 30 segundos y 30 minutos y opcionalmente
c) lavar dicho implante,
- en el que las etapas a) y b) se realizan simultáneamente o en cualquier orden.
- 20 2. El implante de metal recubierto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa b) se realiza simultáneamente con la etapa a) o bien la etapa a) se realiza antes de la etapa b).
3. El implante de metal recubierto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la luz UV de la etapa (b) es aproximadamente 6 mW/cm².
- 25 4. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el implante se recubre con PUFA a una concentración comprendida entre 1 y 10 nanogramos/mm².
- 30 5. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el metal se selecciona del grupo que consiste en titanio, aleación de titanio, circonio, hafnio, tántalo, niobio y mezclas de dos o más de circonio, hafnio, tántalo y niobio.
- 35 6. El implante de metal recubierto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el implante comprende al menos el 90 % en peso de titanio y/o una aleación de titanio.
- 40 7. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el PUFA se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos n-3 y n-6.
8. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el PUFA se selecciona del grupo que consiste en ácido eicosapentaenoico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico y mezclas de los mismos.
9. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el PUFA comprende o es EPA (ácido eicosapentaenoico).
- 45 10. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el recubrimiento del implante comprende adicionalmente vitaminas liposolubles, tales como vitamina E.
- 50 11. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el implante comprende adicionalmente 7-dehidrocolesterol.
- 55 12. El implante de metal recubierto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cuando el implante comprende al menos un 90 % en peso de titanio y/o una aleación de titanio, el PUFA comprende o es EPA (ácido eicosapentaenoico), entonces el revestimiento comprende de 1 a 5x10¹⁵ enlaces insaturados unidos de EPA por mm² de superficie de titanio.

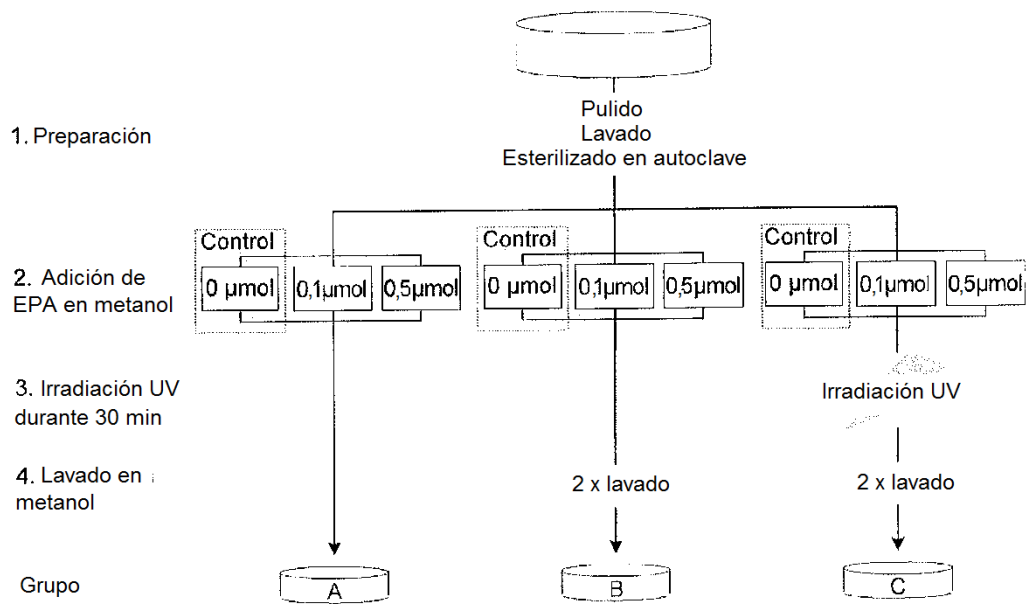


Fig. 1

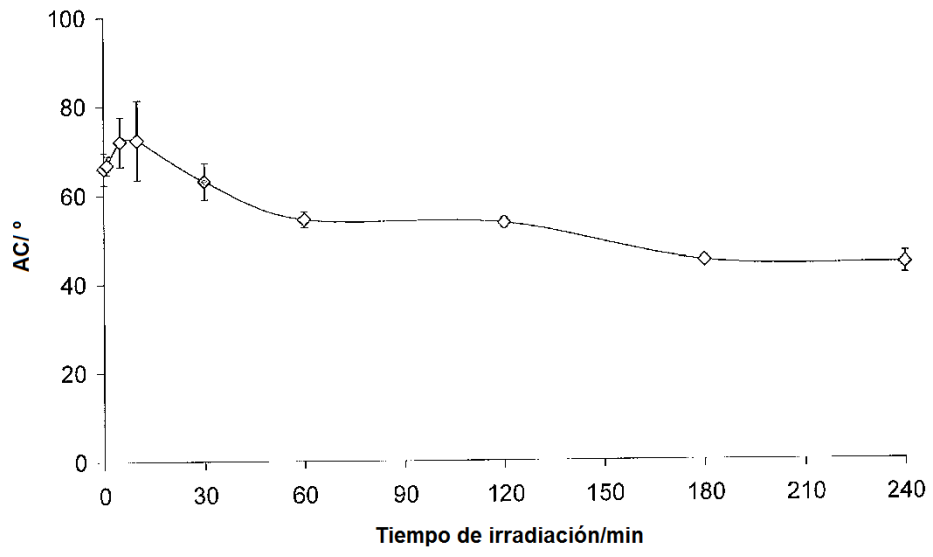


Fig. 2

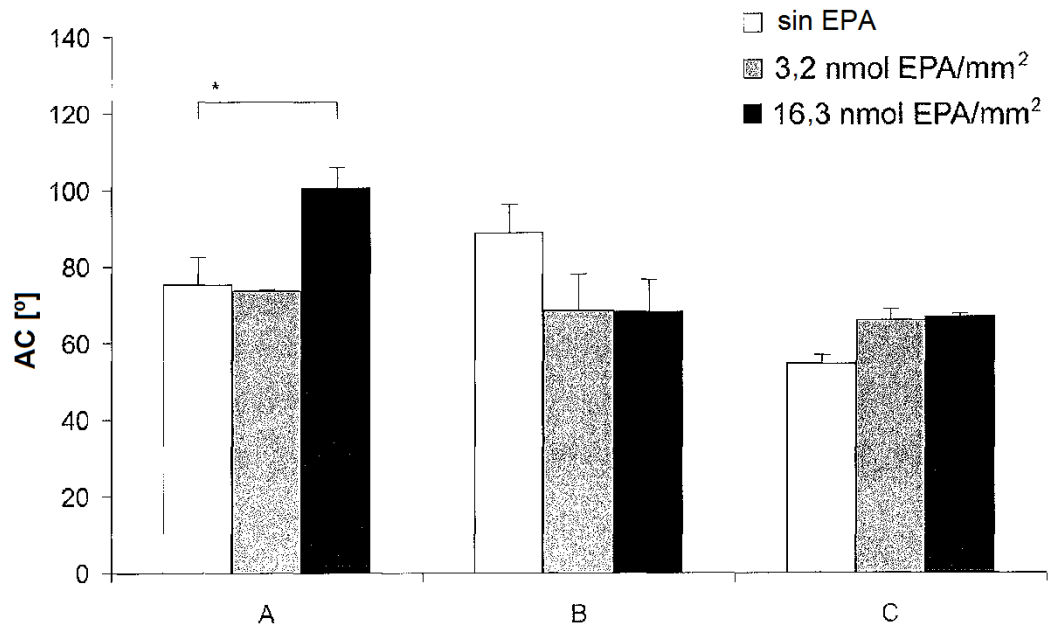


Fig. 3

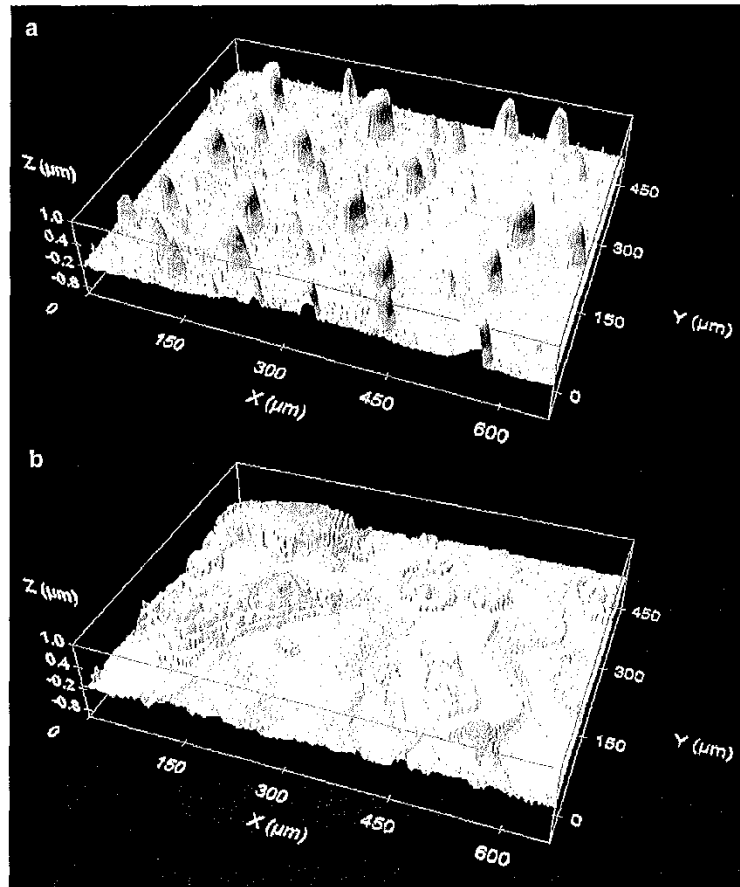


Fig. 4

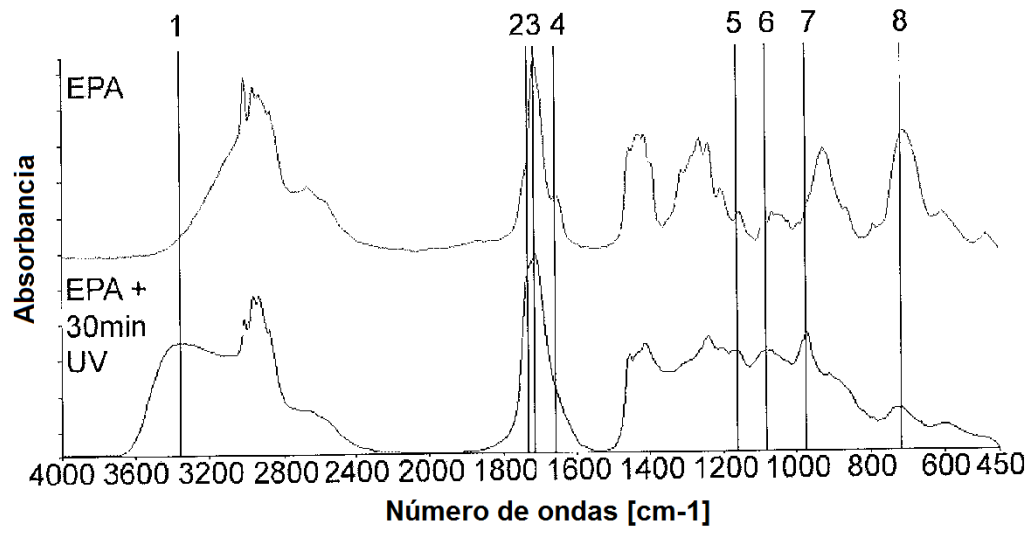


Fig. 5

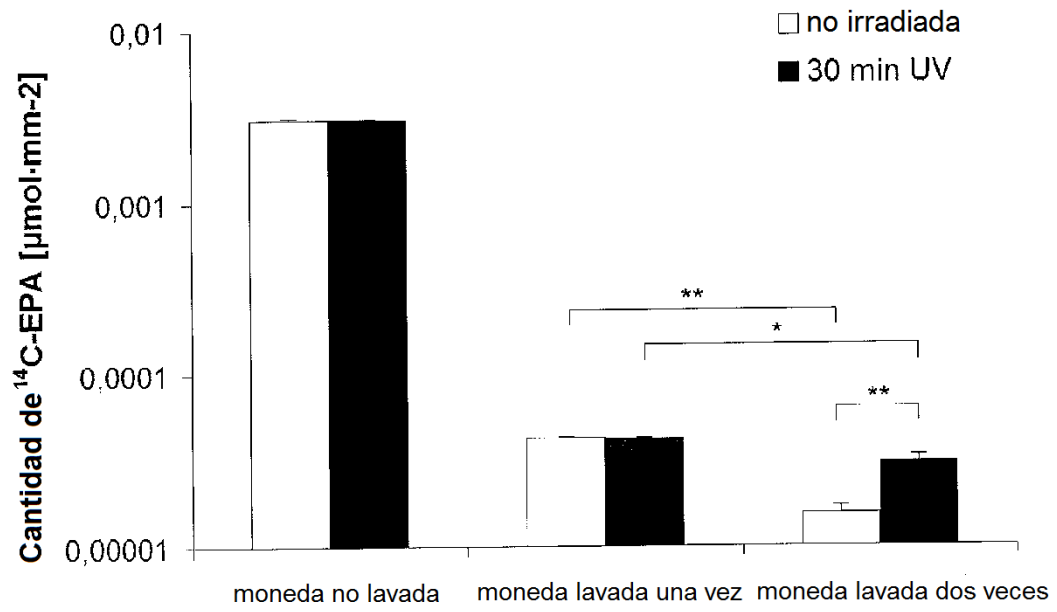


Fig. 6

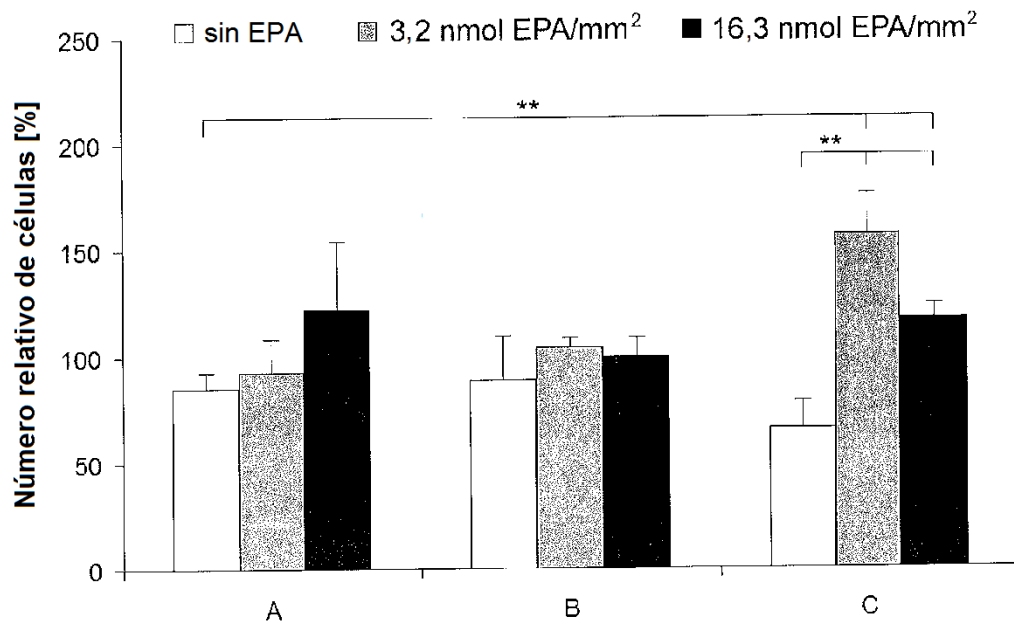


Fig. 7

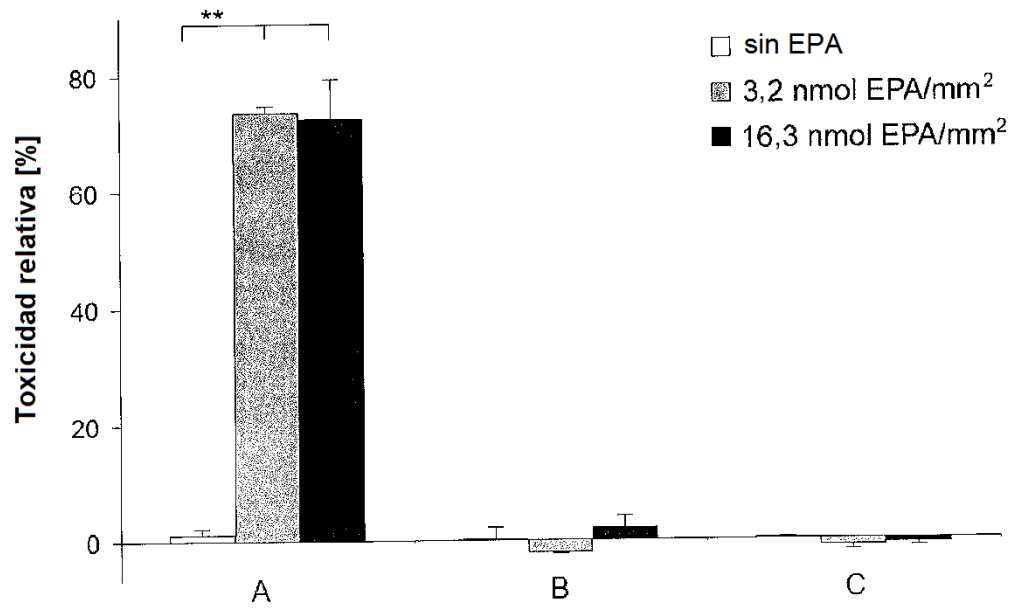


Fig. 8

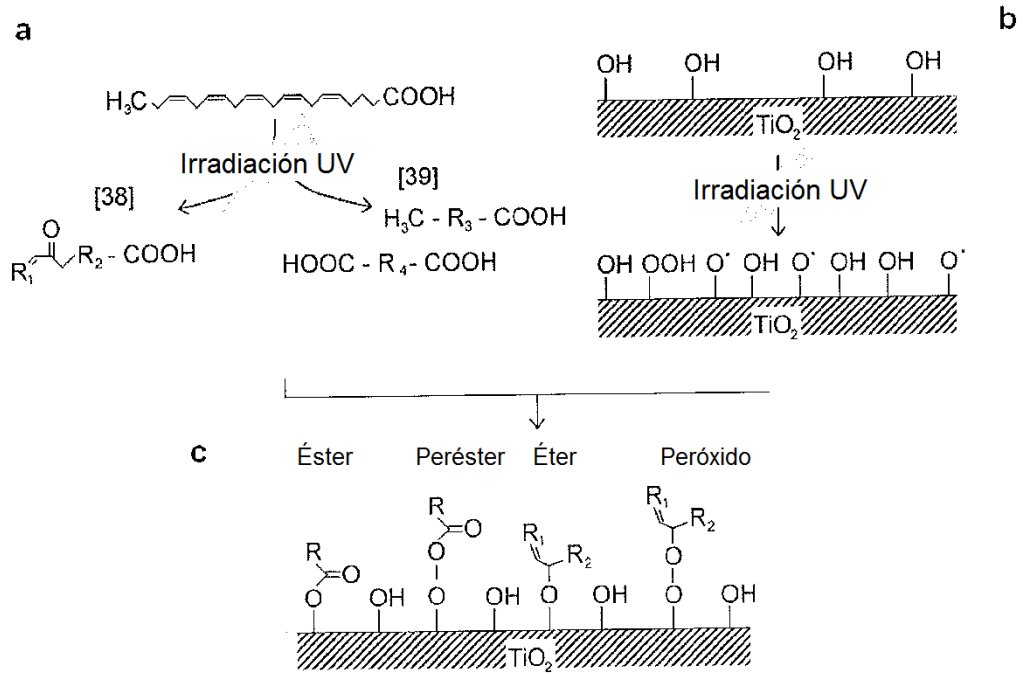


Fig. 9

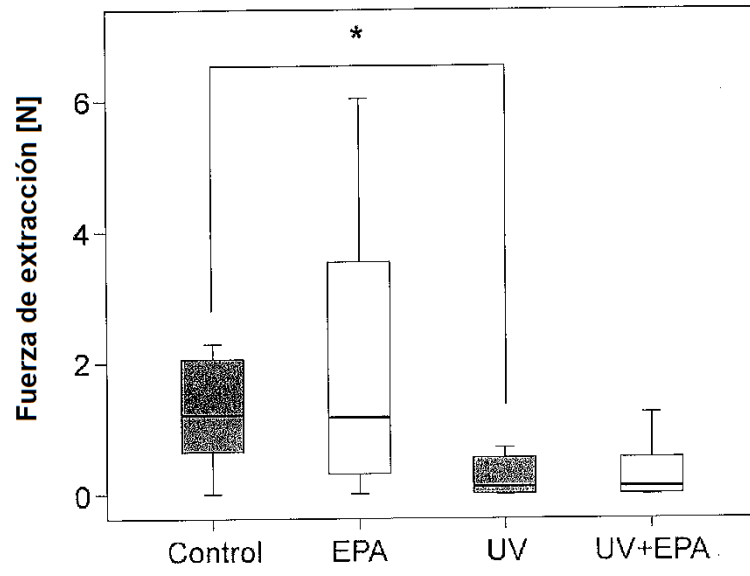


Fig. 10

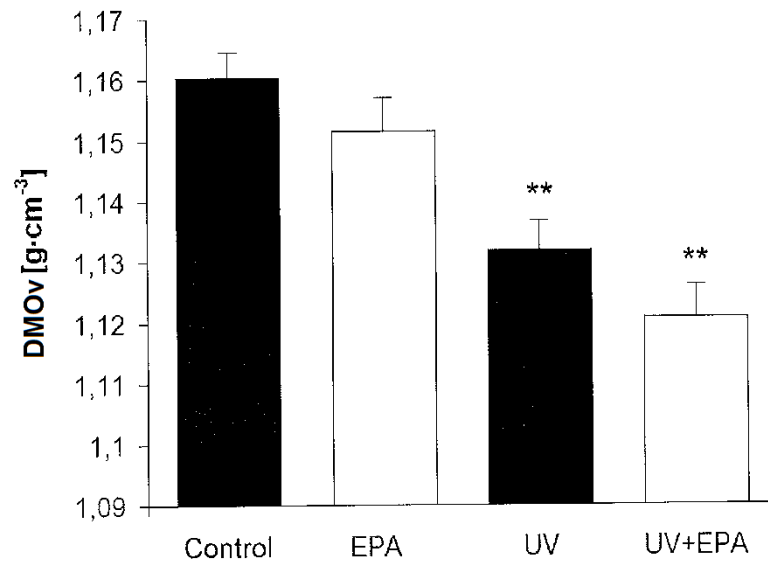


Fig. 11

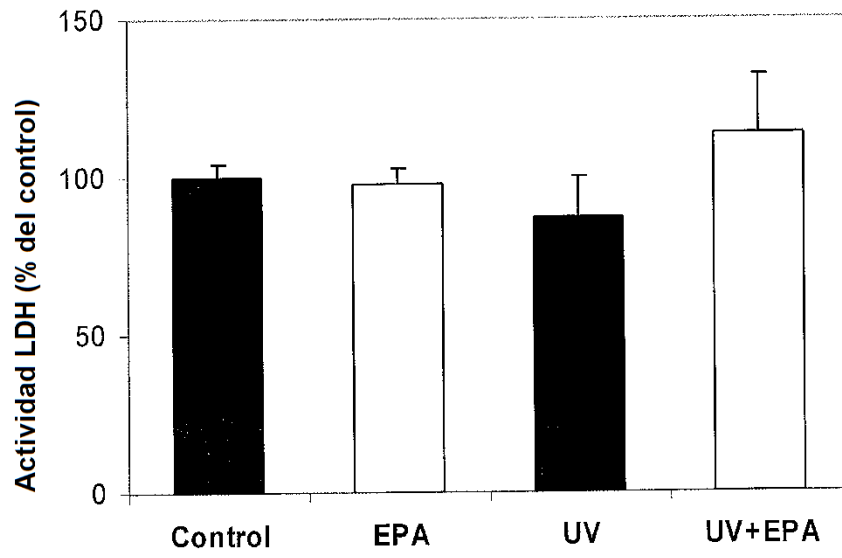


Fig. 12

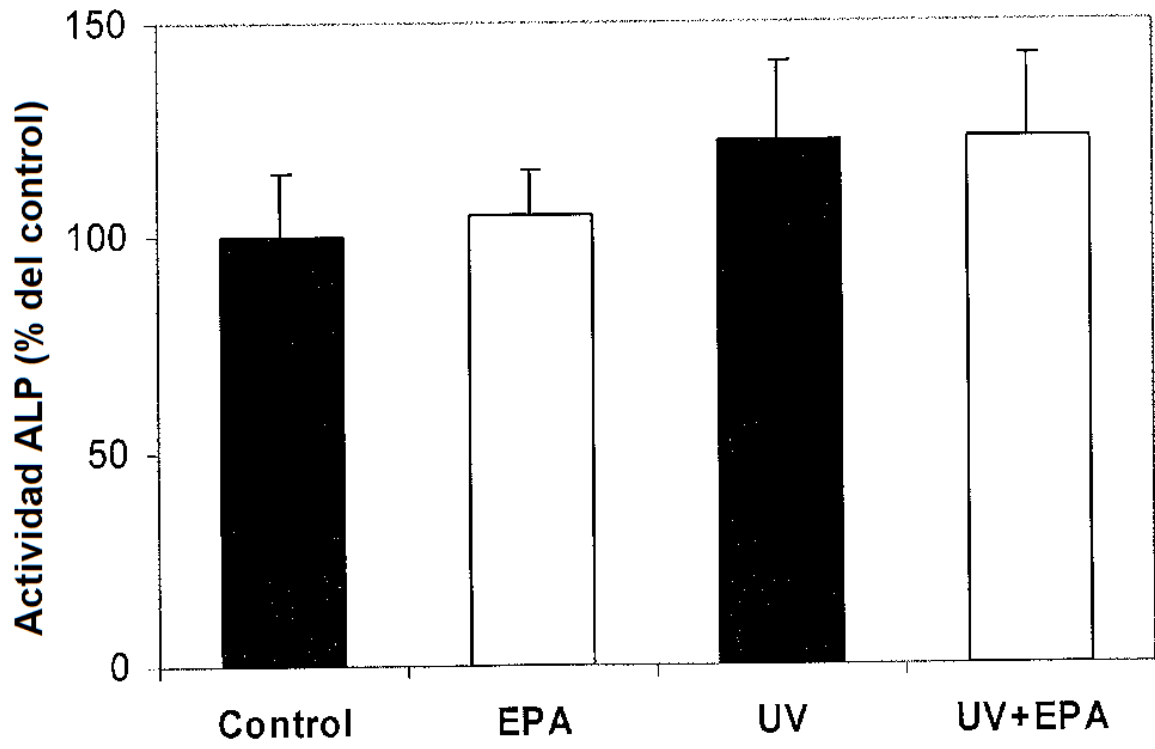


Fig. 13

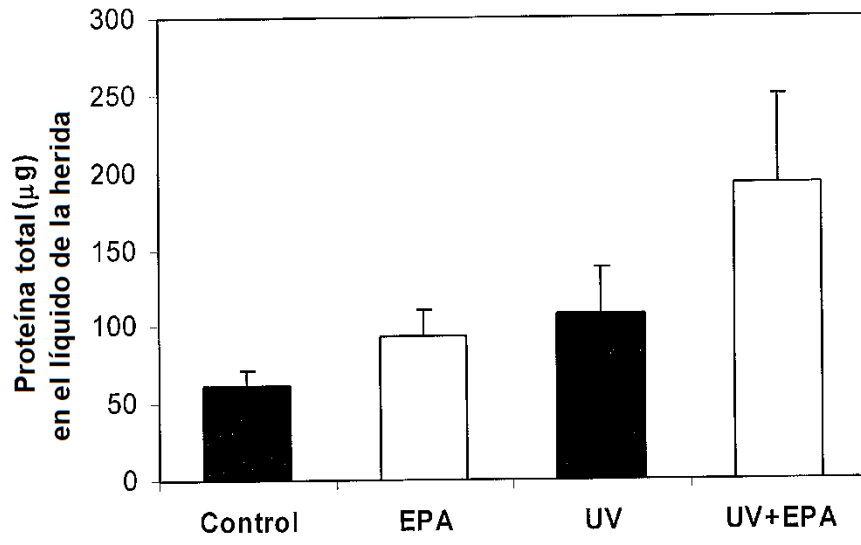


Fig. 14

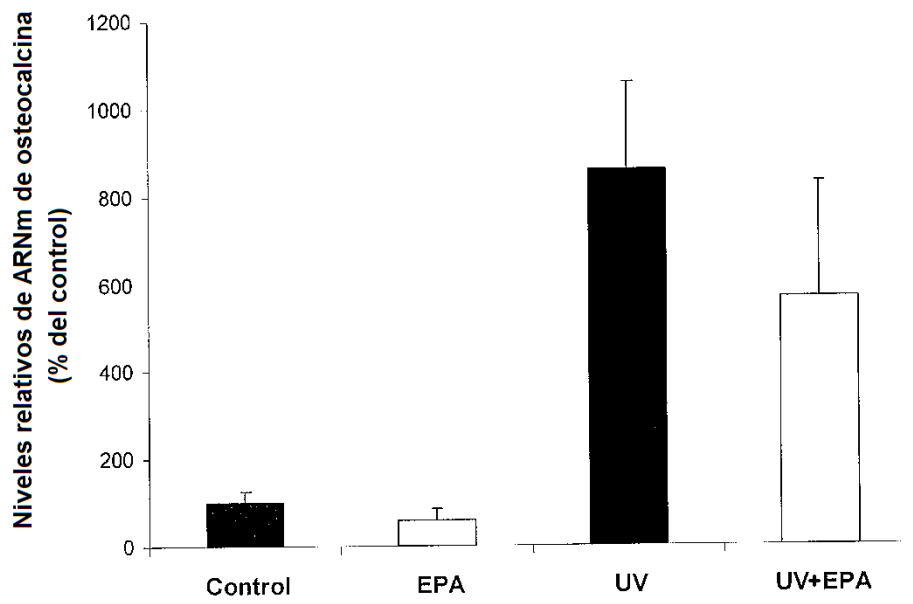


Fig. 15

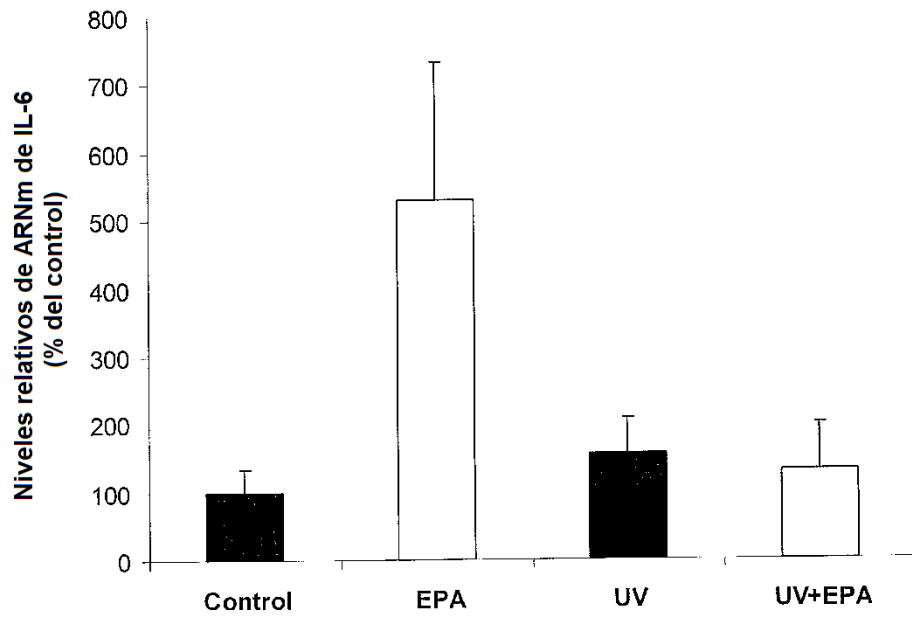


Fig. 16

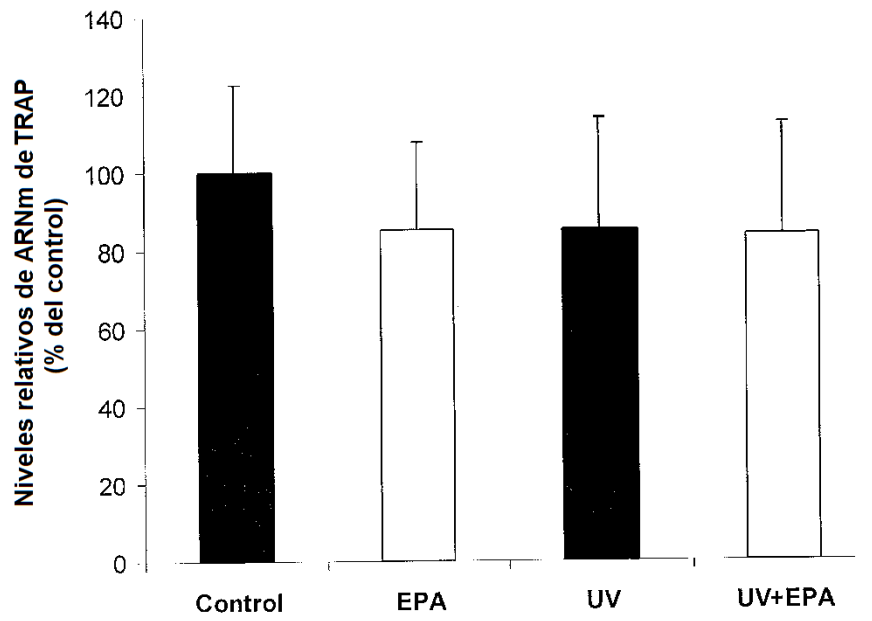


Fig. 17

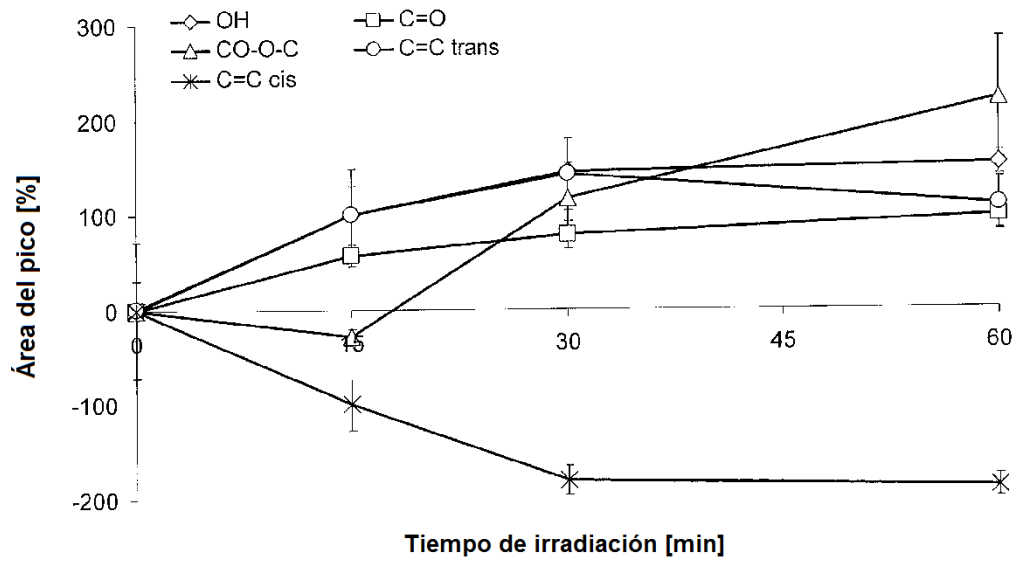


Fig. 18

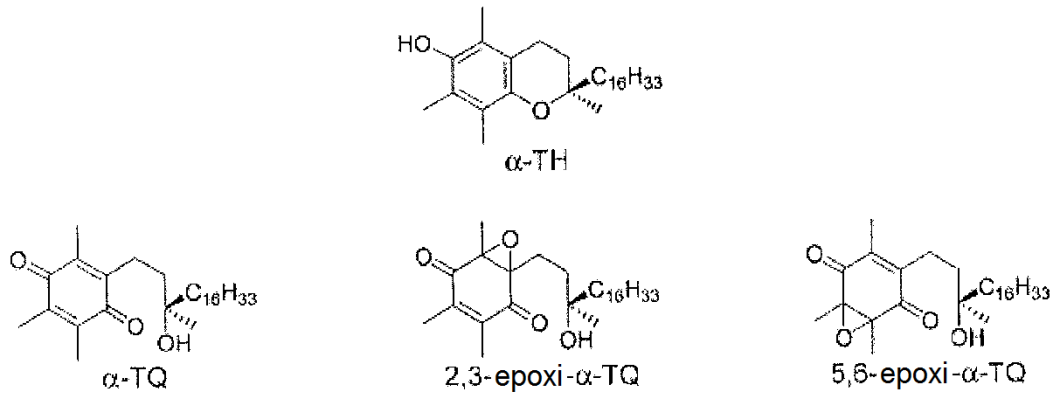


Fig. 19

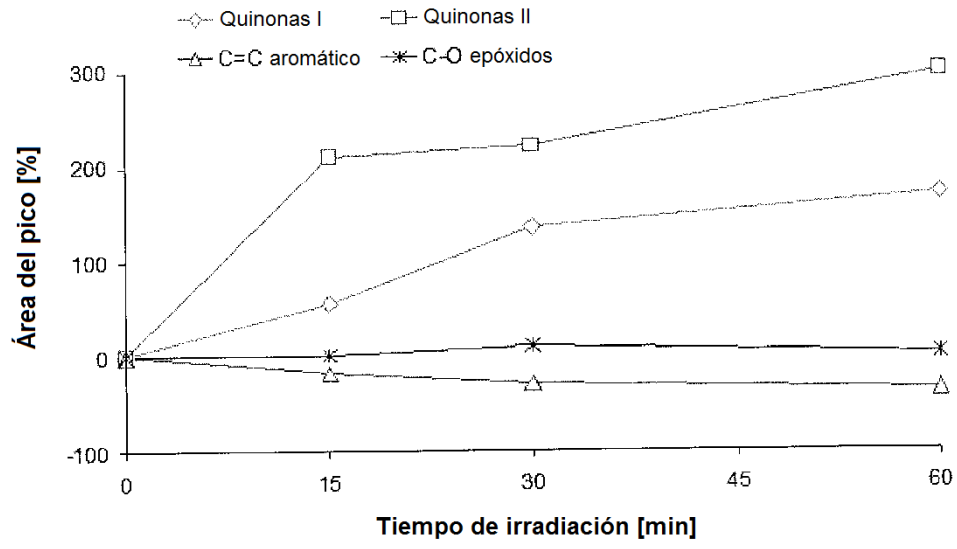


Fig. 20

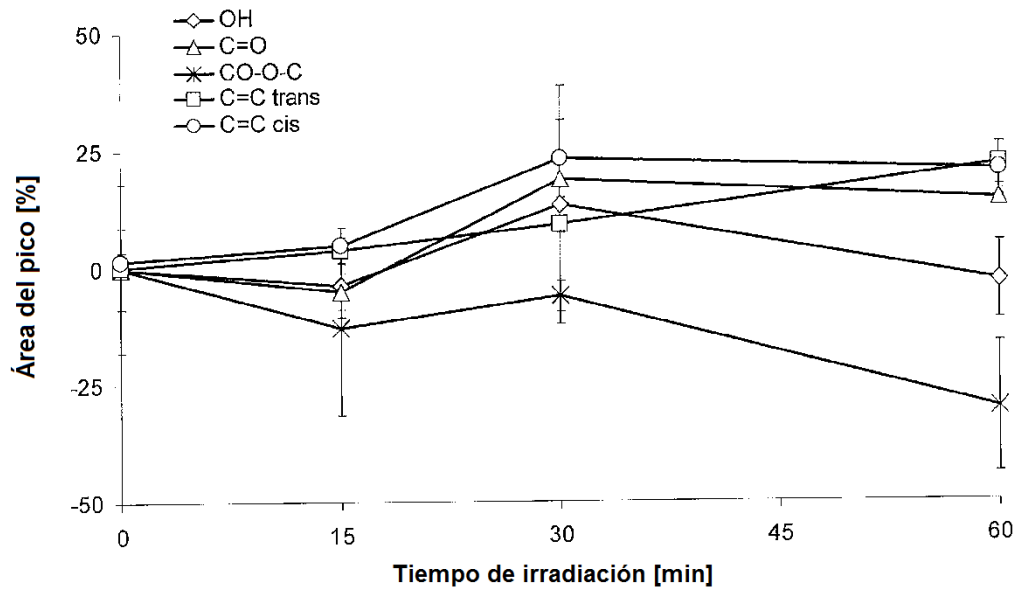


Fig. 21

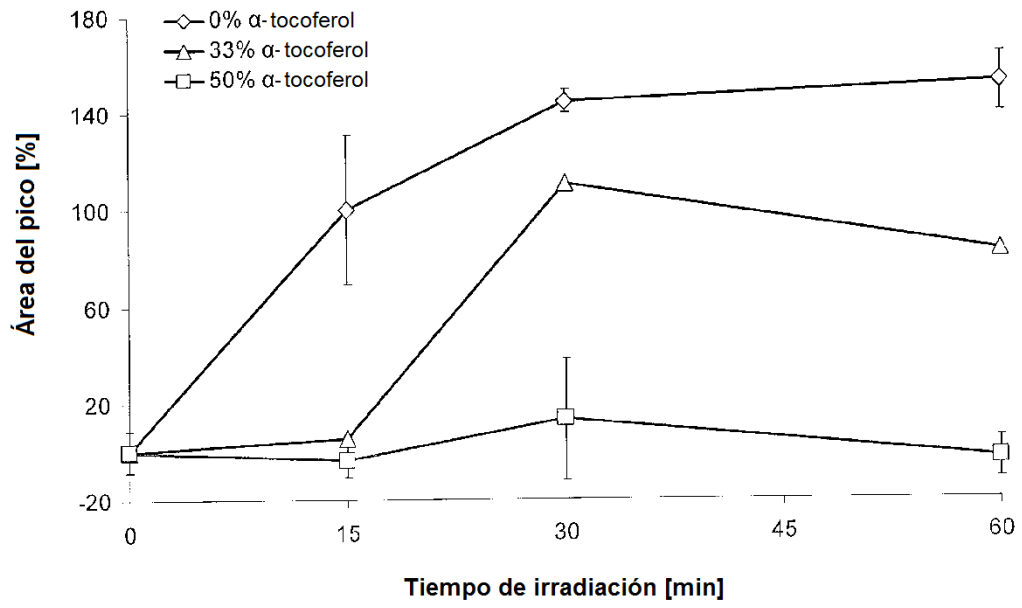


Fig. 22

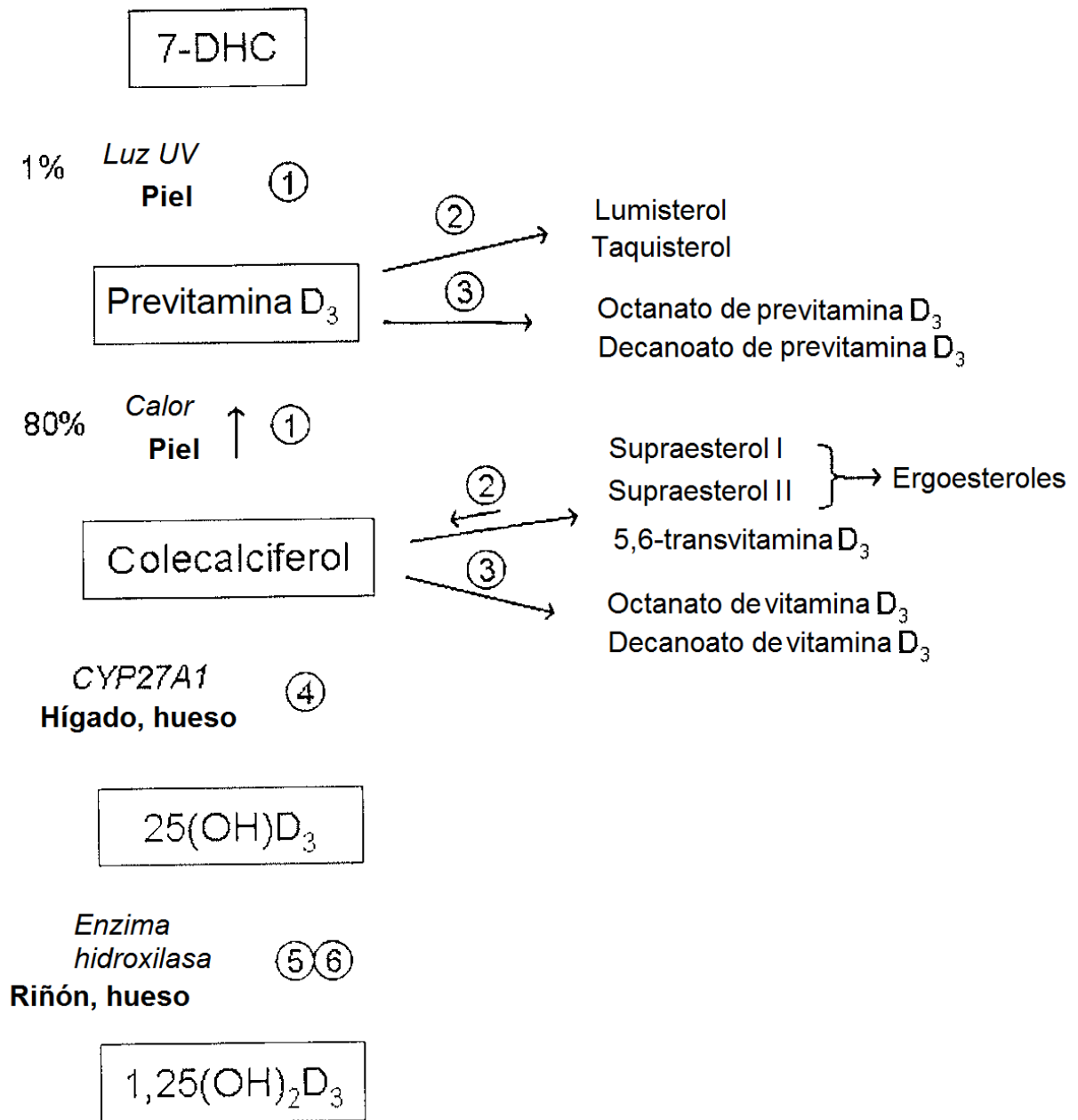


Fig. 23

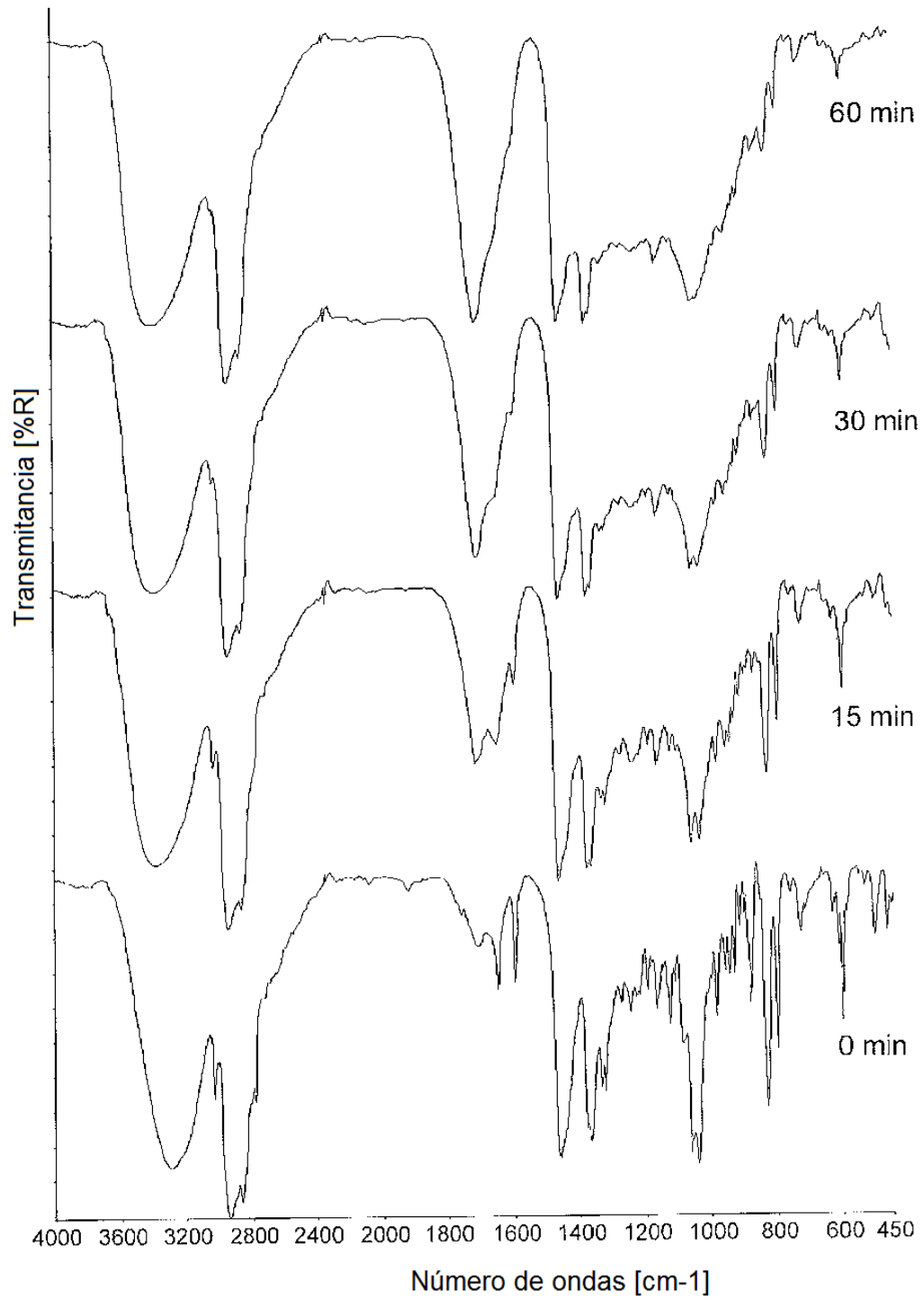


Fig. 24

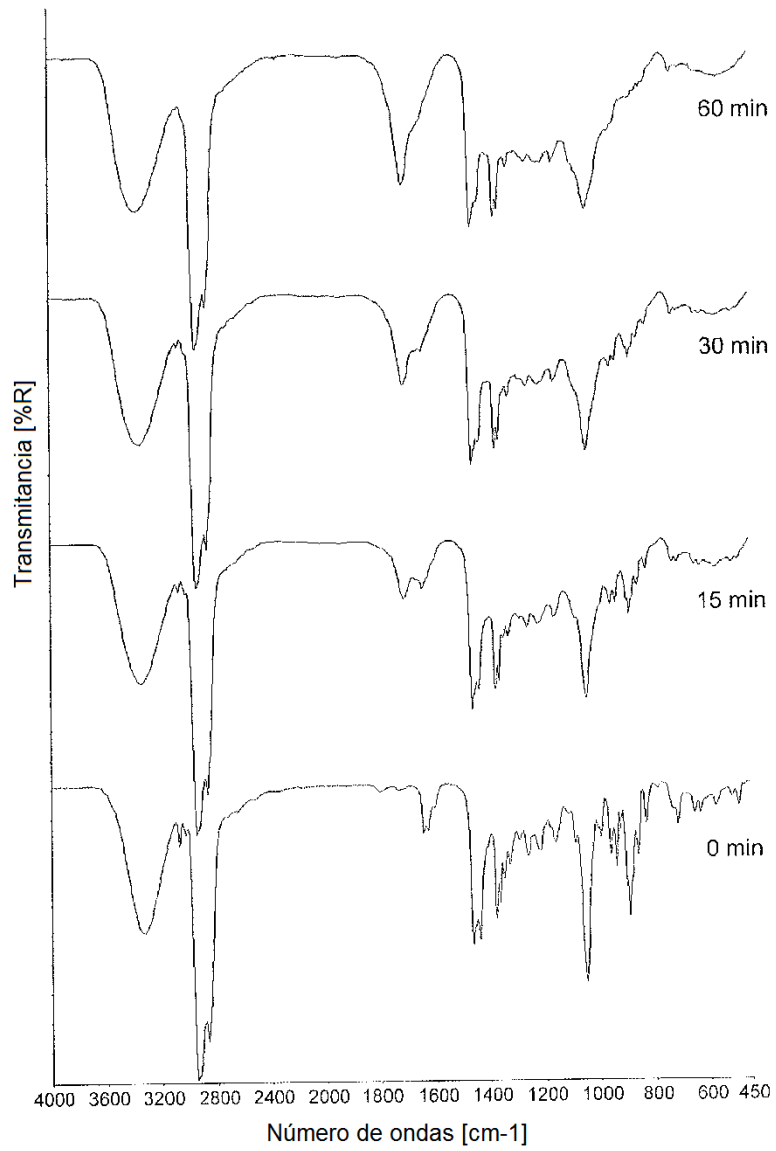


Fig. 25

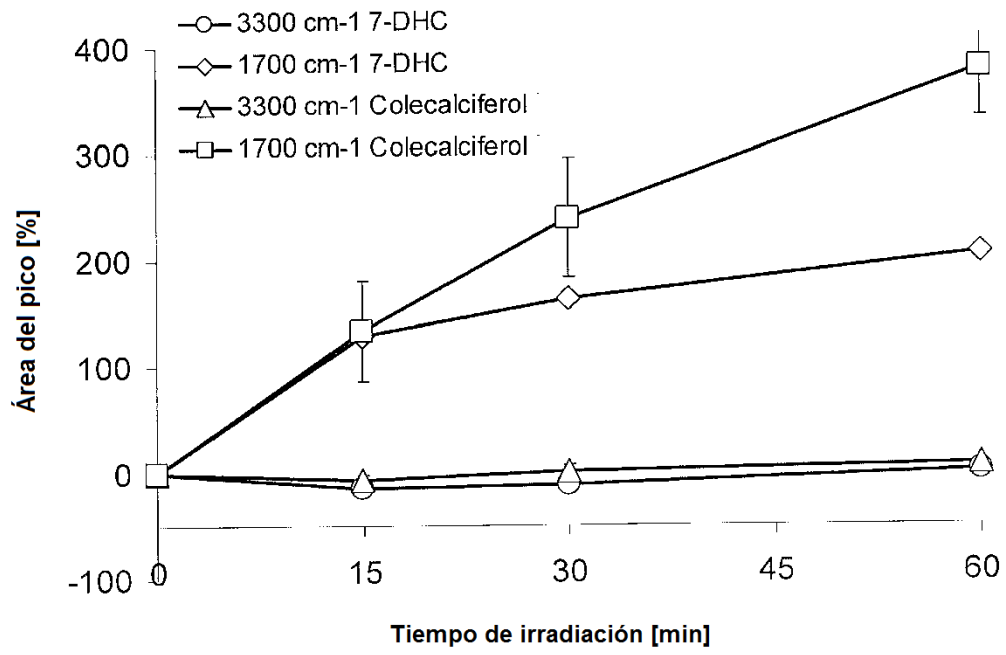


Fig. 26

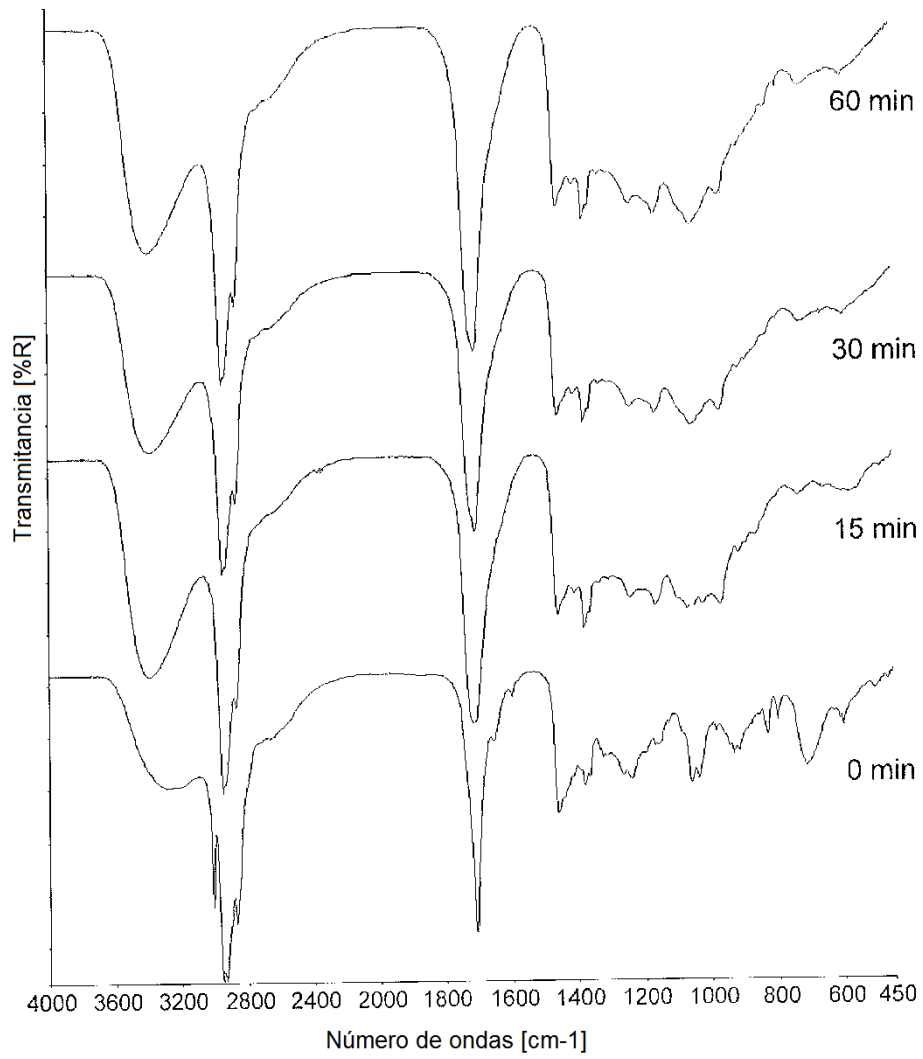


Fig. 27

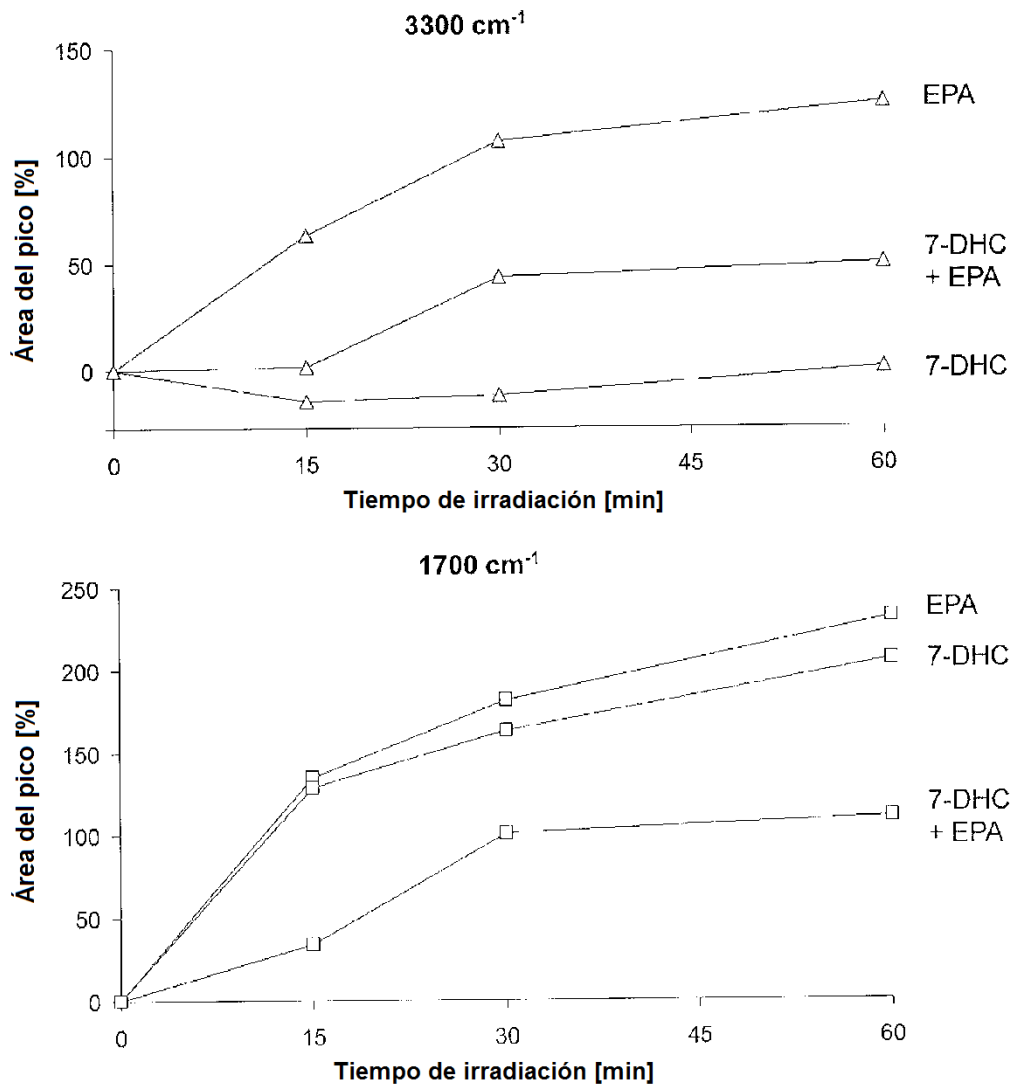


Fig. 28

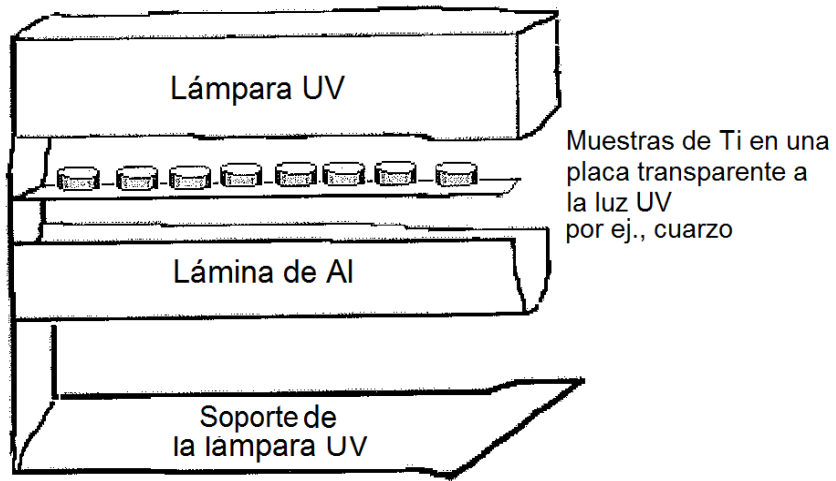


Fig. 29