

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 021**

51 Int. Cl.:

A61L 27/04	(2006.01)
A61L 27/06	(2006.01)
A61L 27/28	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01)
A61L 31/02	(2006.01)
A61L 31/08	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013 PCT/EP2013/058116**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14169959**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013 E 13718169 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2986330**

54 Título: **Implantes para inducir la integración de tejidos blandos y duros**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2019

73 Titular/es:

NUMAT MEDTECH, S.L. (100.0%)
Parc Bit, Edificio Naorte, P4 Carretera de
Valldemosa Km. 7
07121 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES

72 Inventor/es:

MONJO CABRER, MARTA;
RAMIS MOREY, JOANA MARÍA;
CÓRDOBA INSENSÉ, ALBA;
SATUÉ SAHÚN, MARÍA y
GÓMEZ FLORIT, MANUEL

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 706 021 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 para inducir la integración de tejidos blandos y duros

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de los implantes biocompatibles, en particular, a los implantes biocompatibles que comprenden al menos un metal tal como titanio, circonio, tantalio, hafnio, niobio, aleación de cromo-vanadio y acero inoxidable, o una aleación de los mismos. Más específicamente, la presente invención se refiere a implantes biocompatibles que comprenden una superficie de metal, aleación de metal y/u óxido de metal que comprende un recubrimiento que proporciona una mejor oseointegración y una conexión de tejidos blandos de dicho implante biocompatible cuando se implanta en un cuerpo de mamífero.

Antecedentes de la invención

El uso de implantes para restablecer la función de los tejidos conectivos traumatizados o degenerados y, por ende, para mejorar la calidad de vida de un paciente se ha generalizado. El éxito a largo plazo de los implantes dentales depende en gran medida de una curación rápida con una integración segura en el hueso de la mandíbula y el tejido blando. La integración del componente intraóseo del implante dental y el componente transmucoso (pilar) con el tejido duro (hueso) y el tejido blando (encía), respectivamente, es esencial para minimizar el fracaso de un implante dental.

La oseointegración se define como la conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo y la superficie de un implante artificial de carga. La investigación actual de biomateriales se centra en inducir dicho evento fisiológico seleccionando una molécula química o biológica adecuada capaz de provocarlo. Por otra parte, las propiedades de la superficie del pilar pueden promover la unión de los fibroblastos gingivales y la síntesis de tejido conectivo rico en colágeno, proporcionando un sellado más hermético alrededor del pilar, evitando la penetración bacteriana y la proliferación de células epiteliales gingivales.

El titanio (Ti) y sus aleaciones son los materiales más utilizados con frecuencia como implantes óseos ya que combinan buenas propiedades mecánicas, tales como resistencia elevada, dureza elevada y baja densidad, con una buena biocompatibilidad, causadas por la inercia biológica debido a una capa de óxido con una superficie químicamente estable y un módulo elástico más cercano al de los huesos que a la cerámica o al acero. Los implantes de Ti se aplican en varios sitios; en la mandíbula como implantes dentales y pilares para el hueso y el tejido blando respectivamente, como placas, tornillos, clavos y alambres para facilitar la curación del hueso y como prótesis para la rodilla, la cadera y otras articulaciones. El Ti se usa comúnmente en aplicaciones dentales y ortopédicas, pero también en prótesis endovasculares.

La superficie de Ti es solo bioinerte, por lo que la investigación actual sobre la modificación de superficies de implantes se centra en hacer que los materiales prácticamente bioinertes se vuelvan bioactivos. La gama de modificaciones superficiales varía desde recubrimientos no biológicos, tales como carburo, flúor, calcio, hidroxilapatito o fosfato de calcio, hasta recubrimientos biológicos que unen diferentes biomoléculas a la superficie del implante. Dicha unión, a menudo, se ha llevado a cabo usando, por ejemplo, reactivos químicos, tales como formalina o glutaraldehído, pero la naturaleza reactiva de estos agentes a menudo hace que las biomoléculas se vuelvan biológicamente inactivas y/o con inmunorreactividad aumentada, lo que por supuesto es indeseable.

Las biomoléculas pueden inmovilizarse a través de una variedad de procedimientos, tales como la adsorción, el acoplamiento covalente, las modificaciones electroquímicas de la superficie y las capas orgánicas autoorganizadas sobre la superficie del implante. Se sabe que las capas de óxido en los materiales a base de titanio muestran puntos isoeléctricos alrededor de 4.1 que indican que estas capas de óxido llevan una carga negativa en condiciones *in vivo*. Por lo tanto, las macromoléculas cargadas positivamente en estas condiciones deben adsorberse debido a las interacciones electrostáticas.

Los métodos de unión por adsorción combinan la ventaja de ser simples y aplicables en una extensión casi ilimitada. Los inconvenientes son la estabilidad bastante baja de la fijación de biomoléculas, un comportamiento de liberación no definido de biomoléculas y los posibles cambios conformacionales de las moléculas adsorbidas directamente.

La ventaja de la unión covalente es la fijación estable de la biomolécula, combinada con la posibilidad de preservar la actividad biológica hasta cierto punto si la molécula se combina con enlazadores/espaciadores de suficiente longitud. Sin embargo, si se considera más de una biomolécula para la inmovilización, resulta difícil combinar diferentes moléculas de forma definida en la superficie. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica anterior de concebir estrategias de fijación de superficie covalente que sean exitosas, con recubrimientos estables que mantengan la actividad bioquímica de la biomolécula, en comparación con la adsorción física que no es exitosa para la implantación a largo plazo debido principalmente a la desorción de biomoléculas.

65

Como antioxidantes seleccionados, nunca se ha notificado que tanto los flavonoides como los metoxitriptofoles se fijen covalentemente a la superficie metálica de un implante, directamente o a través de un enlazador. Es más, los metoxitriptofoles nunca han sido notificados en el contexto de la regeneración ósea o implantes y recubrimientos de superficie para mejorar la oseointegración y la unión del tejido blando.

5 Los flavonoides son compuestos fenólicos naturales presentes en frutas y verduras con antioxidantes y con numerosas funciones biológicas, incluidas efectos osteogénicos, antiosteoclastogénicos y antiadipogénicos. Aparte de la capacidad osteogénica de estas biomoléculas, otra propiedad que podría resultar beneficiosa es su efecto antimicrobiano. Los flavonoides se han descrito anteriormente en el documento US 2010/0068238A1 en el contexto
10 de los implantes médicos biocompatibles, tales como prótesis endovasculares, que comprenden una composición para la administración controlada de flavonoides o un derivado de los mismos para la prevención de la reestenosis. No obstante, no se menciona el uso de flavonoides para mejorar la oseointegración o la conexión del tejido blando. El proceso de recubrimiento se basa en el uso de polímeros bioabsorbibles de liberación controlada y no menciona el uso de adhesiones covalentes para unir de forma permanente flavonoides a la superficie del implante.

15 Además, el documento US 2011/0112654A1 desvela un implante óseo recubierto o impregnado con flavonas, que presenta la capacidad de promover la oseointegración, además de reducir la inflamación. Sin embargo, la solicitud se basa en el uso de lactoferrina en implantes de titanio recubiertos por inmersión, que se pueden combinar con otras sustancias, incluidas las flavonas, para reducir la inflamación, aumentar la oseointegración y reducir las
20 bacterias adherentes. Por consiguiente, no menciona el uso de adhesiones covalentes para unir de forma permanente flavonoides a la superficie del implante.

En el documento US 2008/0241211A1 se describe un dispositivo médico para la regeneración ósea que incluye un potenciador osteoinductivo, tal como un flavonoide. Sin embargo, la solicitud describe el uso de flavonoides en
25 aplicaciones de injerto óseo con matriz ósea desmineralizada y esponjas de colágeno, y no describe el uso de flavonoides unidos covalentemente a las superficies del implante. Una solicitud similar es descrita por Wong *et al.* en Biomaterials 27 (2006) 1824-1831 con el uso de la naringina flavonoide en injertos óseos de colágeno. Por lo tanto, una solución de flavonoides es mezclada con la matriz de colágeno y no incluye el uso de superficies de implantes o un método para unir covalentemente flavonoides a superficies de implantes metálicos.

30 Los metoxitriptofoles como el 5-metoxitriptofol y el 6-metoxitriptofol, entre otros, son compuestos indólicos que no son ni un metabolito de la melatonina ni su precursor, y poseen propiedades antioxidantes. Nunca antes se había tenido conocimiento de sus efectos en el hueso o recubiertos en un implante.

35 El documento US 5 782 908 desvela un artículo médico que tiene una superficie metálica en contacto con fluidos corporales con un recubrimiento adherente. El recubrimiento se fabrica aplicando primero a la superficie un compuesto de silano con una función de vinilo colgante, de modo que el silano se adhiere a la superficie. En una etapa distinta, se forma un polímero de injerto en la superficie con el vinilsilano aplicado, de manera que la funcionalidad de vinilo colgante del vinilsilano se incorpora al polímero de injerto mediante un enlace covalente con
40 el polímero. Las biomoléculas se pueden unir covalentemente a la capa base.

A pesar de la disponibilidad de implantes biocompatibles en la técnica actual, todavía existe la necesidad de identificar implantes biocompatibles alternativos que puedan facilitar aún más la oseointegración de un implante cuando se introduce en un cuerpo de mamífero. Además, existe una limitación de la mayoría de las técnicas
45 disponibles con respecto a la absorción física (unión lábil) de estos compuestos sobre la superficie del implante.

Descripción de la invención

De manera sorpresiva, la presente invención proporciona un implante que supera las desventajas técnicas de los
50 implantes expuestos previamente. Por consiguiente, los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que uniendo un flavonoide o metoxitriptofol, un éster del mismo, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una combinación de los mismos a una superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal, tal como una superficie de titanio y/o de aleación de titanio, de un implante biocompatible, en el que el antioxidante se une covalentemente a la superficie de metal, aleación de metal, u óxido de metal, las propiedades de
55 oseointegración y de conexión al tejido blando del implante pueden facilitarse enormemente. Tal implante biocompatible no se ha conocido ni es implícito previamente en el campo.

El implante de la presente invención presenta una mejora de la fijación de la biomolécula activa, en este caso, antioxidantes, a la superficie de la base metálica. Además, esta fijación es mejorada cuando se usa un enlazador
60 con ciertas características, y aún más cuando se lleva a cabo una reducción del complejo enlazador-antioxidante. Este efecto técnico se demuestra al mostrar que en los implantes en los que el antioxidante se ha fijado mediante la unión covalente a la superficie del implante, el antioxidante no se libera a los medios (véase los ejemplos 1, 2 y 3).

Además, tanto los citoblastos mesenquimales humanos como los fibroblastos gingivales cultivados en implantes en
65 los que el antioxidante se ha unido covalentemente mostraron una diferenciación superior a las células cultivadas en

los implantes en los que el antioxidante simplemente estaba físicamente unido. Este efecto sorprendente se ha demostrado al mostrar que los genes implicados en la producción y organización de la matriz extracelular y en la regulación de la adhesión celular, tal como colágenos y la proteína Runx2, aumentaron su expresión en células cultivadas en implantes en los que el antioxidante se ha unido covalentemente (véase los ejemplos 2 y 3). Esta capacidad hace que el implante de la presente invención sea una alternativa ideal en tratamientos en los que se requiere la regeneración de tejidos tanto duros como blandos, tal como en implantes dentales para tornillos y pilares.

Adicionalmente, el implante de la presente invención permite minimizar los efectos fisiológicos no deseados que se producen normalmente alrededor de las zonas implantadas, tales como inflamación. En células cultivadas en implantes con antioxidantes unidos covalentemente, la expresión de los niveles de ARNm de interleucina-6 disminuyó como se muestra en el ejemplo 2.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un implante biocompatible que comprende uno o más metal(es), aleación(es) de metal, óxido(s) de metal o una combinación de los mismos, en el que un compuesto antioxidante se selecciona entre el grupo de flavonoides o metoxitriptoles, un éster de los mismos, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o una combinación de los mismos, se recubre(n) en al menos una parte de una superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal de dicho implante biocompatible, en el que el antioxidante está unido covalentemente a la superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal.

Cuando se hace referencia a "al menos una parte de una superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal", esto significa que una superficie de metal, aleación de metal, óxido de metal o una combinación de las mismas de un implante no necesita estar completamente recubierta por antioxidantes unidos covalentemente, pero algunas partes de la superficie de metal, aleación de metal y/u óxido de metal pueden carecer de un recubrimiento antioxidante, contener un menor cantidad de antioxidante y/o algunas partes de la superficie de metal, aleación de metal y/u óxido de metal también pueden comprender antioxidante físicamente unido además del antioxidante unido covalentemente, p. ej., si permanece después del tratamiento de la superficie para unir el antioxidante al mismo. Además, algunas partes de la superficie del implante de acuerdo con la invención no necesitan comprender un metal, aleación de metal y/u óxido de metal, sino que pueden comprender otros materiales, o combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, el compuesto flavonoide comprende al menos un grupo carbonilo, y más preferentemente aquellos seleccionados entre quercitrina, taxifolina, galangina, diosmetina, crisina o derivados de las mismas.

En otra realización preferida, el compuesto de metoxitriptofol se selecciona entre 5-metoxitriptofol o 6-metoxitriptofol.

En otra realización preferida, en el implante biocompatible, un enlazador está unido a dicha superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal y a dicho antioxidante, éster de dicho compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una combinación de los mismos.

Siempre que se mencione un enlazador en el contexto de la presente invención, esto se refiere a una entidad química que se usa para unir dicho antioxidante, un éster, una sal farmacéuticamente aceptable, o una combinación de los mismos, a la superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal del implante biocompatible, formando así un enlace covalente entre el antioxidante y el enlazador y entre dicho enlazador y el metal, la aleación de metal y/u el óxido de metal. Así, una parte del enlazador reacciona con, y por lo tanto se une a, la superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal. Otra parte del enlazador reacciona con dicho antioxidante y se une al mismo, formando así un enlace covalente (u otro tipo de interacciones químicas tales como fuerzas electrostáticas) entre dicho antioxidante y dicha superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal. Esto puede proporcionar una superficie de dicho implante biocompatible que es un modulador particularmente activo, preferentemente mejorador, de la oseointegración y la conexión del tejido blando. Ejemplos de enlazadores que pueden usarse en el contexto de la presente invención son enlazadores seleccionados entre el grupo que consiste en anhídridos, alcoholes, ácidos, aminas, epóxidos, isocianatos, silanos, tiol, alquilo, arilo, grupos halogenados y grupos polimerizables.

En una realización preferida, el enlazador es un silano, y más preferentemente 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) o ácido trietoxisilanopropilsuccínico (TESPSA).

En otra realización preferida, el enlazador es un poliéter y más preferentemente polietilenglicol (PEG) o cualquiera de sus derivados. En la presente invención, dichos derivados de PEG contienen una base de molécula de PEG con una variedad de grupos reactivos, grupos funcionales o marcadores:

- con un grupo, con dos grupos (idénticos = homobifuncionales; diferentes: heterobifuncionales) y más grupos (multifuncionales) siendo dichos grupos, por ejemplo, pero no limitados a, amina, carboxilo, aldehído, tiol, hidroxilo, succinimilo, carbonil-imidazol, tosilo, nitrofenilcarbonato, maleimidilo, disulfuro de O-piridilo, hidrazida, azida, alquino, isocianato, epóxido o silano.

- con marcadores o ligandos tales como, pero no se limitan a, biotina, fluoresceína o DSPE.

En otra realización preferida, el(los) metal(es), aleación(es) de metal u óxido(s) de metal del implante se selecciona(n) entre el grupo que consiste en titanio, una aleación o un óxido del mismo, circonio, una aleación o un
5 óxido del mismo, tantalio, una aleación o un óxido del mismo, hafnio, una aleación o un óxido del mismo, niobio o una aleación o un óxido del mismo, una aleación de cromo-vanadio y acero inoxidable. En una realización más preferida, el metal, la aleación de metal u óxido de metal es titanio.

En la presente invención, el término "implante" incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo destinado a ser
10 implantado en el cuerpo de un animal vertebrado, en particular un mamífero, tal como un ser humano. Los ejemplos no limitativos de tales dispositivos son dispositivos médicos que reemplazan la anatomía o restauran una función del cuerpo, tal como la articulación de la cadera femoral; la cabeza femoral; copa acetabular; prótesis endovasculares, codo incluyendo vástagos, cuñas, insertos articulares; rodilla, incluyendo componentes femoral y tibial, vástagos, cuñas, insertos articulares o componentes patelares; hombros incluyendo vástago y cabeza; muñeca; tobillos; mano;
15 dedos; pies; vértebras; discos espinales; articulaciones artificiales; implantes dentales; implantes osiculoplásticos; implantes del oído medio, que incluyen yunque, martillo, estribos, yunque-estribo, martillo-yunque, martillo-yunque-estribo; implantes cocleares; dispositivos ortopédicos de fijación como clavos, tornillos, grapas y placas; válvulas cardíacas; marcapasos; catéteres; vasos; implantes de relleno de espacio; implantes para la retención de audífonos; implantes para la fijación externa; discos protésicos para la fijación de la columna y también dispositivos intrauterinos
20 (DIU), así como dispositivos bioelectrónicos, tales como dispositivos electrónicos intracocleares o intracraneales. Se incluyen también los implantes quirúrgicos.

En una realización preferida, el implante de la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en un implante quirúrgico, un implante ortopédico, un implante dental, un dispositivo de fijación ortopédica, un reemplazo
25 ortopédico de articulación, un disco protésico para la fijación de la columna o un material de injerto, preferentemente un armazón de óxido de metal que comprende óxido de titanio.

En el presente contexto, la expresión "implante ortopédico" incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo que tiene por objeto ser implantado en el cuerpo de un animal vertebrado, en particular un mamífero, tal como un ser
30 humano, para la preservación y restauración de la función del sistema musculoesquelético, particularmente las articulaciones y los huesos, incluido el alivio del dolor en estas estructuras. Dentro de este contexto también se contemplan dispositivos ortopédicos de fijación y reemplazos ortopédicos de articulaciones.

En el presente contexto, la expresión "implante dental" incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo que tiene
35 por objeto ser implantado en la cavidad bucal de un animal vertebrado, en particular un mamífero, tal como un ser humano, en procedimientos de restauración dental. Los implantes dentales también se pueden denotar como dispositivos protésicos dentales. Generalmente, un implante dental se compone de una o varias partes del implante. Por ejemplo, un implante dental comprende generalmente una fijación dental acoplada a partes secundarias del implante, tales como un pilar y/o una restauración dental tal como una corona, un puente o una dentadura postiza.
40 Sin embargo, cualquier dispositivo, tal como una fijación dental, destinada al implante solo puede denominarse implante, incluso si otras partes deben conectarse al mismo.

En el contexto de la presente invención, los términos "implante", "implante médico", "material de injerto", "dispositivo" y "dispositivo médico" pueden usarse indistintamente en la presente memoria. Queda entendido que en todos los
45 aspectos de la presente invención, siempre que se haga referencia en la presente memoria a un "implante biocompatible" o a un "implante", esto incluye cualquiera de los implantes mencionados en la presente memoria y/o que el experto en la materia sabe que son adecuados para el presente fin.

En otra realización preferida, otras biomoléculas están presentes en una aleación de metal metálico o en una
50 superficie de óxido de metal del implante, dichas biomoléculas se seleccionan entre el grupo que consiste en biomoléculas naturales, biomoléculas sintéticas y biomoléculas recombinantes, tales como bioadhesivos, factores de adhesión celular, biopolímeros, proteínas sanguíneas, enzimas, proteínas y biomoléculas de matriz extracelular, factores de crecimiento y hormonas, ácidos nucleicos (ADN y ARN), receptores, biomoléculas sintéticas, vitaminas, fármacos, bifosfonatos, iones biológicamente activos, flúor y biomoléculas marcadoras.
55

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para producir un implante biocompatible como se ha descrito previamente, que comprende reaccionar un compuesto antioxidante como se ha definido previamente con la superficie de dicho implante biocompatible.

60 En una realización preferida, dicho método comprende las etapas que consisten en:

- pretratar químicamente la superficie de un implante, y
- reaccionar un compuesto antioxidante como se ha definido previamente con dicha superficie pretratada químicamente;

65

en el que, antes de la etapa b), se realiza una etapa que consiste en hacer reaccionar un enlazador como se ha definido previamente con dicha superficie pretratada químicamente obtenida en la etapa a), y en el que en la etapa b) se hace reaccionar el compuesto antioxidante con dicho enlazador, o alternativamente, en el que, antes de la etapa b), se realiza una etapa que consiste en hacer reaccionar un enlazador como se ha definido previamente con dicho compuesto antioxidante, y en el que en la etapa b) se hace reaccionar el conjugado antioxidante-enlazador con dicha superficie pretratada obtenida en la etapa a).

Los antioxidantes seleccionados se inmovilizan en la superficie del implante por acoplamiento covalente. En otra realización preferida, después de hacer reaccionar el compuesto antioxidante con el enlazador, se realiza una etapa de reducción. Esta etapa puede llevarse a cabo por cualquier agente de reducción conocido en la técnica, aunque se prefiere el cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3).

En una realización preferida, la etapa de pretratamiento se selecciona entre ataque piraña, pasivación, irradiación UV, ataque ácido o alcalino.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para introducir un implante biocompatible como se define en la presente memoria en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en proporcionar un implante biocompatible que comprende uno o más metales, aleaciones de metal y/u óxidos de metal, en el que al menos a una parte de una superficie de metal, aleación metálica u óxido de metal de dicho implante biocompatible, se une covalentemente un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en flavonoides o metoxitriptófoles, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y una combinación de los mismos y, posteriormente, introducir dicho implante en dicho paciente mediante un procedimiento quirúrgico. Un implante de la invención puede introducirse en un paciente que necesita un reemplazo de una parte del cuerpo, tal como una cadera o una rodilla, y en la que se necesita una modulación, preferentemente una mejora, de las propiedades de oseointegración.

El paciente es preferentemente un mamífero, y más preferentemente un ser humano.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden usar en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Estructuras moleculares de taxifolina (a) y quercitrina (b).

Fig. 2. (1) Reacción de la superficie de Ti/TiO_2 pretratada con (3-aminopropil)triétoxisilano (APTES). (2) Reacción del grupo amina de APTES con el grupo carbonilo del flavonoide para formar una base de Schiff ($-\text{C}=\text{N}-$) y (3) reducción de la base de Schiff con NaCNBH_3 para dar un enlace $-\text{C}-\text{NH}-$ estable.

Fig. 3. Comparación de espectros promedio de FTIR-ATR de muestras de Ti/TiO_2 recubiertas por colada por caída con a) taxifolina y b) quercitrina, con el espectro del compuesto puro. Cada espectro corresponde al promedio de al menos diez puntos de medición a lo largo de la superficie del implante.

Fig. 4. FTIR de flavonoides injertados covalentemente a superficies de Ti irradiadas con UV. a) Espectros de FTIR-ATR de una superficie recubierta con taxifolina por formación de base de Schiff, pretratada con UV. Cada espectro corresponde a un punto de medición en la superficie del implante. Los puntos de medición están marcados en la imagen insertada. Las bandas corresponden a taxifolina. Se puede asignar una banda a 2900 cm^{-1} al estiramiento de CH_2 alifático que indica la presencia del reticulador APTES. b) Comparación de los espectros de FTIR obtenidos en superficies de base de Schiff de quercitrina no reducida y FL6 reducida. Cada espectro corresponde al promedio de 10 puntos de medición a lo largo de la superficie.

Fig. 5. FTIR de taxifolina injertado covalentemente a superficies de Ti pasivadas a) Espectros de FTIR-ATR de superficies de base de Schiff en comparación con los espectros de taxifolina pura. Cada espectro corresponde al promedio de diez. B) Comparación de espectros de FTIR de superficie reducida de $\text{Ti/TiO}_2/\text{APTES}/\text{taxifolina}$ con taxifolina pura.

Fig. 6. Comparación de los espectros de FTIR de la superficie reducida de $\text{Ti/TiO}_2/\text{APTES}/\text{quercitrina}$ obtenida sobre sustratos pasivados y quercitrina pura.

Fig. 7. Perfil de liberación de flavonoides en medios acuosos (pH 7,5, 37 °C) de muestras recubiertas mediante colada por caída (parte superior) y enlazadas covalentemente por la formación de base de Schiff (parte inferior), simulando cambios en los medios de cultivo de HGF. Izquierda: sustratos recubiertos con taxifolina, derecha: recubiertos con quercitrina.

5

Fig. 8. La actividad de LDH se midió en medios de cultivo recogidos después de 48 horas de tratamiento en fibroblastos gingivales humanos. El control alto (100 % de citotoxicidad) fue un medio de cultivo celular de células tratadas con Triton X-100 al 1 %. El control bajo (0 % de citotoxicidad) fue un medio de cultivo celular de las células del vehículo de control. El porcentaje de actividad de LDH se calculó usando la siguiente ecuación: Citotoxicidad (%) = (valor de exp. - control bajo)/(control alto - control bajo) * 100. Los valores representan la media ± EEM (N = 8). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student: * a <0,05 versus control (FL13B para grupos FL13; FL14A para grupos FL14 y FL15).

10

Fig. 9. Micrografías de microscopio electrónico de barrido de fibroblastos gingivales humanos en las diferentes superficies. Barra de escala = 500 µm.

15

Fig. 10. Citoesqueleto y núcleos de inmunotinción de fibroblastos gingivales humanos en las diferentes superficies. Barra de escala = 25 µm.

20

Fig. 11. Efecto de las diferentes superficies sobre los niveles de expresión de ARNm de IL6 en fibroblastos gingivales humanos cultivados durante 14 días. Los datos se normalizaron a los genes de referencia (beta-actina y GAPDH), expresados como porcentaje de control que se estableció en 100 % (FL13B para grupos FL13; FL14A para grupos FL14 y FL15). Los valores representan la media ± EEM (N = 6). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de t de Student: (a) p < 0,05 versus control (FL13B para grupos FL13; FL14A para grupos FL14 y FL15); (b) p < 0,05 diferencias entre flavonoides en el mismo grupo.

25

Fig. 12. Efecto de las diferentes superficies sobre los niveles de expresión de ARNm de COL3A1 en fibroblastos gingivales humanos cultivados durante 14 días. Los datos se normalizaron a los genes de referencia (beta-actina y GAPDH), expresados como porcentaje de control que se estableció en 100 % (FL13B para grupos FL13; FL14A para grupos FL14 y FL15). Los valores representan la media ± EEM (N = 6). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de t de Student: (a) p < 0,05 versus control (FL13B para grupos FL13; FL14A para grupos FL14 y FL15); (b) p < 0,05 diferencias entre flavonoides en el mismo grupo; (c) p < 0,05 FL14QR vs. FL15QR.

30

Fig. 13. Perfil de liberación de flavonoides en medios acuosos (pH 7,5, 37 °C) de muestras recubiertas mediante colada por caída (parte superior) y enlazadas covalentemente por la formación de bases de Schiff (parte inferior) simulando cambios en los medios de cultivo de hUC-MSC. Izquierda: sustratos recubiertos con taxifolina, derecha: recubiertos con quercitrina.

35

Fig. 14. La actividad de LDH se midió en medios de cultivo recogidos después de 48 horas de tratamiento en fibroblastos gingivales humanos. El control alto (100 % de citotoxicidad) fue un medio de cultivo celular de células tratadas con Triton X-100 al 1 %. El control bajo (0 % de citotoxicidad) fue un medio de cultivo celular de las células del vehículo de control. El porcentaje de actividad de LDH se calculó usando la siguiente ecuación: Citotoxicidad (%) = (valor de exp. - control bajo)/(control alto - control bajo) * 100. Los valores representan la media ± EEM (N = 6).

40

45

Fig. 15. Micrografías de microscopio electrónico de barrido de células madre mesenquimales umbilicales humanas en las diferentes superficies. Barra de escala = 500 µm.

50

Fig. 16. Citoesqueleto y núcleos de inmunotinción de células madre mesenquimales umbilicales humanas en las diferentes superficies. Barra de escala = 50 µm.

Fig. 17. Efecto de las diferentes superficies en los niveles de expresión de ARNm de Coll-1, Oc, Alp y Runx2 en células madre mesenquimales umbilicales humanas cultivadas durante 14 días. Los datos se normalizaron a los genes de referencia (beta-actina y GAPDH), expresados como porcentaje de control que se estableció en 100 % (FL16B para grupos FL16; FL17A para grupos FL17 y FL18). Los valores representan la media ± EEM (n = 6). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student: (a) p < 0,05 versus control (FL16B para los grupos FL16; FL17A para los grupos FL17 y FL18); (b) p < 0,05 diferencias entre flavonoides en el mismo grupo; (c) p < 0,05 diferencias entre grupos para el mismo flavonoide.

55

60

Fig. 18. Inmovilización covalente de 5-metoxitriptofol en sustratos de Ti/TiO₂. (1) Reacción de la superficie de Ti/TiO₂ pretratada con anhídrido trietoxisililpropil succínico (TESPSA). (2) Reacción del grupo hidroxilo de 5-metoxitriptofol con el grupo anhídrido de ácido del silano para formar un éster.

65

Fig. 19. Comparación de los espectros promedio de FTIR-ATR de muestras de Ti/TiO₂ recubiertas por colada por

caída con 5-metoxitriptofol, con el espectro del compuesto puro. Cada espectro corresponde al promedio de al menos diez puntos de medición a lo largo de la superficie del implante.

Ejemplos

5

EJEMPLO 1 INMOVILIZACIÓN DE FLAVONOIDES EN SUPERFICIES DE TITANIO POR ADSORCIÓN, UNIÓN COVALENTE Y PROCEDIMIENTOS DE COLADA POR CAÍDA.

Este ejemplo muestra cómo los flavonoides taxifolina y quercitrina (Figura 1) pueden inmovilizarse sobre superficies de titanio mediante diferentes metodologías.

10

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Reactivos y materiales.

15

Los discos de titanio, calidad qp IV, pulidos o mecanizados, tenían un diámetro de 6,25 mm y una altura de 2 mm. La acetona técnica fue comprada a Fisher Scientific. El ácido nítrico 69,5 %, calidad de reactivo, etanol absoluto y tolueno anhidro fueron adquiridos en Scharlau. El agua desionizada milliQ se obtuvo a partir de un sistema Millipore. La solución Hellmanex III fue adquirida en Helima Hispania. (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES), taxifolina, quercitrina y NaCNBH₃ 5 M en NaOH 1 M se adquirieron en Sigma.

20

1.2 Limpieza de titanio y pretratamiento de la superficie

Los discos de Ti de calidad 4 pulidos o mecanizados se limpiaron de acuerdo con las siguientes etapas: Inmersión en agua desionizada (DI) durante 30 s, seguido de etanol al 70 % durante 30 s. Acto seguido ultrasonificación en agua DI a 40 °C, 5 min. Inmersión en NaOH al 40 %, 40 °C, 10 min. De nuevo ultrasonificación en agua DI a 40 °C, 5 min. Enjuagados con agua desionizada hasta pH = 6. Ultrasonificación en agua DI, 50 °C, 5 min. Inmersión en HNO₃ al 50 %, 50 °C, 10 min. Nuevamente ultrasonificación en agua DI, 40 °C, 5 min. Finalmente, los discos de Ti se enjuagaron con agua DI hasta pH = 6 y se almacenaron en etanol al 70 %.

30

Las superficies de Ti se hidrolizaron antes del procedimiento de inmovilización de flavonoides de acuerdo con uno de los siguientes métodos: irradiación UV o pasivación. *Irradiación UV*: las superficies de Ti se expusieron a irradiación UV ($\lambda = 302$ nm) durante 48 h inmediatamente antes de la inmovilización de flavonoides. Esto asegura una alta hidrofiliidad (ángulo de contacto = 0°) inmediatamente después. *Pasivación*: la pasivación de los discos de titanio se realizó siguiendo la norma ASTM F86: inmersión en una solución de agua 3:7 (v/v) HNO₃-DI, 30 min, temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua desionizada y se colocaron en un baño de agua ultrapura recubierto durante 24 h. Los implantes se secaron en una corriente de nitrógeno inmediatamente antes de la siguiente etapa de funcionalización.

35

40 1.3 Inmovilización por adsorción (ejemplo de referencia)

Los implantes de Ti pretratados se sumergieron en una solución de flavonoides en etanol (taxifolina 400 μ M o quercitrina 1.000 μ M) y se agitaron 24 h a 4 °C. Luego, los discos se enjuagaron con etanol y se secaron con N₂.

45 1.4 Inmovilización por colada por caída (ejemplo de referencia)

Los sustratos de Ti pretratados se colocaron en una placa de 96 pocillos y 10 μ l de solución de flavonoides en etanol absoluto se depositaron por caída en cada superficie del implante. Los implantes se dejaron secar al aire durante 30 min.

50

1.5 Inmovilización covalente (Ejemplo de la invención)

La Figura 2 muestra el procedimiento para el injerto covalente de taxifolina y quercitrina en superficies de Ti/TiO₂ pretratadas. La inmovilización covalente se realizó en dos o tres etapas en función del producto final deseado: base de Schiff o base de Schiff reducida. La formación de la base de Schiff (enlace C=N reversible entre APTES y flavonoide) se llevó a cabo en dos etapas: 1) Silanización del sustrato con APTES, 2) Inmovilización de biomoléculas por reacción del grupo carbonilo flavonoide con el grupo amina del silano dando una base de Schiff. Se obtuvieron bases de Schiff reducidas (enlace C-NH irreversible) agregando una tercera etapa 3) Reducción con NaCNBH₃.

55

60 1) *Silanización de los sustratos de TiO₂/Ti con (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES)*: La etapa de silanización se realizó inmediatamente después del tratamiento previo con Ti, en condiciones anhidras, sumergiendo los implantes en una solución de APTES al 2 % v/v en tolueno seco para 24 h a temperatura ambiente. Los discos entonces silanizados se enjuagaron con cuidado con tolueno, acetona y etanol y se secaron con N₂.

60

65 2) *Inmovilización de taxifolina y quercitrina (formación de la base de Schiff)*: Los discos silanizados se

65

sumergieron en una solución flavonoide 1 mM en agua a pH 5, se agitaron 1 h a TA, se enjuagaron con agua DI y se secaron con N₂.

- 5 3) *Formación de enlace irreversible (reducción de la base de Schiff)*: Inmediatamente después de la etapa de enlace del flavonoide, los discos se sumergieron en una solución de 50 µM de NaCNBH₃ en agua DI y se agitaron 1 hora a temperatura ambiente, se enjuagaron dos veces con agua DI y se secaron con N₂.

1.6 Caracterización físico-química de la superficie mediante espectroscopia infrarroja - reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) acoplada a microscopía óptica.

10 Las muestras se caracterizaron usando un espectrofotómetro FTIR-ATR (Bruker Tensor 27) acoplado a un microscopio UV-vis/IR (Bruker Hyperion 3000). Para cada muestra, se seleccionó un área representativa de la superficie del implante y se seleccionaron al menos 10 puntos de medición aleatorios. Se registró un espectro FTIR para cada punto (resolución: 4 cm⁻¹, n.º barridos: 16, referencia: aire). Se midieron dos réplicas de la muestra. Los espectros FTIR de taxifolina y quercitrina puras se obtuvieron a partir de soluciones madre 50 mM en etanol usando el accesorio ATR (se depositaron 4 µl de la solución de biomolécula en el cristal ATR y la medición se realizó después de la evaporación del disolvente).

1.7 Liberación de biomoléculas por espectrometría UV-vis

20 La liberación de biomoléculas a partir de implantes funcionalizados después de 24 h de incubación en agua a pH 7,5 y 37 °C se determinó mediante espectroscopia UV-Vis. Los implantes se colocaron en una placa de 96 pocillos y se agregaron 200 µl de agua a pH 7,5 a cada pocillo. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego, se retiró una alícuota de 150 µl y se midió la absorbancia (λ_{\max} taxifolina = 290 nm, λ_{\max} quercitrina = 350 nm) usando un espectrofotómetro lector de placas UV-vis Biotek. Se midieron dos réplicas de la muestra.

RESULTADOS

1.11 Resultados para técnica de adsorción

30 La Tabla 1 muestra los experimentos llevados a cabo para inmovilizar taxifolina y quercitrina por adsorción en discos pulidos con Ti, ya sea pasivados (FL1) o tratados con UV (FL2). Para verificar la presencia de los flavonoides en los sustratos, la cantidad de biomoléculas liberadas en agua a pH 7,5 para simular las condiciones fisiológicas se determinó mediante espectroscopia UV-Vis después de 24 horas de incubación a 37 °C.

35 *Tabla 1. Experimentos de adsorción llevados a cabo para la funcionalización de sustratos de Ti con taxifolina (TX) y quercitrina (QR) y biomolécula liberada al medio acuoso a pH 7,5, después de 24 h de incubación a 37 °C. C es la concentración de flavonoides liberados en 200 µl de medio acuoso.*

Método de Inm.	Experimento	Pretratamiento con Ti	Biomolécula	C µM, 24 h	
Adsorción	FL1	Pasivación	FL1 TX	20,88 ±	3,30
			FL1 QR	39,23 ±	13,51
	FL2	UV	FL2 TX	21,87 ±	7,53
			FL2 QR	30,69 ±	3,28

40 En todos los casos, se detectó taxifolina o quercitrina en el medio acuoso después de 24 h de incubación. La cantidad liberada de quercitrina fue ligeramente más alta que la de taxifolina en ambos experimentos FL1 y FL2, quizás debido a la mayor concentración inicial de quercitrina usada (quercitrina 1 mM, 400 µM de taxifolina). Comparando los pretratamientos de Ti, la cantidad de flavonoides liberados de las muestras de adsorción es similar para los pretratamientos de Ti, la pasivación y la radiación UV.

50 **1.12 Resultados para técnica de colada por caída:** La Tabla 2 muestra los experimentos llevados a cabo para inmovilizar taxifolina y quercitrina por colada por caída. Se usó Ti mecanizado para estos experimentos, ya que este método también se usó para probar el efecto *in vitro* de los implantes (Ejemplos 2 y 3) y se prefieren las superficies mecanizadas para los estudios *in vitro*. La pasivación se usó como tratamiento previo de Ti.

55 La Figura 3 muestra los espectros FTIR obtenidos en diferentes puntos de medición de implantes colados por caída. Al comparar los espectros obtenidos con el del flavonoide puro, se muestra claramente que la taxifolina o la quercitrina se detectaron de manera homogénea en las superficies de Ti coladas por caída. La tabla 2 también muestra la cantidad de biomolécula liberada de la superficie del implante al medio acuoso después de 24 h de incubación a 37 °C, medida por espectroscopia UV-Vis. La liberación máxima de biomoléculas esperada para el experimento FL13 fue de 30 µM de taxifolina y 500 µM de quercitrina, y para el experimento FL16 de 100 µM de taxifolina y 250 µM de quercitrina. Como muestra la Tabla, en todos los casos se detectó claramente taxifolina o quercitrina en el medio después de la incubación de 24 h.

Tabla 2. Experimentos por colada por caída realizados para la funcionalización de sustratos de Ti con taxifolina (TX) y quercitrina (QR) y biomolécula liberados al medio acuoso a pH 7,5, después de una incubación de 24 h a 37 °C. C es la concentración de flavonoide liberado a 200 µl de agua en medio acuoso. C_{máx} esperado es la concentración esperada de biomoléculas suponiendo que la cantidad total del flavonoide inicialmente agregado se libera en estas condiciones.

Método por inm.	Experimento	Biomolécula	C µM, 24 h	C _{max} esperado µM
Colada por caída	FL13	FL13 TX	28,5 ± 1,8	30
		FL13 QR	408,3 ± 18,4	500
	FL16	FL16 TX	98,8 ± 3,3	100
		FL16 QR	167,6 ± 13,2	250

1.13. Resultados para la técnica de inmovilización covalente

La Tabla 3 muestra los grupos evaluados para inmovilizar covalentemente taxifolina y quercitrina en sustratos de Ti. Los sustratos de Ti fueron irradiados con UV o pasivados. Para cada tratamiento previo, se evaluaron la formación de la base de Schiff y la reducción de la base de Schiff. Las muestras se caracterizaron mediante espectroscopia FTIR-ATR para verificar la presencia del flavonoide en la superficie. También se determinó la liberación de biomoléculas después de 24 h de incubación en agua a pH 7,5 y 37 °C.

Tabla 3. Funcionalización covalente de sustratos de Ti con taxifolina (TX) y quercitrina (QR) a través de un agente de acoplamiento APTES. La tabla muestra el tratamiento previo con Ti (irradiación UV o pasivación), la reducción o no de la base de Schiff obtenida, la biomolécula usada y la liberación (C µM) de flavonoides al medio acuoso después de 24 h de incubación en agua a pH 7,5 y 37 °C.

Método por inm.	Pretratamiento Ti	Etapas de reducción	Biomolécula	C µM, 24 h
Enlace covalente		No	TX	5,06 ± 0,59
			QR	3,33 ± 0,10
	UV	Sí	TX	No det.
			QR	No det.
	Pasivo	No	TX	10,22 ± 1,88
			QR	8,54 ± 0,41
		Sí	TX	No det.
			QR	No det.

Los flavonoides fueron detectados homogéneamente por FTIR-ATR para todos los grupos estudiados. La Figura 4 muestran algunos espectros FTIR representativos obtenidos en muestras pretratadas por UV funcionalizadas. Cada espectro de la Figura 4 corresponde a un punto de medición de una muestra recubierta con taxifolina. Las bandas del espectro correspondían claramente a taxifolina. Se puede asignar una banda a 2.900 cm⁻¹ al estiramiento de CH₂ y las bandas anchas a 1.119-1.009 cm⁻¹ a vibraciones de Si-O-R, lo que indica también la presencia del reticulador APTES. La Figura 4 muestra la presencia de quercitrina injertada en superficies pretratadas con UV, antes y después de la etapa de reducción. Las Figuras 5 y 6 muestran espectros FTIR-ATR representativos de taxifolina y quercitrina injertadas covalentemente en muestras pasivadas. La presencia de bandas de CH₂ a 2.900 cm⁻¹ en todos los espectros FTIR de las muestras funcionalizadas también indica la presencia de APTES en la superficie.

La Tabla 3 también muestra la cantidad de flavonoide liberado después de 24 horas a 37 °C a partir de muestras unidas covalentemente, medida por espectroscopia UV-vis. Como muestra la tabla, en todos los experimentos de formación de bases de Schiff sin etapa de reducción, se detectó taxifolina o quercitrina en el medio acuoso, en bajas concentraciones. El flavonoide detectado podría corresponder a algunos agregados de cristal observados por MEB, siendo probablemente residuos de flavonoides de la etapa de enjuague. Sin embargo, dado que las bases de Schiff tienen enlaces débiles que se hidrolizan rápidamente (se invierten), parte de la concentración detectada también podría corresponder a la hidrólisis de la base de Schiff. Por otra parte, la concentración de flavonoide liberado a los medios acuosos a partir de muestras de base de Schiff reducida no fue detectable. Esto concuerda con la formación esperada de un enlace irreversible entre el flavonoide y la superficie silanizada al reducir la base de Schiff con NaCNBH₃.

CONCLUSIONES EJEMPLO 1

Los flavonoides taxifolina y quercitrina se pueden injertar en las superficies de Ti, ya sea por adsorción, colada por caída y métodos de enlace covalente. La irradiación UV y la pasivación son tratamientos previos efectivos para la activación de la superficie de Ti antes de la inmovilización de la biomolécula.

Las muestras recubiertas con flavonoides por adsorción y colada por caída mostraron una alta liberación del

flavonoide de la superficie después de 24 h de incubación en agua en condiciones fisiológicas.

Las muestras injertadas covalentemente mostraron diferentes comportamientos de liberación dependiendo de la etapa de reducción. Las muestras no reducidas mostraron una baja liberación del flavonoide de la superficie en agua después de 24 h de incubación, mientras que las muestras reducidas en las mismas condiciones no mostraron la liberación del flavonoide. Como el análisis FTIR-ATR de muestras inmovilizadas covalentemente mostró la presencia de los flavonoides en la superficie de Ti tanto para muestras no reducidas como para muestras reducidas, esto demuestra que los flavonoides están unidos covalentemente al sustrato a través del reticulador de silano APTES.

10 EJEMPLO 2 SUPERFICIES DE TITANIO FUNCIONALIZADAS CON FLAVONOIDES: BIOCMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

Las superficies de titanio mecanizadas se funcionalizaron mediante tres metodologías: colada por caída, unión covalente por formación de la base de Schiff y unión covalente por la base de Schiff reducida, como se describe en el Ejemplo 1. El análisis químico de superficie se realizó mediante espectroscopia FTIR-ATR. Los perfiles de liberación de flavonoides hasta 14 días a partir de las diferentes superficies se determinaron mediante espectroscopia UV-Vis. La biocompatibilidad y la bioactividad de las diferentes superficies de titanio recubiertas con flavonoides se evaluaron en modelos de cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos (HGF), como un modelo celular para tejido blando alrededor de los implantes de titanio. Los fibroblastos cultivados en superficies de titanio modificadas con flavonoides se analizaron para analizar la toxicidad celular, determinada por la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) después de 24 horas de incubación, morfología celular, determinada por MEB y tinción del citoesqueleto y de núcleos, y expresión génica de marcadores de diferenciación después de 14 días de cultivo.

La tabla 4 muestra las diferentes superficies producidas. Antes de la inmovilización de biomoléculas, se llevó a cabo la pasivación de discos de titanio mecanizados para todos los grupos.

Tabla 4 Grupos utilizados en el estudio.

Grupo	Modificación
FL13B	Pasivado, Ti/TiO ₂
FL13TX	Colada por caída, Ti/TiO ₂ /taxifolina
FL13QR	Colada por caída, Ti/TiO ₂ /quercitrina
FL14A	Ti silanizado, Ti/TiO ₂ /APTES
FL14TX	Base de Schiff, Ti/TiO ₂ /APTES/taxifolina
FL14QR	Base de Schiff, Ti/TiO ₂ /APTES/quercitrina
FL15TX	Base de Schiff reducida, Ti/TiO ₂ /APTES/taxifolina
FL15QR	Base de Schiff reducida, Ti/TiO ₂ /APTES/quercitrina

2.1. Perfil de liberación de flavonoides por espectroscopia UV-Vis

El perfil de liberación de flavonoides de las superficies recubiertas en medio acuoso, que simula las condiciones fisiológicas (pH 7,5, °C) se midió mediante espectroscopia UV-Vis. Los implantes se colocaron en una placa de 96 pocillos y se agregaron 200 µl de agua a pH 7,5 a cada pocillo. Los medios acuosos (200 µl/muestra) se cambiaron en el punto temporal 1 h, 1 día y 4, 6, 8, 11 días, simulando cambios en los medios de cultivo. Cada vez, se retiró una alícuota de 150 µl y la absorbancia ($A_{\text{taxifolina}} = 290 \text{ nm}$, $A_{\text{quercitrina}} = 350 \text{ nm}$) se midió en una placa Elisa de 96 pocillos usando un espectrofotómetro lector de placas UV-vis Biotek. La concentración de flavonoides se calculó a partir de la interpolación de datos en las curvas de calibración estándar de flavonoides. Se midieron dos réplicas para cada muestra. Los sustratos de Ti pasivados se usaron como muestras en blanco para implantes colados por caída. Los sustratos de Ti silanizados se usaron como blanco para muestras unidas covalentemente.

2.2. Cultivo de células

Los fibroblastos gingivales humanos (HGF) se obtuvieron de Provitro GmbH (Berlín, Alemania). Las células HGF se cultivaron rutinariamente a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % y se mantuvieron en medio de crecimiento de fibroblastos suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 % y antibióticos (50 ng de anfotericina/ml y 50 µg de gentamicina/ml) (Provitro GmbH, Berlín, Alemania). Las células se subcultivaron 1:4 antes de alcanzar la confluencia usando PBS y tripsina/EDTA, según lo recomendado por los proveedores. Los experimentos se realizaron con células HGF en el pase 7.

Los implantes de titanio con forma de moneda se colocaron en placas de 96 pocillos y se sembró HGF a una densidad de $1,0 \times 10^4$ células/pocillo para todas las muestras de control y de ensayo. Se usó tinción con azul de tripano para determinar el número de células total y viable. Los medios de cultivo se renovaron cada dos días. Los medios de cultivo se recogieron después de 24 horas para probar la actividad de LDH. Algunas muestras fueron procesadas por microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal. Las células se recolectaron después de 14 días para estudiar la expresión génica.

2.3. Determinación de la citotoxicidad

La presencia de actividad de LDH en los medios de cultivo después de 48 horas de incubación se usó como un índice de muerte celular. La actividad de LDH se determinó espectrofotométricamente después de 30 minutos de incubación a 25 °C de 50 µl de medio de cultivo y 50 µl de la mezcla de reacción, midiendo la oxidación de NADH a 490 nm en presencia de piruvato, según las instrucciones del kit del fabricante. (Kit de detección de citotoxicidad, Roche Diagnostics). Los resultados de todas las muestras se presentaron en relación con la actividad de LDH en el medio de las células tratadas con el control del vehículo para cada caso, 1 % de etanol o 0,6 % de DMSO (control bajo, 0 % de muerte celular) y de células tratadas con 1 % de Triton X-100 (control alto, 100 % de muerte celular). El porcentaje de actividad LDH se calculó usando la siguiente ecuación: Citotoxicidad (%) = (valor exp - control bajo)/(control alto - control bajo) * 100.

2.4. Análisis microscópico de células cultivadas en las superficies de Ti modificadas

Se usó un microscopio electrónico de barrido (MEB) que usa electrones de retrodispersados (ERP), 40 Pa de presión y 10 kV de voltaje para adquirir imágenes de células cultivadas en implantes en forma de moneda. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 4 % en PBS durante 1 hora. La solución fijadora se eliminó y las células se lavaron con agua destilada dos veces. A intervalos de 30 minutos, las células se deshidrataron mediante la adición de soluciones de etanol al 50 %, 70 %, 90 % y 100 %. Finalmente, se eliminó el etanol y se dejaron las células a temperatura ambiente para evaporar el etanol restante antes del análisis. Acto seguido, las muestras se rehidrataron mediante la adición de soluciones de etanol al 90 %, 70 % y 50 % y agua durante periodos de 5 minutos. Las células se tiñeron con 5 µg/ml de faloidina-FITC (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) en PBS Triton X-100 0,2 % durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron con PBS y los implantes en forma de moneda se colocaron en portaobjetos. Finalmente, se agregó una gota de Fluoroshield TM con DAPI (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y se montaron cubreobjetos en los implantes. Se usaron dos implantes de cada grupo para realizar el experimento y se tomaron tres imágenes de cada implante con el microscopio confocal (Leica DMI 4000B equipado con el sistema láser Leica TCS SPE). Las longitudes de onda de excitación de DAPI y faloidina-FITC se establecieron a 405 y 488 nm respectivamente; la fluorescencia se capturó entre 430-480 nm para DAPI y entre 500-525 nm para faloidina-FITC.

2.5. Aislamiento de ARN y análisis de RT-PCR en tiempo real

El ARN total se aisló usando Tripure® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN total se cuantificó a 260 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). La misma cantidad de ARN (0,2 µg) se transcribió de manera inversa a ADNc a 42 °C durante 60 min usando el kit de ARN a ADN de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con el protocolo del proveedor. Se congelaron alícuotas de cada ADNc (-20 °C) hasta que se llevaron a cabo las reacciones de PCR. Se realizó una PCR en tiempo real para dos genes de referencia, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y beta-actina (B-actina), y genes diana (Tabla 5). Los genes de los genes diana cubren diferentes aspectos de la función de los fibroblastos gingivales, como la producción y organización de MEC, y la inflamación como se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 5. Función de los genes seleccionados.

Gen	Función
Colágeno III α1 (COL3A1)	El tejido conectivo gingival consiste en una red densa de un haz de fibrillas de colágeno que aportan firmeza a la encía y fijan la encía al diente y al hueso alveolar. También regulan las funciones de las células del tejido conectivo. COL3A1 se encuentra en tejidos conectivos extensible como la piel, los pulmones y el sistema vascular, frecuentemente asociado con colágeno tipo I.
Interleucina-6 (IL6)	Se sabe que la IL-6 media señales importantes en la red de citoquinas inflamatorias. Los fibroblastos gingivales secretan las citoquinas tras la estimulación con mediadores inflamatorios, incluyendo la IL-6.

La PCR en tiempo real se realizó en el Lightcycler 480® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) usando la detección verde SYBR. Cada reacción contenía 7 µl de Lightcycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (que contiene polimerasa Fast Start Taq, tampón de reacción, mezcla de dNTP, SYBRGreen I y MgCl₂), 0,5 µM de cada uno, los cebadores específicos sentido y antisentido (Tabla 6) y 3 µl de la dilución de ADNc en un volumen final de 10 µl. El programa de amplificación consistió en una etapa de preincubación para la desnaturalización del ADNc de plantilla (5 min, 95 °C), seguido de 45 ciclos que consisten en una etapa de desnaturalización (10 s, 95 °C), una etapa de hibridación (10 s, 60 °C) y una etapa de extensión (10 s, 72 °C). Después de cada ciclo, se midió la fluorescencia a 72 °C. Se ejecutó un control negativo sin plantilla de ADNc en cada ensayo.

Tabla 6 Cebadores utilizados en la PCR en tiempo real de referencia y genes diana. S: sentido, A: antisentido, pb: pares de bases

Gen	Secuencia de cebador	Tamaño del producto	Número de acceso a GeneBank
Colágeno III $\alpha 1$ (COL3A1)	S: GGCCTACTGGGCCTGGTGGT A: CCACGTTACCAGGGGCACC	190 pb	NM_000090.3
Interleucina-6 (IL6) (gen diana)	S: AGGAGACTTGCCTGGTGAAA A: GCATTTGTGGTTGGGTCAG	196 pb	NM_000600.3
β -actina (gen de referencia)	S: CTGGAACGGTGAAGGTGACA A: AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	136 pb	NM_001101.3
GAPDH (gen de referencia)	S: TGCACCACCAACTGCTTAGC A: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87 pb	NM_002046.3

Las eficiencias en tiempo real (E) se calcularon a partir de las pendientes dadas en el software LightCycler 480 que usa diluciones en serie, muestra todas las tasas elevadas de eficiencia de PCR en tiempo real de los transcritos investigados y una alta linealidad cuando se usaron diferentes concentraciones. Los productos de la PCR se sometieron a un análisis de curva de fusión en el LightCycler y, posteriormente, a una electroforesis en gel de agarosa/TAE al 2 % para confirmar la especificidad de la amplificación, la T_f y el tamaño del amplicón, respectivamente. Todas las muestras se normalizaron mediante la media geométrica de los niveles de expresión de ACTBL2 y GAPDH y los cambios de múltiplo se relacionaron con los grupos de control mediante el siguiente modelo matemático: relación = $E_{\text{objetivo}}^{\Delta C_{p\text{objetivo}} (\text{media control} - \text{muestra})} / E_{\text{referencia}}^{\Delta C_{p\text{objetivo}} (\text{media control} - \text{muestra})}$, en la que C_p es el punto de cruce de la curva de amplificación de reacción según lo determinado por el software LightCycler 480. La estabilidad de los genes de referencia se calculó usando la herramienta BestKeeper.

15 Todos los datos *in vitro* se presentan como valores medios \pm EEM (error estándar de la media). La prueba de Kolmogorov-Smirnov se realizó para asumir distribuciones paramétricas o no paramétricas para las pruebas de normalidad. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney o mediante la prueba de t de Student en función de su distribución normal. Se usó el programa SPSS® para Windows, versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con valores de p \leq 0,05.

RESULTADOS

2.6. Análisis químico de sustratos recubiertos con flavonoides por FTIR-ATR

25

La presencia de flavonoides en las diferentes superficies se detectó como se muestra en el ejemplo 1.

2.7. Perfil de liberación de flavonoides por espectroscopia UV-Vis

30 La Figura 7 muestra el perfil de liberación de flavonoides en medios acuosos hasta 14 días, simulando las condiciones fisiológicas (pH 7,5, 37 °C), de muestras coladas por caída (experimento FL13) y unidas covalentemente por la formación de bases de Schiff (experimento FL14).

35 *Sustratos colados por caída.* La cantidad inicial de flavonoides depositada en la superficie de Ti por colada por caída fue de 6 nmol/disco para implantes de taxifolina y 100 nmol/disco para quercitrina. El perfil de liberación de taxifolina muestra que casi $3,2 \pm 0,4$ nmol se liberaron en el medio después de 1 h de incubación y la liberación casi se completó el día 1. El perfil de liberación de quercitrina de implantes colados por caída mostró un estallido inicial a 1 h de $72,8 \pm 4,1$ nmol. Después de 1 día de incubación, se liberó al medio un 81,7 % de la cantidad agregada inicialmente (100 nmol/disco). Desde el día 4 hasta el día 14, la cantidad de quercitrina liberada a los medios no fue detectable.

40 *Sustratos ligados covalentemente.* La Figura 7 También muestra el perfil de liberación de las superficies de Ti funcionalizadas con taxifolina y quercitrina por la formación de bases de Schiff (experimento FL14). En este experimento no se redujeron las bases de Schiff obtenidas. Por lo tanto, el enlace C=N supuestamente formado entre la superficie terminada con NH₂ y el grupo carbonilo del flavonoide debería ser reversible, y el flavonoide podría liberarse del sustrato. El perfil de liberación de taxifolina de las muestras de base de Schiff muestra que se liberaron $7,9 \pm 2,7$ nmol de flavonoides en el medio después de 1 h de incubación. El primer día, la liberación acumulada fue de $12,4 \pm 4,0$ nmol. Del día 1 al 14 la cantidad liberada no fue significativa. Se observó una alta desviación entre réplicas. Estas diferencias entre las muestras pueden deberse a la naturaleza reversible de la base de Schiff formada o a la efectividad diferente de la etapa de enjuague después de la inmovilización. La liberación de quercitrina a partir de muestras de base de Schiff fue significativamente menor que la taxifolina. La cantidad total de quercitrina liberada después de 14 días fue de $1,54 \pm 0,09$ nmol. No se detectó taxifolina ni quercitrina en el medio a partir de superficies de base de Schiff reducida (experimento FL15). Esto concuerda con la formación esperada de un enlace estable irreversible entre el flavonoide y la superficie APTES/Ti.

50

2.8. Biocompatibilidad de las superficies de titanio recubiertas con flavonoides con fibroblastos gingivales humanos.

La citotoxicidad de los tratamientos se evaluó midiendo la liberación de LDH de HGF a los medios de cultivo después de 24 horas de tratamiento (Figura 8). Ninguna de las superficies era tóxica para HGF. Al comparar los grupos recubiertos de flavonoides con sus controles, las superficies coladas por caída de quercitrina (FL13QR) fueron significativamente menos citotóxicas que el control de Ti pasivado sin flavonoides (FL13B) y FL14QR y FL15TX enlazadas covalentemente fueron significativamente menos citotóxicas que el control de Ti silanizado sin flavonoides (FL14A).

2.9. Efecto de las diferentes superficies de titanio recubiertas con flavonoides sobre la morfología celular.

Después de 24 horas de cultivo en las diferentes superficies, HGF poseía la típica morfología en forma de huso fibroblástico y se distribuyó por toda la superficie (Figura 9). La tinción del citoesqueleto y núcleos también reveló una buena propagación celular en todas las superficies y la formación de prolongaciones y filopodios para contactar entre sí y adherirse a las superficies (Figura 10). Vale la pena señalar que HGF se alineó con las nanoranas concéntricas de las superficies de titanio. No se observaron diferencias en la morfología celular entre los grupos.

2.10. Efecto de los diferentes flavonoides en la expresión génica.

Se realizó una RT-PCR en tiempo real para observar el efecto de las diferentes superficies de Ti recubiertas con flavonoides sobre la expresión de los genes que participan en la producción y organización de la matriz extracelular, la regulación de la adhesión celular y la inflamación (Figuras 11-12). La estabilidad de los genes de referencia se evaluó con la herramienta BestKeeper. La variación del punto de cruce de los genes de referencia entre las muestras fue inferior a 1,38. Además, se demostró una buena consistencia del índice de bestkeeper ya que sus genes de referencia contribuyentes estaban estrechamente correlacionados con ello ($0,993 < r < 0,994$), con un nivel significativo de $p = 0,001$ para todos los genes de referencia.

Con respecto a la expresión génica de los marcadores seleccionados, los niveles de ARNm de interleucina-6 (IL6), un marcador inflamatorio, fueron significativamente más bajos en todas las superficies recubiertas con flavonoides en comparación con sus controles sin flavonoides (Figura 11).

Sorprendentemente, COL3A1 aumentó solo en todos los grupos recubiertos con flavonoides unidos covalentemente en comparación con el control de Ti/TiO₂ silanizado (FL14A) y en la base de Schiff reducida con quercitrina (FL15QR) en comparación con las superficies no reducidas (FL14QR). (Figura 12)

CONCLUSIONES EJEMPLO 2

Ninguna de las superficies recubiertas con flavonoides fue tóxica para HGF. Después de 24 horas de cultivo en las diferentes superficies, HGF poseía la típica morfología en forma de huso fibroblástico y se distribuyó por toda la superficie, sin diferencias entre los grupos. Esto demuestra que, a pesar de las modificaciones químicas de la superficie metálica del implante al unir el enlazador y el flavonoide, la toxicidad no ha aumentado. La tinción del citoesqueleto y núcleos también reveló una buena propagación celular en todas las superficies y la formación de prolongaciones y filopodios para contactar entre sí y adherirse a las superficies.

Los diferentes métodos de modificación de la superficie fueron efectivos para disminuir la inflamación en las células HGF, como lo demuestran los niveles de ARNm de IL-6. Sin embargo, solo los flavonoides que se unieron covalentemente a la superficie del implante fueron efectivos, lo que aumentó la diferenciación de HGF, como lo demuestran los niveles de ARNm de COL3A1. Por lo tanto, para regenerar el tejido blando gingival alrededor de los implantes de titanio con fibroblastos que son capaces de adherirse y diferenciarse (secretando colágeno a la matriz extracelular), se prefiere un recubrimiento que contenga flavonoides unidos covalentemente a la superficie que los que solo se adsorben físicamente en la superficie.

EJEMPLO 3: SUPERFICIES DE TITANIO FUNCIONALIZADAS CON FLAVONIOIDES: BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO

Las superficies de titanio se funcionalizaron mediante colada por caída y unión covalente (formación de base de Schiff y base de Schiff reducida) como se ha descrito previamente en los ejemplos 1 y 2. Los perfiles de liberación de flavonoides de las diferentes superficies también se determinaron mediante espectroscopia UV-Vis. La biocompatibilidad y la bioactividad de las diferentes superficies de titanio recubiertas con flavonoides se evaluaron en modelos de cultivos celulares de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano (hUC-MS) diferenciadas con el linaje osteogénico, como un modelo celular para tejido duro alrededor de los implantes de titanio. Las células cultivadas en superficies de titanio modificadas con flavonoides se analizaron para determinar la toxicidad celular, determinada por la actividad de LDH después de 24 horas de incubación, la morfología celular, determinada por MEB y la tinción del citoesqueleto y núcleos, y la expresión génica de marcadores de diferenciación

después de 14 días de cultivo.

La tabla 7 muestra las diferentes superficies producidas. Antes de la inmovilización de flavonoides, se llevó a cabo la pasivación de discos de titanio mecanizados.

5

Tabla 7 Grupos utilizados en el estudio.

Grupo	Modificación
FL16B	Pasivado, Ti/TiO ₂
FL16TX	Colada por caída, Ti/TiO ₂ /taxifolina
FL16QR	Colada por caída, Ti/TiO ₂ /quercitrina
FL17A	Ti silanizado, Ti/TiO ₂ /APTES
FL17TX	Base de Schiff, Ti/TiO ₂ /APTES/taxifolina
FL17QR	Base de Schiff, Ti/TiO ₂ /APTES/quercitrina
FL18TX	Base de Schiff reducida, Ti/TiO ₂ /APTES/taxifolina
FL18QR	Base de Schiff reducida, Ti/TiO ₂ /APTES/quercitrina

El perfil de liberación de flavonoides se midió mediante espectroscopia UV-Vis como se describe en el ejemplo anterior, pero en este caso los medios acuosos se cambiaron en el punto temporal 1 h, 1 día y 4, 7, 11 días, simulando cambios en los medios de cultivo de hUC-MSCs. La determinación de la citotoxicidad, el análisis microscópico del crecimiento celular en las superficies modificadas de Ti y el aislamiento de ARN y el análisis de RT-PCR en tiempo real se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo anterior. Los cebadores usados en la PCR en tiempo real se detallan en la tabla 8 y la función de los genes seleccionados como marcadores se explica en la tabla 9.

15

Tabla 8. Cebadores usados en la PCR en tiempo real de genes de referencia y diana. S: sentido, A: antisentido, pb: pares de base

Gen	Secuencia de cebador	Tamaño del producto	Número de adhesión a GeneBank
ALP	S: CCGCTATCCTGGCTCCGTGC A: GGTGGGCTGGCAGTGGTCAG	108 pb	NM_000478.3
Coll-1	S: CCTGACGCACGGCCAAGAGG A: GGCAGGGCTCGGGTTCCAC	122 pb	NM_000088.3
OC	S: GAAGCCCAGCGGTGCA A: CACTACCTCGCTGCCCTCC	70 pb	NM_199173
Runx2	S: GCCTTCAAGGTGGTAGCCC A: CGTTACCCGCCATGACAGTA	67 pb	NM_004348

Tabla 9. Función de los genes seleccionados.

Gene	Función
ALP	La fosfatasa alcalina está vinculada al metabolismo del fosfato y a la maduración de matrices. Es uno de los primeros genes expresados funcionales en el proceso de calcificación.
Coll-1	El colágeno tipo 1 es un marcador temprano que apoya la etapa de diferenciación celular.
OC	Es la proteína no colágena más abundante en el hueso y está implicada en la mineralización ósea y en la homeostasis del ion calcio. La osteocalcina se usa normalmente como biomarcador preliminar sobre la efectividad de un tratamiento dado sobre la formación ósea.
Runx2	Es un factor transcripcional clave involucrado en la diferenciación de osteoblastos.

20 3.1. Cultivo de células

Se aislaron células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical humano (hUC-MSC) de los cordones umbilicales obtenidos en el proceso de donación de sangre del cordón umbilical humano bajo la Donación de Sangre del Cordón Umbilical del grupo Concordia. Las muestras se obtuvieron con el consentimiento informado y con la aprobación del Comité Ético de las Islas Baleares (CEIC-IB). Una vez aisladas, las células HUC-MSCs se cultivaron rutinariamente a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂. Las células se sembraron a una densidad de 7,0 x 10³ células/pocillo sobre los implantes de titanio con forma de moneda y se cultivaron hasta la confluencia en un "medio de crecimiento" que consiste en DMEM-LG suplementado con penicilina (50 UI/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y 20 % de FBS (FB-1001, lote número 4253, Biosera, Bousens, Francia). En la confluencia (designada como día 0), las células se cultivaron en "medios de diferenciación" que consistían en medios de crecimiento suplementados con hidrocortisona (200 nM), ácido ascórbico (50 µg/ml) y β-glicerofosfato (10 nM). Los medios de cultivos fueron reemplazados dos veces por semana. Los medios de cultivo se recogieron después de 24 horas para probar la actividad de LDH. Algunas muestras se procesaron mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal para verificar la morfología celular. Las células se recogieron después de 14 días para estudiar la expresión génica.

35

RESULTADOS

3.2. Perfil de liberación de flavonoides por espectroscopia UV-Vis

5 La Figura 13 muestra el perfil de liberación de flavonoides de discos de Ti recubiertos con flavonoides en medios acuosos hasta 14 días, simulando condiciones fisiológicas (pH 7,5, 37 °C), de muestras coladas por caída (experimento FL16) y unidas covalentemente por formación de la base de Schiff (experimento FL17).

10 *Sustratos colados por caída.* La cantidad inicial de flavonoides depositada sobre la superficie de Ti por colada por caída fue de 20 nmol/disco para implantes de taxifolina y 50 nmol/disco para quercitrina.

Para ambas superficies coladas por caída, la liberación máxima tuvo lugar dentro de la primera hora de incubación de la muestra. La cantidad total de taxifolina liberada a los medios fue de $19,7 \pm 0,7$ nmol. La cantidad total de quercitrina liberada representó un 78 % del valor esperado (39 nmol frente a 50 nmol).

15 *Sustratos ligados covalentemente.* La Figura 13 también muestra el perfil de liberación de las superficies de Ti funcionalizadas con taxifolina y quercitrina por la formación de bases de Schiff (experimento FL17). En este experimento, las bases de Schiff obtenidas no se redujeron. Por lo tanto, el enlace C=N supuestamente formado entre la superficie terminada en NH_2 y el grupo carbonilo del flavonoide debería ser reversible, y el flavonoide podría liberarse del sustrato. La liberación de taxifolina y quercitrina de las superficies de base de Schiff fue similar. La cantidad total de taxifolina liberada después de 14 días fue de $2,6 \pm 0,2$ nmol. Por otra parte, la cantidad total de quercitrina liberada después de 14 días fue de $1,51 \pm 0,04$ nmol. En ambos casos, la cantidad máxima liberada tuvo lugar dentro de la primera hora de incubación y la liberación se completó entre 1 y 4 días de incubación.

25 No se detectó taxifolina ni quercitrina en el medio a partir de superficies de base de Schiff reducidas (experimento FL18). Esto concuerda con la formación esperada de un enlace estable irreversible entre el flavonoide y la superficie APTES/Ti.

3.3. Biocompatibilidad de las superficies de titanio recubiertas con flavonoides con células madre mesenquimales del cordón umbilical humano.

La citotoxicidad de los tratamientos se evaluó midiendo la liberación de LDH de hUC-MSC en los medios de cultivo después de 24 horas de tratamiento (Figura 14). Ninguna de las superficies era tóxica para estas células y no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos recubiertos con flavonoides con sus controles.

3.4. Efecto de las diferentes superficies de titanio recubiertas con flavonoides sobre la morfología celular.

Después de 24 horas de cultivo en las diferentes superficies, las hUC-MSC mostraron la morfología típica con cuerpos celulares largos y delgados y núcleos prominentes que se colocaron en toda la superficie, sin diferencias entre los grupos (Figuras 15 y 16).

3.5. Efecto de las diferentes superficies modificadas con flavonoides sobre la expresión génica.

Se realizó RT-PCR en tiempo real para observar el efecto de las diferentes superficies de Ti recubiertas con flavonoides sobre la expresión de los genes involucrados en la diferenciación de osteoblastos, la maduración de la matriz y la mineralización (Figura 17). La estabilidad de los genes de referencia se evaluó con la herramienta BestKeeper. La variación del punto de cruce de los genes de referencia entre las muestras fue inferior a 0,35. Además, se demostró una buena consistencia del índice de bestkeeper ya que sus genes de referencia contribuyentes estaban estrechamente relacionados con ello ($0,879 < r < 0,900$), con un nivel significativo de $p = 0,001$ para todos los genes de referencia.

Respecto a la expresión génica de los marcadores seleccionados (Figura 17), los niveles de ARNm de colágeno tipo 1 (Coll-1) fueron significativamente más altos en todas las superficies recubiertas con flavonoides en comparación con sus controles sin flavonoides. La expresión de osteocalcina (OC) se redujo significativamente en las células cultivadas en superficies coladas por caída con quercitrina (FL16QR) y en las células cultivadas en superficies de base de Schiff reducidas con quercitrina (FL18QR) en comparación con sus controles correspondientes. Sin embargo, las células cultivadas sobre muestras de base de Schiff con taxifolina (FL17TX) revelaron una expresión de OC más alta en comparación con su control y con la base de Schiff reducida por taxifolina (FL18TX). Con respecto a la expresión del gen de la fosfatasa alcalina (ALP), la base de Schiff reducida por quercitrina (FL18QR) fue el único tratamiento que mostró un aumento en los niveles de ALP en comparación con su control y con superficies reducidas con taxifolina (FL18TX). Por último, la expresión del ARNm de Runx2 fue estadísticamente mayor en el grupo de base de Schiff con quercitrina (FL17QR) en comparación con su control, mientras que disminuyó en las superficies coladas por caída de taxifolina y quercitrina (FL16TX, FL16QR) en comparación con el control (FL16B). También se observaron diferencias significativas en la expresión del gen Runx2 para las muestras coladas por caída de quercitrina (FL16QR) en comparación con la colada por caída de taxifolina (FL16TX) y para la

base de Schiff reducida por taxifolina (FL18TX) en comparación con el grupo de taxifolina no reducida (FL17TX).

CONCLUSIONES EJEMPLO 3

5 Ninguna de las superficies era tóxica para hUC-MSC. Después de 24 horas de cultivo en las diferentes superficies, las hUC-MSC mostraron la morfología típica con cuerpos celulares largos y delgados y núcleos prominentes, que se colocaron en toda la superficie, sin diferencias entre los grupos.

En cuanto al perfil de diferenciación de las hUC-MSC, las células cultivadas en implantes que tenían flavonoides unidos covalentemente mostraron una diferenciación superior a las células cultivadas en los implantes colados por caída de flavonoides, como lo muestra el colágeno-1 superior, la osteocalcina y, lo que es más importante, runx2. Runx2 es un organizador maestro de la transcripción de genes en el desarrollo y la maduración de los osteoblastos, que son las células principales en los tejidos duros que soportan los implantes oseointegrados.

15 EJEMPLO 4: INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE 5-METOXITRIPTOFOL EN SUPERFICIES DE TITANIO

El 5-metoxitriptofol (5-MTX) puede inmovilizarse covalentemente a superficies de Ti pretratadas a través de una reacción de esterificación. Un agente de acoplamiento con una funcionalidad carboxilo, anhídrido de ácido o cloruro de acilo puede reaccionar con el resto hidroxilo de 5-MTX para dar un éster (Figura 18).

20 La funcionalización con anhídrido de ácido de las superficies de Ti puede llevarse a cabo usando anhídrido succínico trietoxisililpropil (TESPSA) como agente de reticulación. TESPSA es un silano, estructuralmente similar a APTES pero con un extremo de anhídrido succínico en lugar de una amina. La hidrólisis del anhídrido dará la funcionalidad del ácido carboxílico, que también es reactiva a la esterificación con hidroxilo aunque de una manera más lenta que el anhídrido de ácido.

4.1. Procedimiento de inmovilización covalente.

30 Antes de la funcionalización, se lleva a cabo la activación de la superficie de Ti por irradiación UV o pasivación, como se describe en el Ejemplo 1.

La silanización de los sustratos de Ti/TiO₂ con TESPSA se llevó a cabo en condiciones anhidras para evitar la hidrólisis del resto anhídrido succínico de TESPSA. Inmediatamente después del tratamiento previo con Ti, los implantes se sumergieron en una solución de TESPSA al 10 % v/v en tolueno seco durante 24 horas a temperatura ambiente. MgSO₄ anhidro se añadió para depurar el agua formada a partir de la condensación de los grupos etoxi del silano con la superficie Ti hidroxilada. Luego, se enjuagaron con cuidado con tolueno seco.

40 Para la inmovilización de 5-MTX, una solución de 5-MTX 1 mM en tolueno seco se preparó y se añadió MgSO₄ anhidro o tamices moleculares 4A. Los discos silanizados se sumergieron en la solución de 5-MTX, unas gotas de H₂SO₄ concentrado se añadieron para catalizar la esterificación, y la solución final se agitó durante 1 h a TA. Terminado este tiempo, los discos se enjuagaron con cuidado con tolueno seco, DMSO y agua a pH 7 y se secaron con N₂.

45 EJEMPLO 5. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE TITANIO CON 5-METOXITRIPTOFOL MEDIANTE COLADA POR CAÍDA

Este ejemplo muestra cómo las superficies de titanio se pueden recubrir homogéneamente con 5-metoxitriptofol mediante un procedimiento de colada por caída.

50 5.1. Reactivos y métodos

Las monedas de titanio mecanizadas se limpiaron y pasivaron como se describe en el Ejemplo 1. Inmediatamente después de la pasivación de Ti, se añadió una gota de 5 µl de una solución de 5-metoxitriptofol 10 mM en etanol a cada moneda y la solución se dejó secar al aire durante 30 minutos. El análisis FTIR-ATR acoplado a microscopía óptica de las superficies se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Los espectros FTIR de 5-metoxitriptofol sólido puro se obtuvieron con un accesorio ATR.

RESULTADOS

60 El análisis de FTIR de las superficies recubiertas mostró la presencia de la biomolécula distribuida homogéneamente a lo largo de la superficie (Figura 19).

CONCLUSIÓN

65 Las superficies metálicas de titanio se pueden recubrir de manera homogénea con 5-metoxitriptofol usando métodos

de colada por caída.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> NUMAT BIOMEDICAL, S. L.
 <120> Implantes para inducir la integración de tejidos blandos y duros
 <130> PCT2756.3
- 10 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen COL3A1
- 25 <400> 1
 ggcctactgg gcctggtggt 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen COL3A1
- 35 <400> 2
 ccacgttcac caggggcacc 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen IL6
- 45 <400> 3
 aggagacttg cctggtgaaa 20
 <210> 4
 <211> 19
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen IL6
- 55 <400> 4
 gcatttgtgg ttgggtcag 19
- 60 <210> 5
 <211> 20
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial
- 65 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen b-actina

ES 2 706 021 T3

<400> 5
 ctggaacggt gaaggtgaca 20

5 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen b-actina

 <400> 6
 aagggacttc ctgtaacaat gca 23

15 <210> 7
 <211> 20
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen GAPDH

 <400> 7
 tgcaccacca actgcttagc 20

25 <210> 8
 <211> 21
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen GAPDH

 <400> 8
 ggcatggact gtggtcatga g 21

35 <210> 9
 <211> 20
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen ALP

45 <400> 9
 ccgctatcct ggctccgtgc 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen ALP

 <400> 10
 ggtgggctgg cagtggcag 20

55 <210> 11
 <211> 20
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen Coll-1

65 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen Coll-1

ES 2 706 021 T3

<400> 11
 cctgacgcac ggccaagagg 20

5 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen Coll-1

 <400> 12
 ggcagggctc gggttccac 20

15 <210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen OC

 <400> 13
 gaagcccagc ggtgca 16

25 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen OC

 <400> 14
 cactacctcg ctgccctcc 19

35 <210> 15
 <211> 19
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sentido para amplificar el gen Runx2

45 <400> 15
 gcctcaagg tgtagccc 19

 <210> 16
 <211> 20
 <212> AND
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador antisentido para amplificar el gen Runx2

55 <400> 16
 cgttaccgc catgacagta 20

REIVINDICACIONES

1. Un implante biocompatible que comprende uno o más metal (metales), aleación(es) de metal, óxido(s) de metal o una combinación de los mismos, en el que un compuesto antioxidante que se selecciona entre el grupo de flavonoides, metoxitriptofoles, un éster de los mismos, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y una combinación de los mismos, está(n) recubriendo(s) al menos una parte de una superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal de dicho implante biocompatible, en el que el antioxidante está unido covalentemente a la superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal.
2. El implante biocompatible según la reivindicación 1, en el que el compuesto flavonoide comprende al menos un grupo carbonilo, y en el que el flavonoide se selecciona entre quercitrina, taxifolina, galangina, diosmetina, crisina o derivados de las mismas.
3. El implante biocompatible según la reivindicación 1, en el que el compuesto metoxitriptofol se selecciona entre 5-metoxitriptofol o 6-metoxitriptofol.
4. El implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un enlazador está unido a dicha superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal y a dicho antioxidante, éster de dicho compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una combinación de los mismos.
5. El implante biocompatible según la reivindicación 4, en el que dicho enlazador se selecciona entre el grupo que consiste en anhídridos, alcoholes, ácidos, aminas, epóxidos, isocianatos, silanos, tiol, alquilo, arilo, grupos halogenados y grupos polimerizables.
6. El implante biocompatible según la reivindicación precedente, en el que el silano se selecciona entre 3-aminopropiltrióxidosilano o ácido trióxidosilanopropilsuccínico.
7. El implante biocompatible según la reivindicación 5, en el que el enlazador es un poliéter.
8. El implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho(s) metal(es), aleación(es) de metal u óxido(s) de metal se selecciona(n) entre el grupo que consiste en titanio, una aleación o un óxido del mismo, circonio, una aleación o un óxido del mismo, tantalio, una aleación o un óxido del mismo, hafnio, una aleación o un óxido del mismo, niobio, o una aleación o un óxido del mismo, una aleación de cromo-vanadio y acero inoxidable.
9. El implante biocompatible según la reivindicación 8, en el que dicho metal, aleación de metal u óxido de metal es titanio.
10. El implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que otras biomoléculas están presentes en una superficie de metal, aleación de metal u óxido de metal del implante, seleccionándose dichas biomoléculas entre el grupo que consiste en biomoléculas naturales, biomoléculas sintéticas y biomoléculas recombinantes, factores de adhesión celular, biopolímeros, proteínas sanguíneas, enzimas, proteínas y biomoléculas de matriz extracelular, factores de crecimiento y hormonas, ácidos nucleicos, receptores, biomoléculas sintéticas, vitaminas, fármacos, ifosfonatos, iones biológicamente activos, flúor y biomoléculas marcadoras.
11. Un método para producir un implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la reacción de un compuesto antioxidante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con la superficie de dicho implante biocompatible.
12. El método según la reivindicación 11, que comprende las etapas de:
- pretratar químicamente la superficie de un implante,
 - una etapa que consiste en hacer reaccionar un enlazador como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 con dicha superficie pretratada químicamente obtenida en la etapa a), y
 - hacer reaccionar un compuesto antioxidante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con dicho enlazador;
- o, alternativamente, las etapas de:
- pretratar químicamente la superficie de un implante,
 - una etapa que consiste en hacer reaccionar un enlazador como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 con el compuesto antioxidante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
 - hacer reaccionar el conjugado antioxidante-enlazador así obtenido con dicha superficie pretratada obtenida en

la etapa a).

13. El método según la reivindicación 12, en el que después de hacer reaccionar el compuesto antioxidante con el enlazador, se realiza una etapa de reducción.

5

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que la etapa de pretratamiento se selecciona entre un ataque piraña, pasivación, irradiación UV, ataque ácido o alcalino.

15. Un implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso para reemplazar tejido óseo y/o restablecer una función del cuerpo de un animal vertebrado, en el que el reemplazo comprende implantar el implante biocompatible.

10

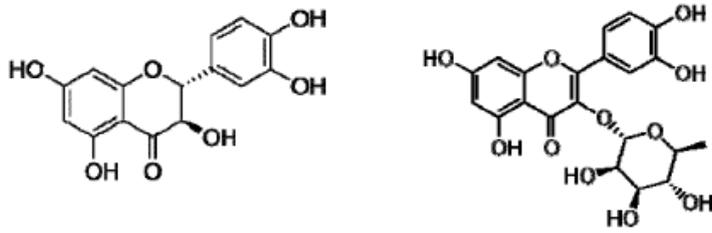


FIG. 1

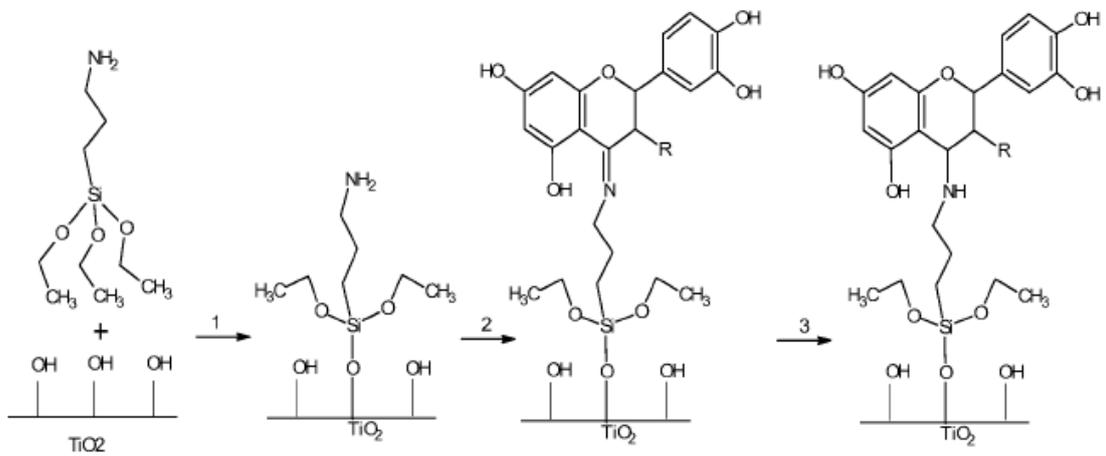
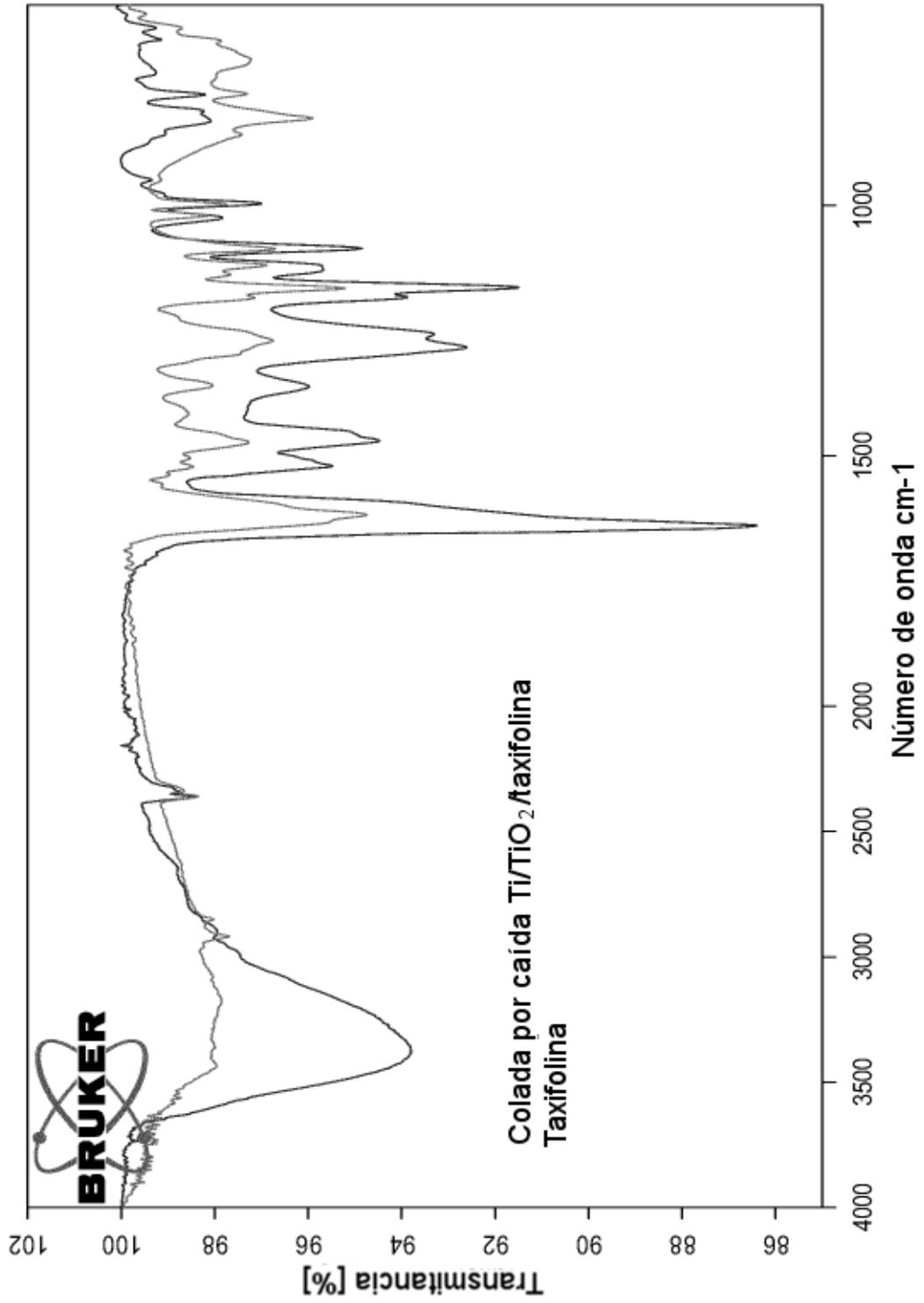


FIG. 2



a)

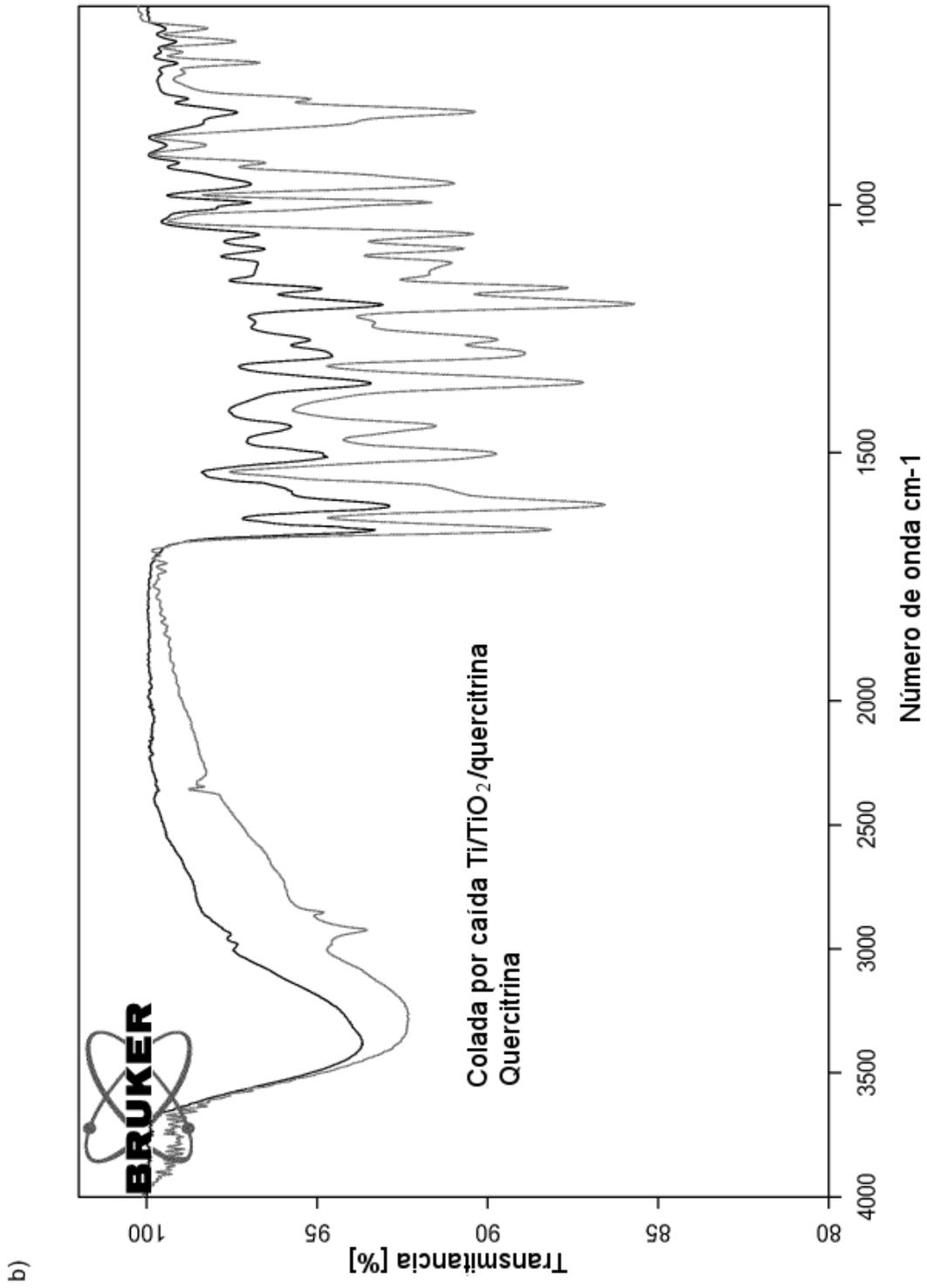
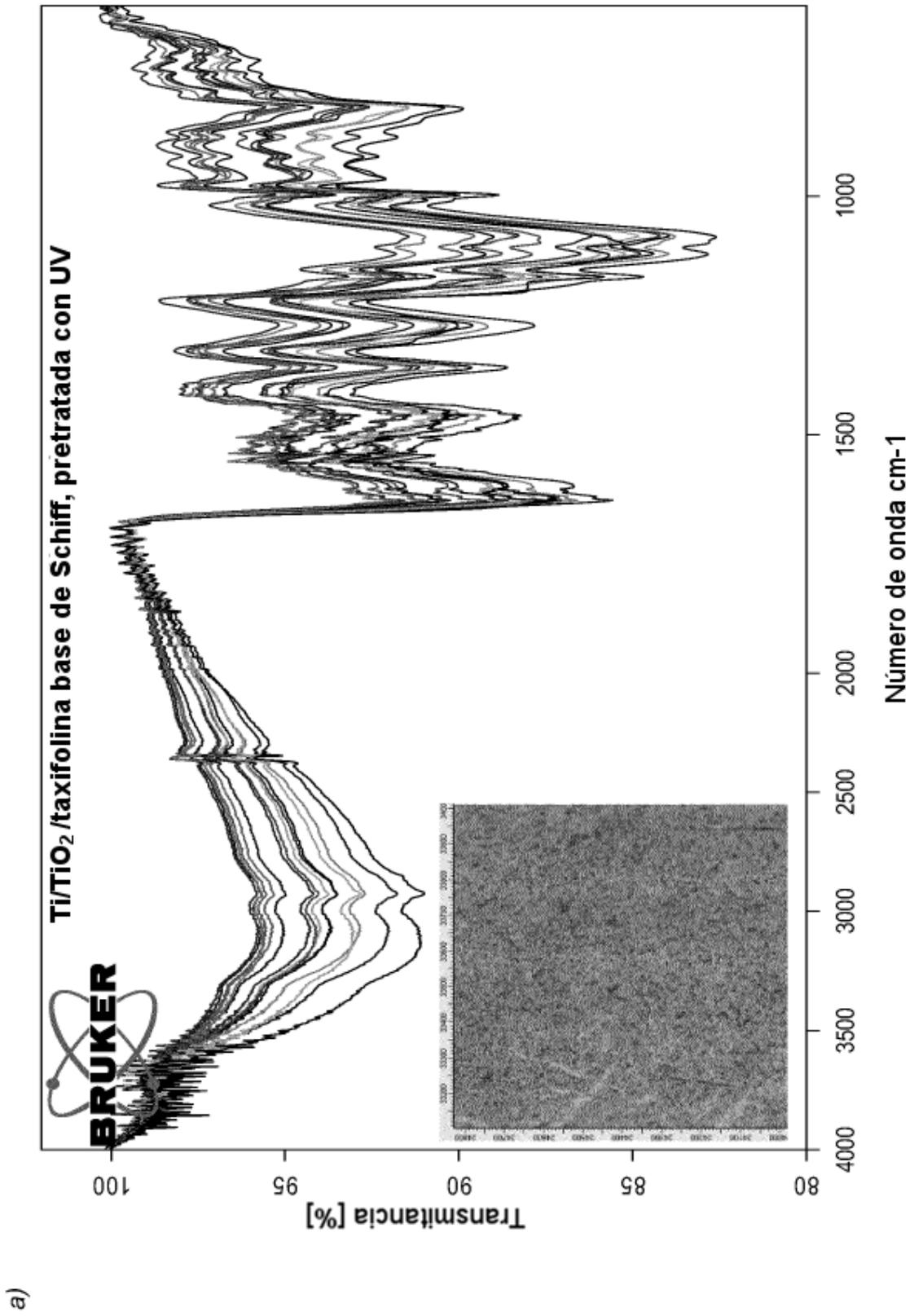


FIG. 3



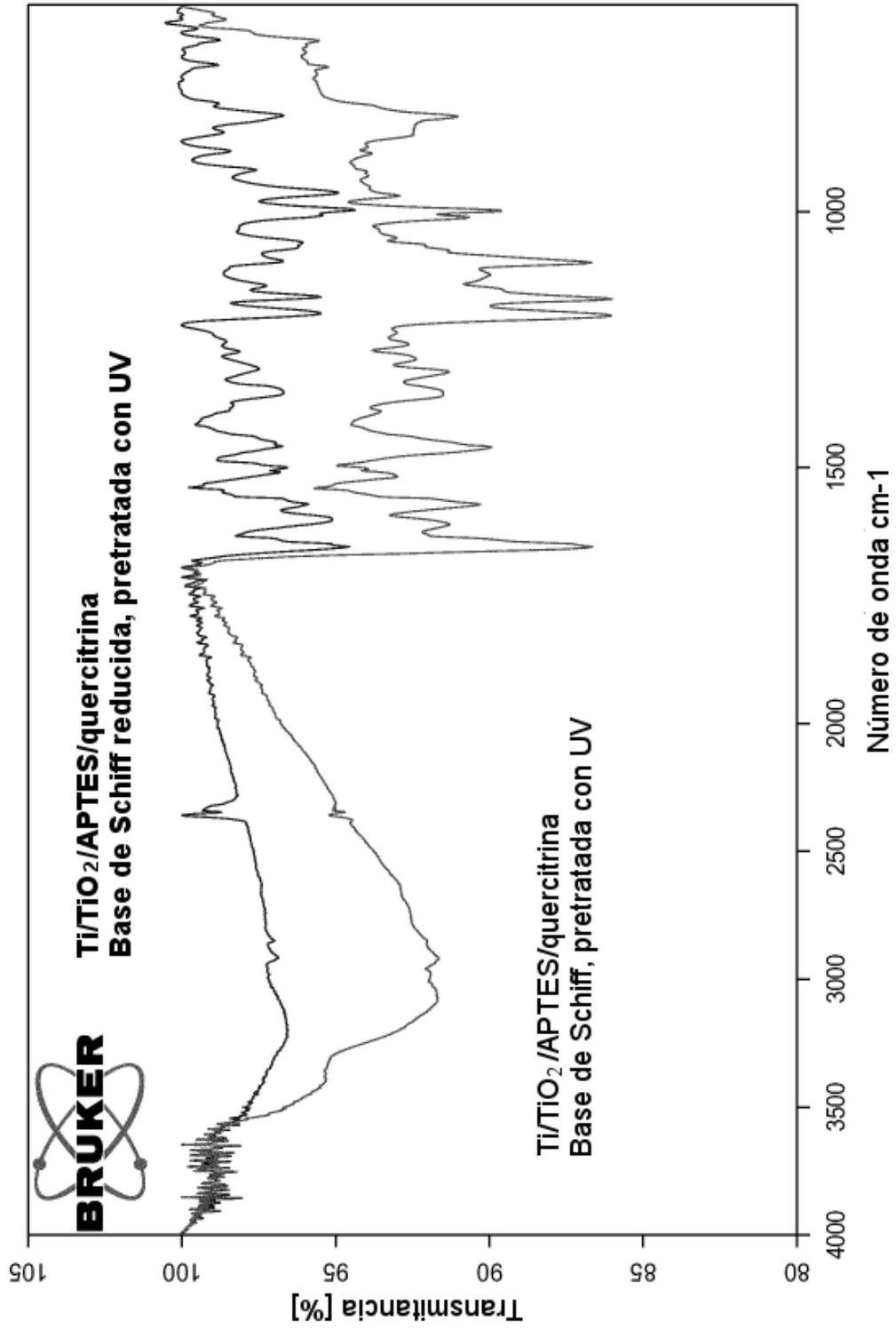
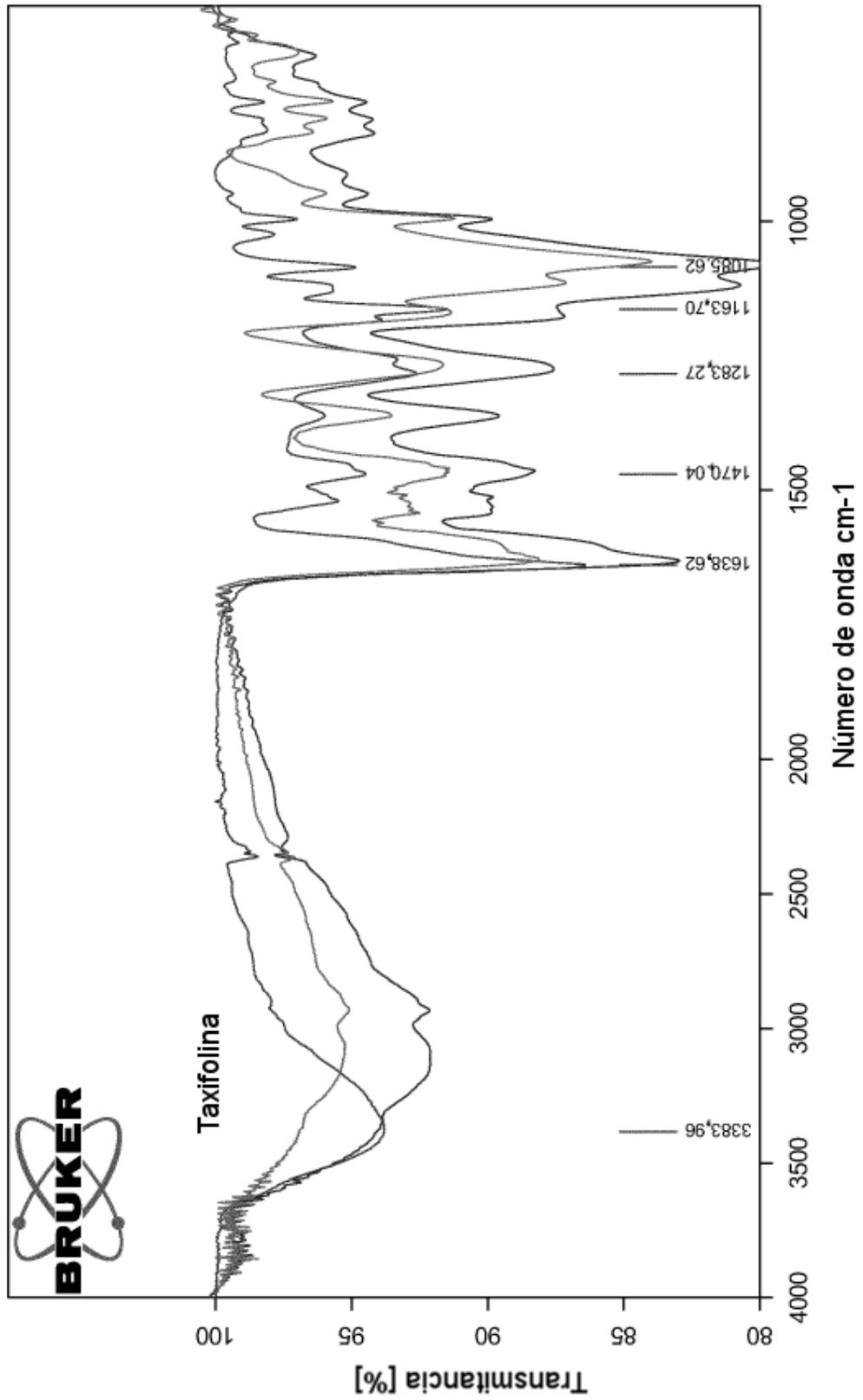


FIG. 4

b)



a)

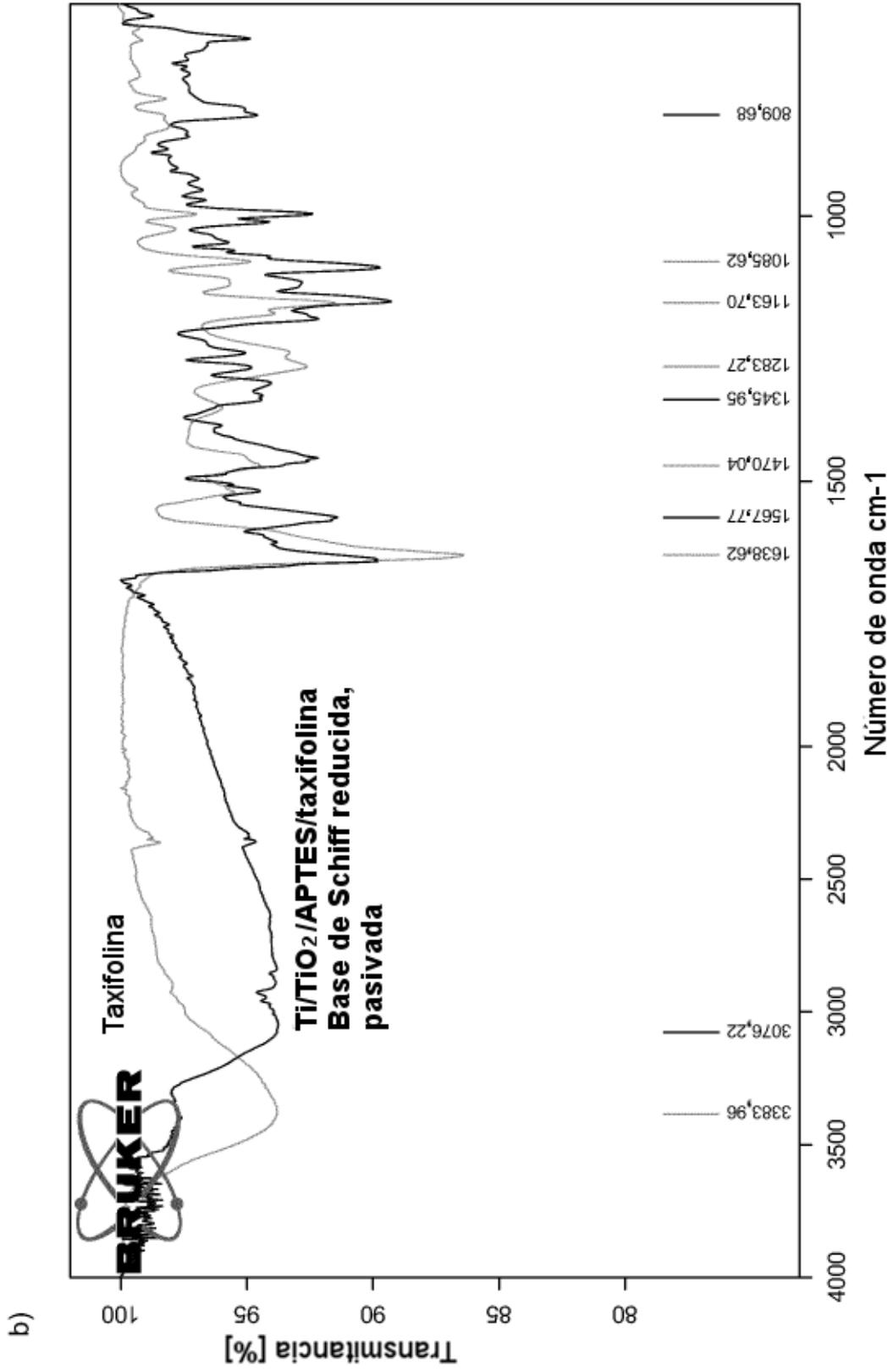


FIG. 5

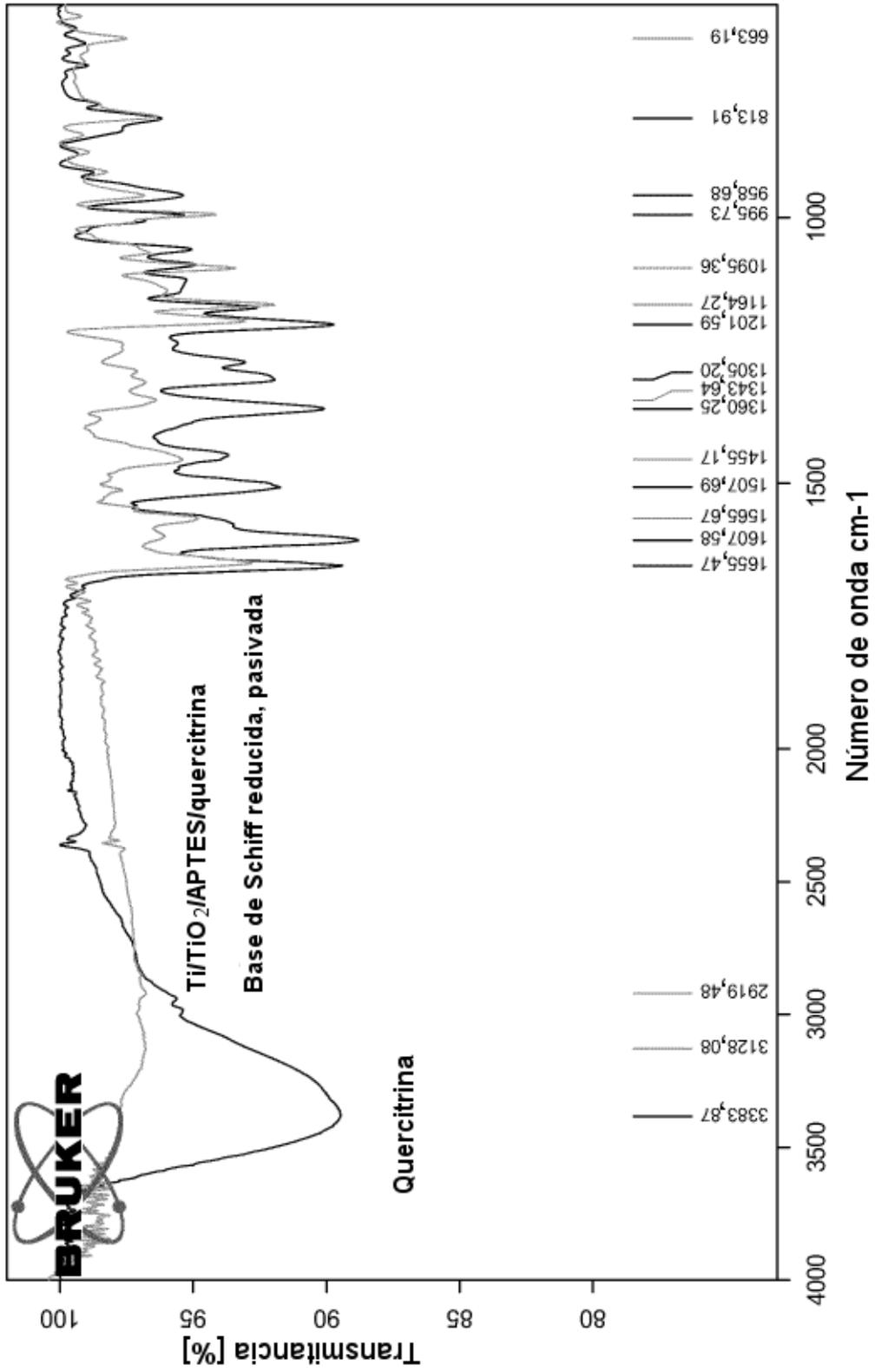


FIG. 6

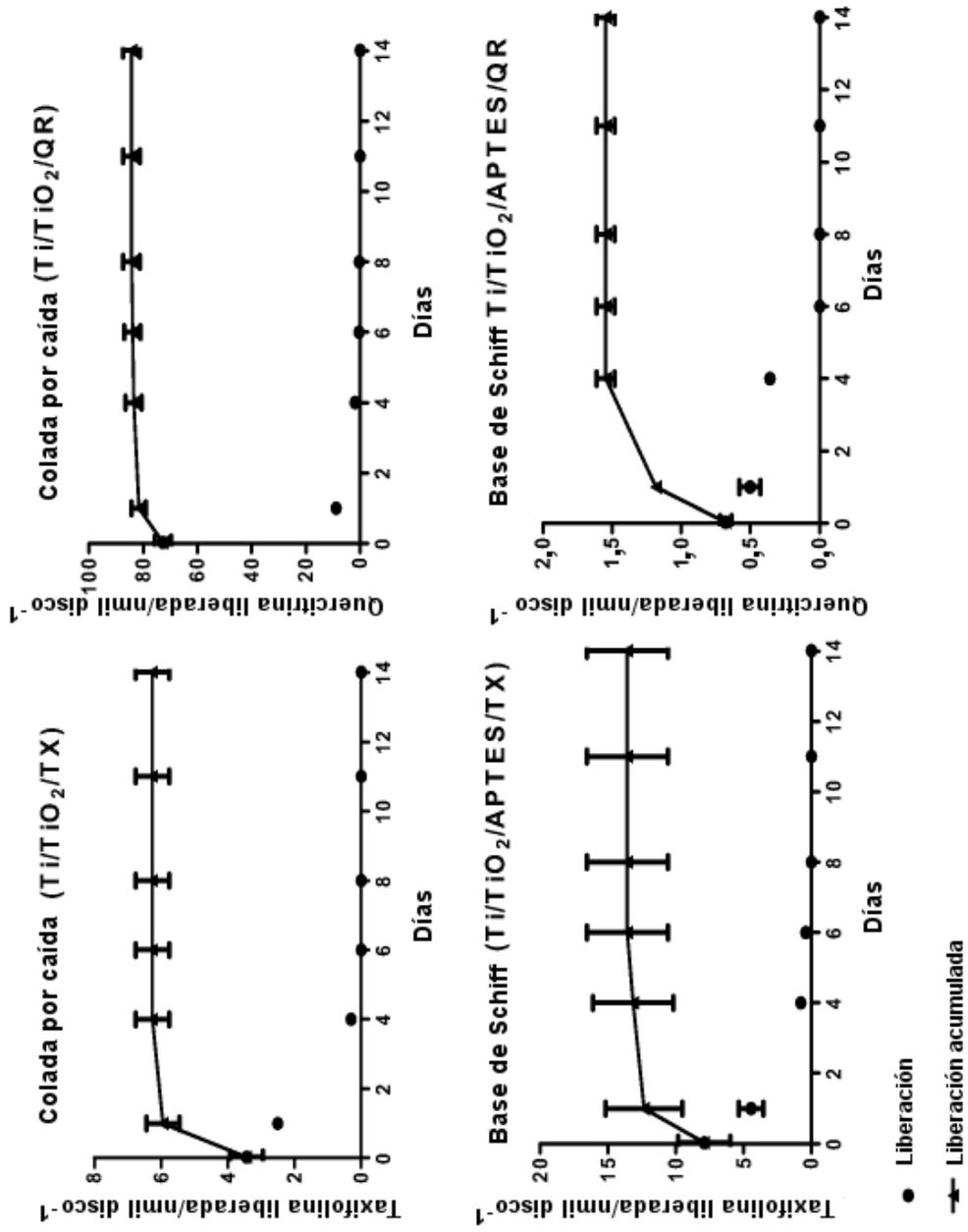


FIG. 7

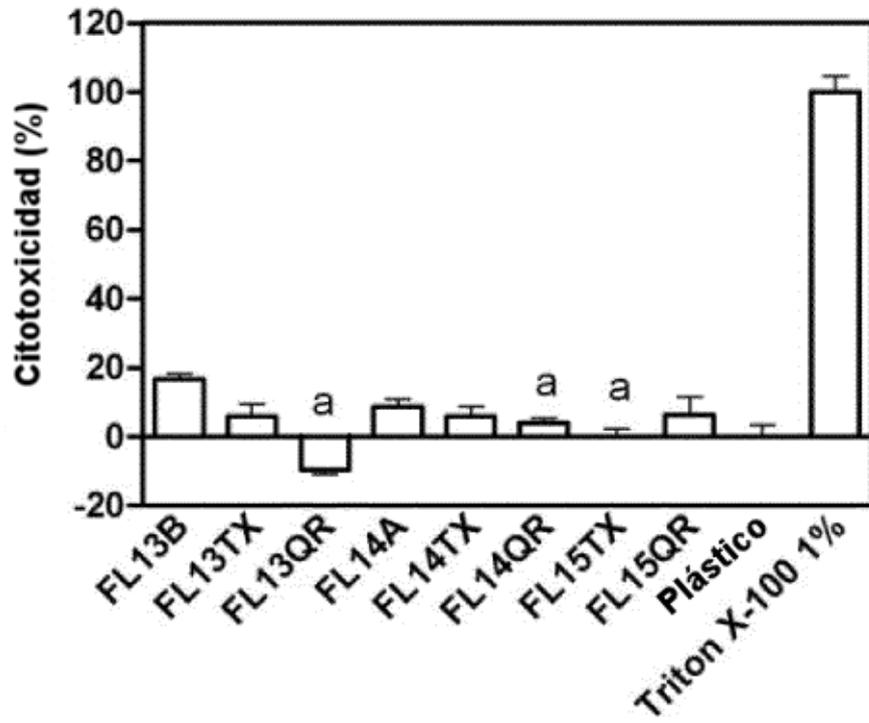


FIG. 8

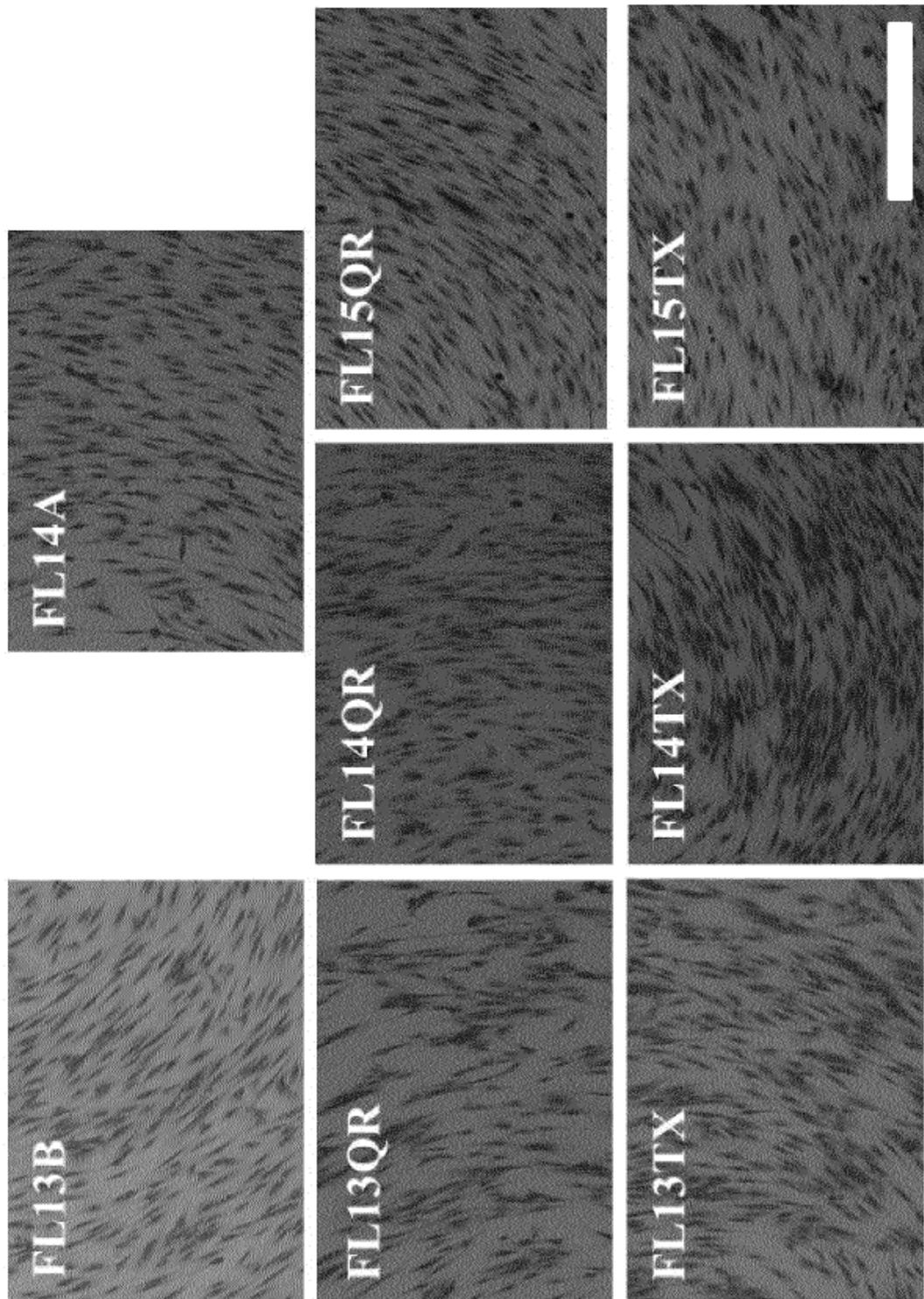


FIG. 9

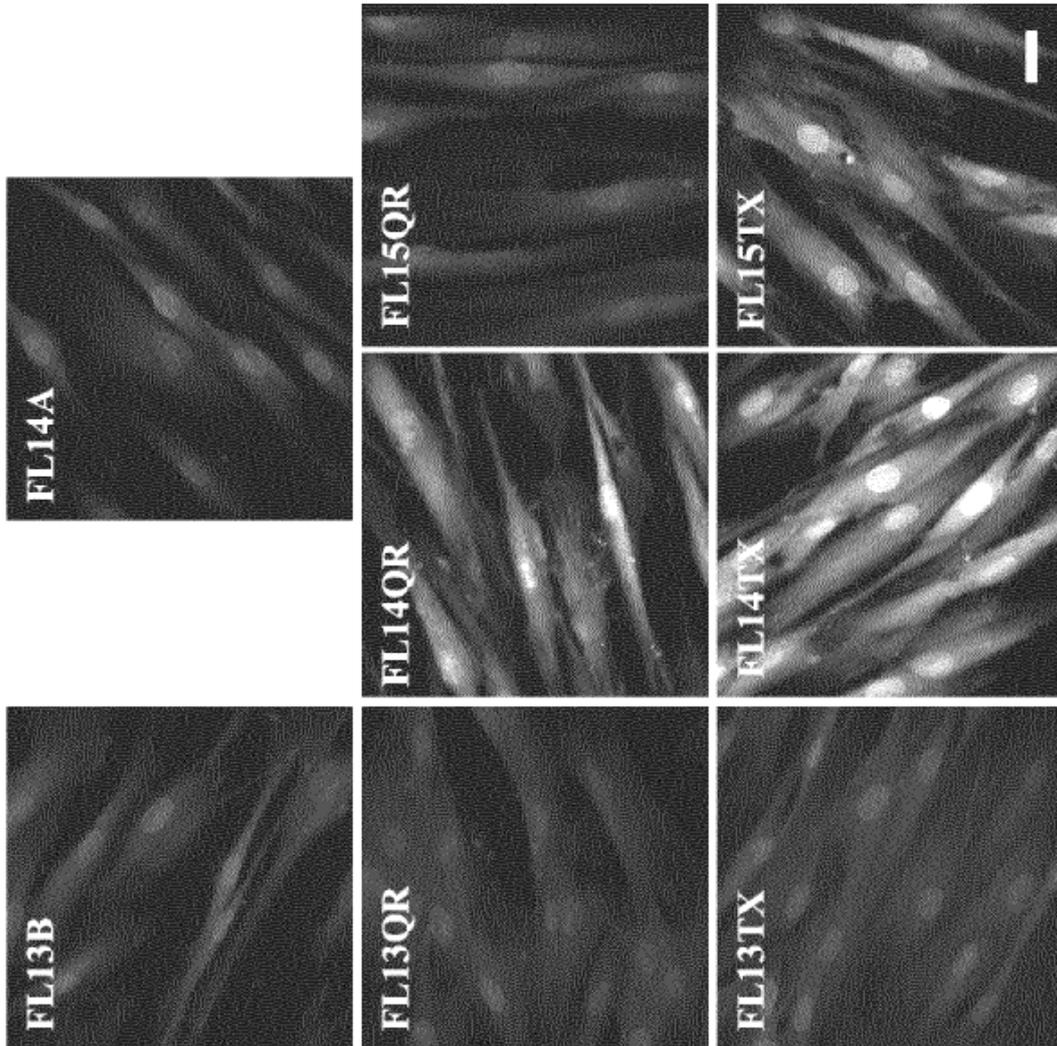


FIG. 10

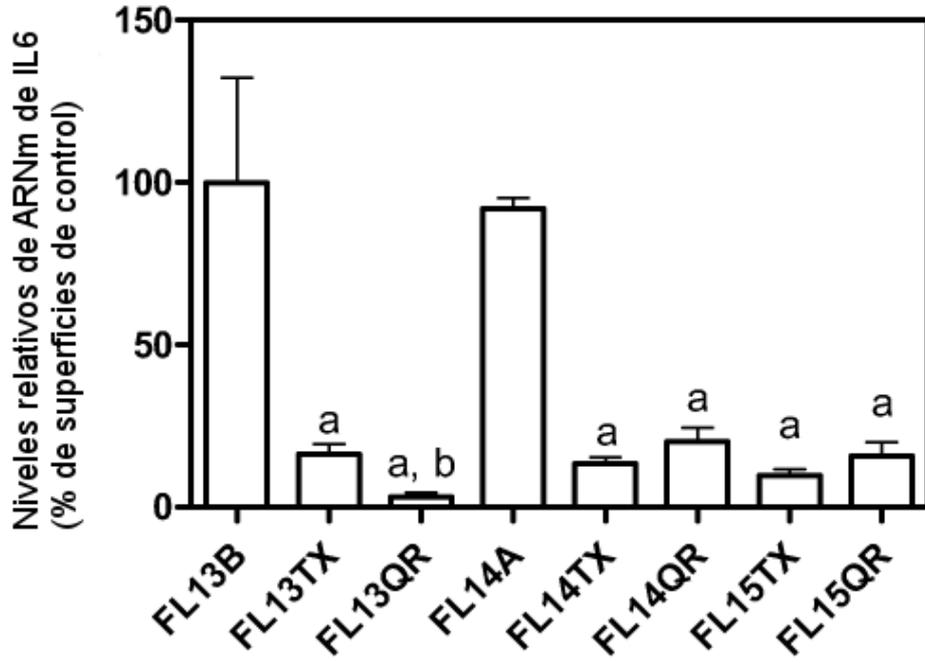


FIG. 11

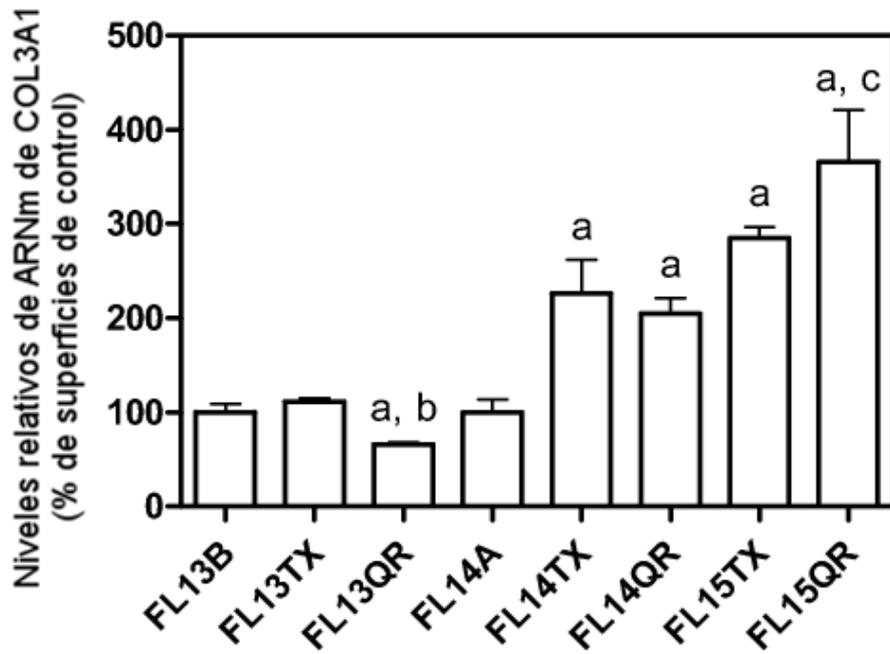


FIG. 12

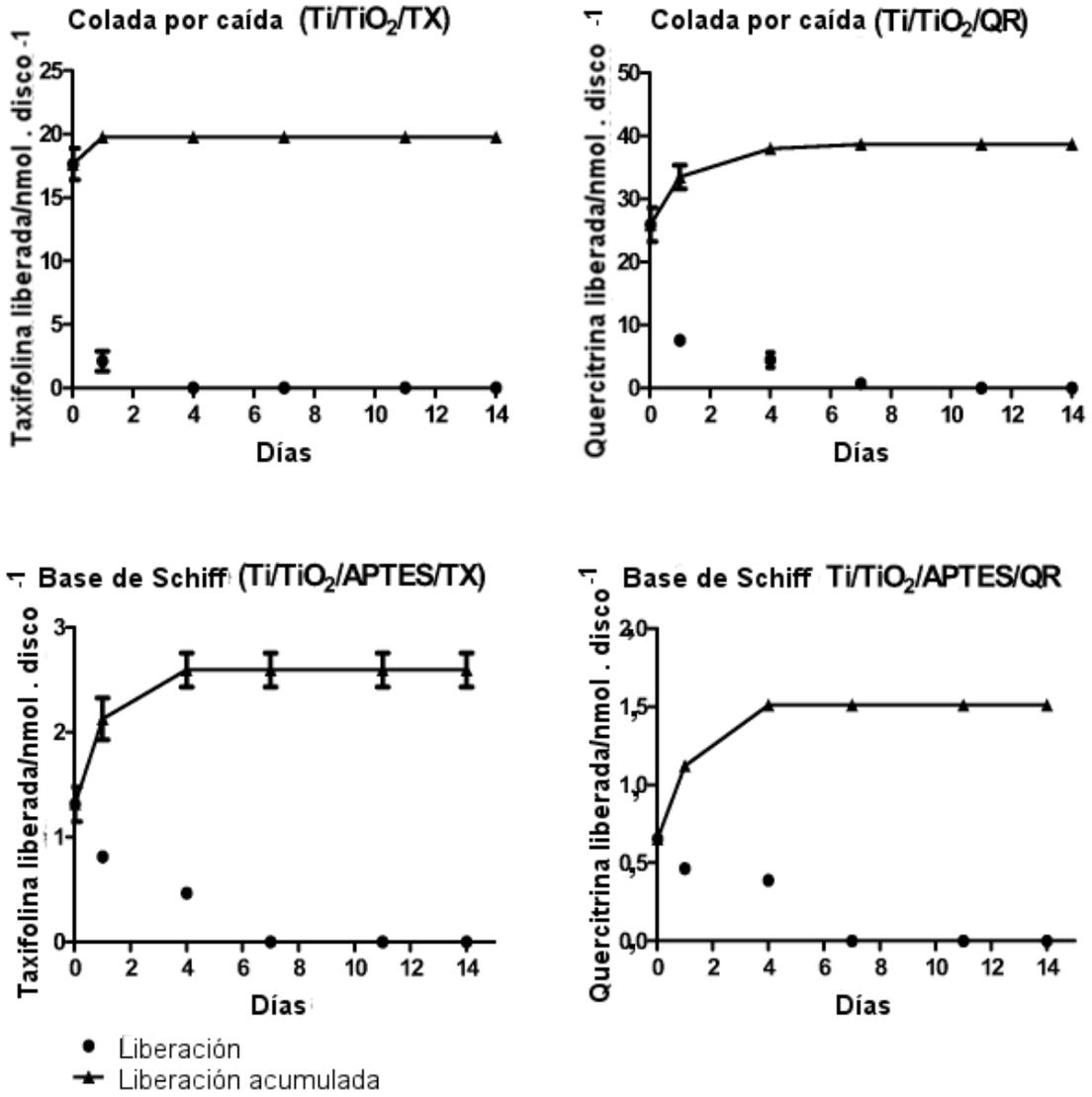


FIG. 13

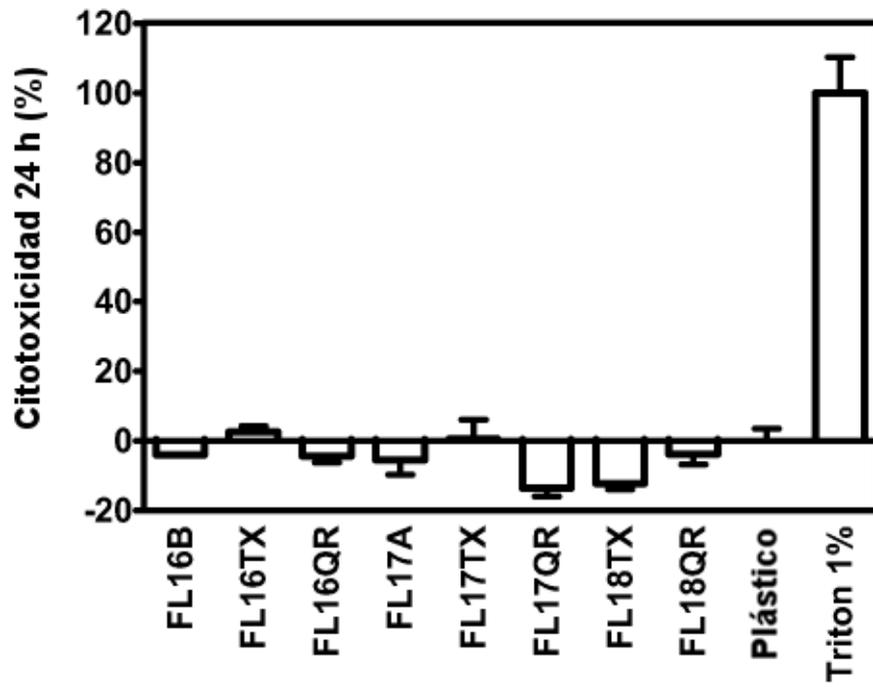


FIG. 14

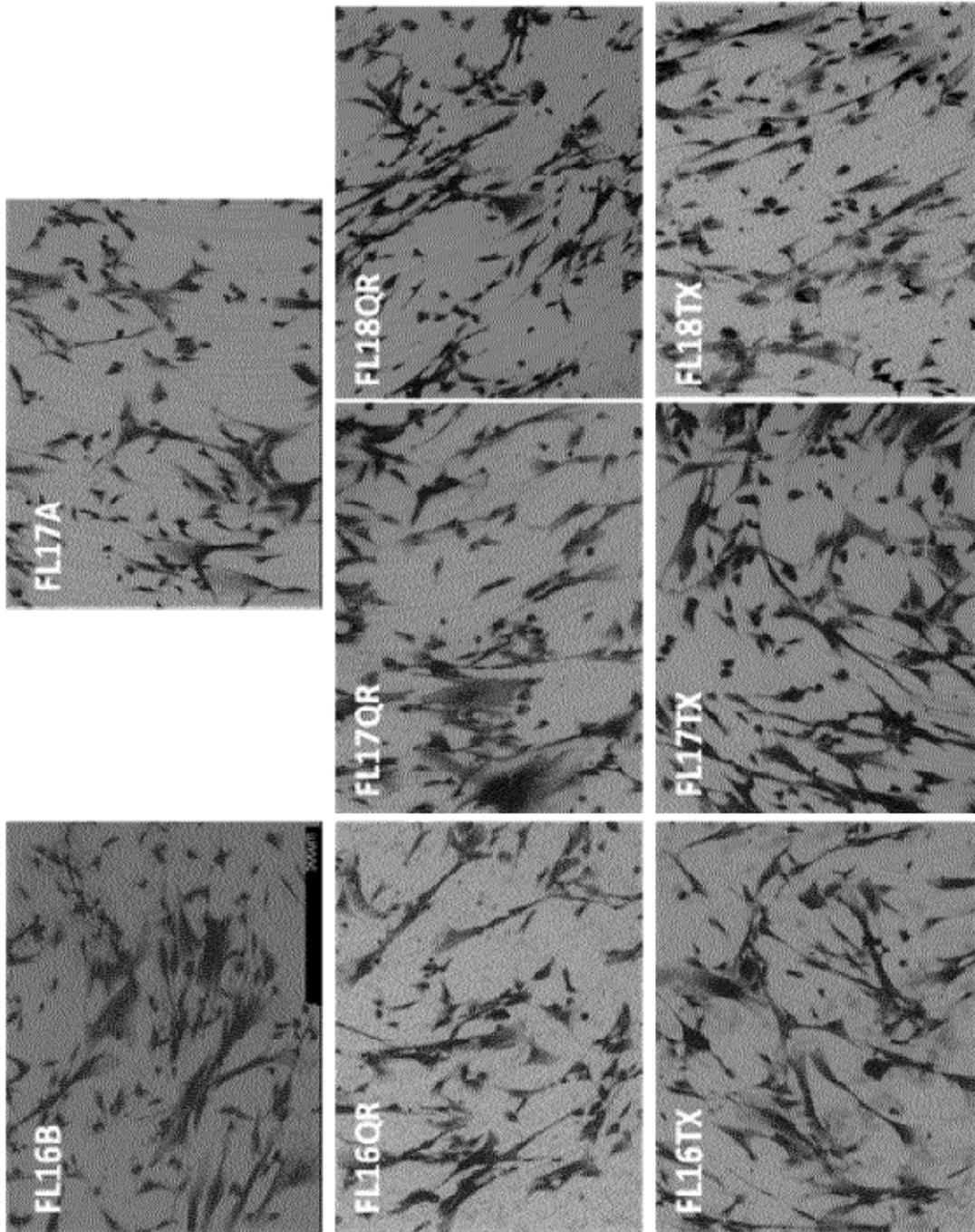


FIG. 15

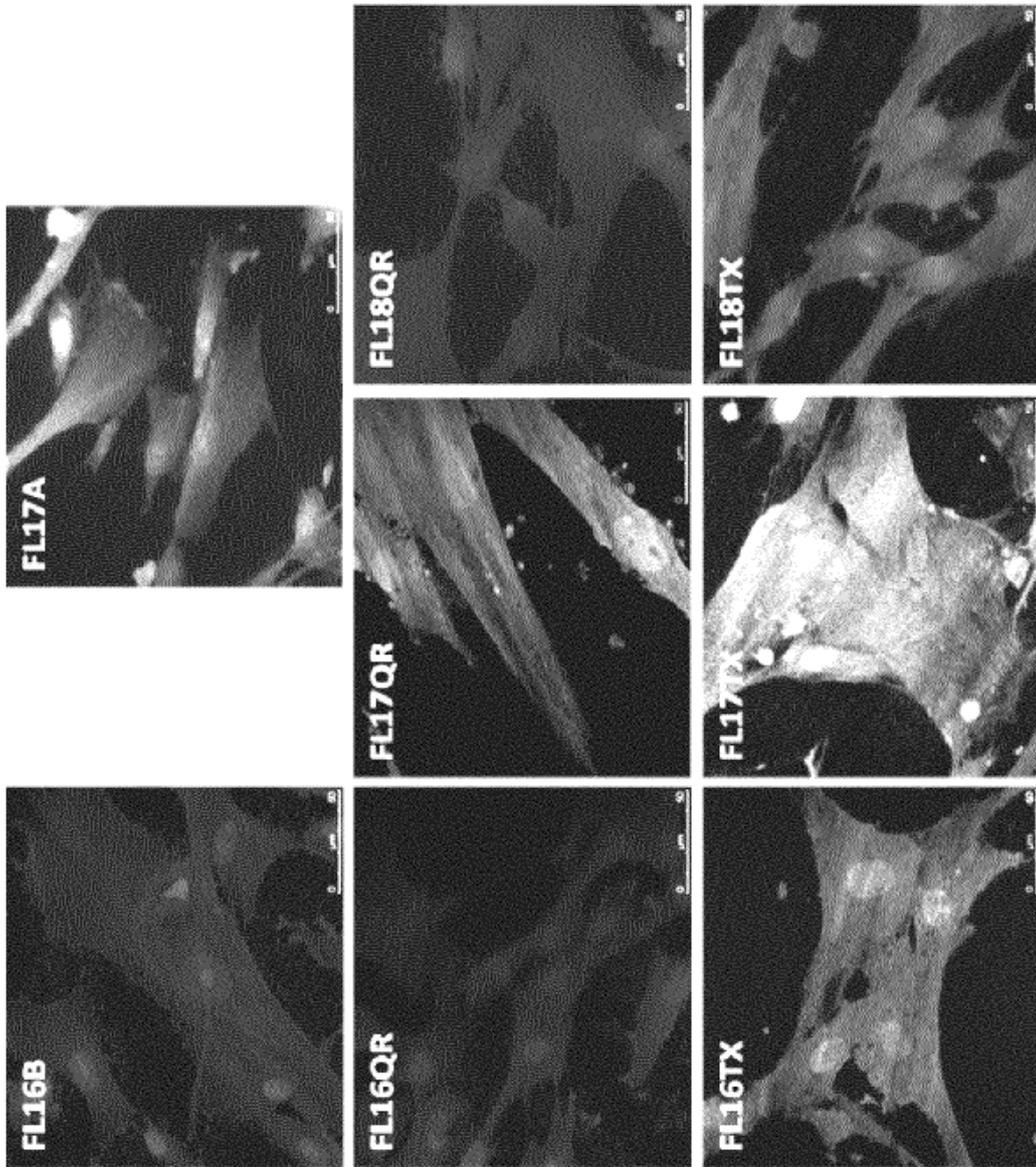


FIG. 16

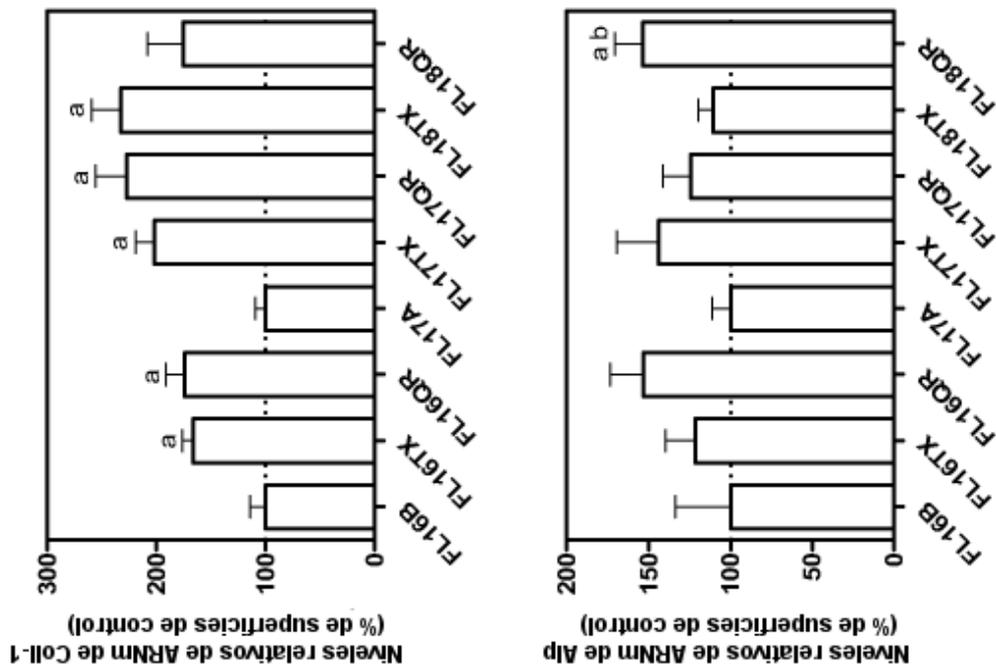
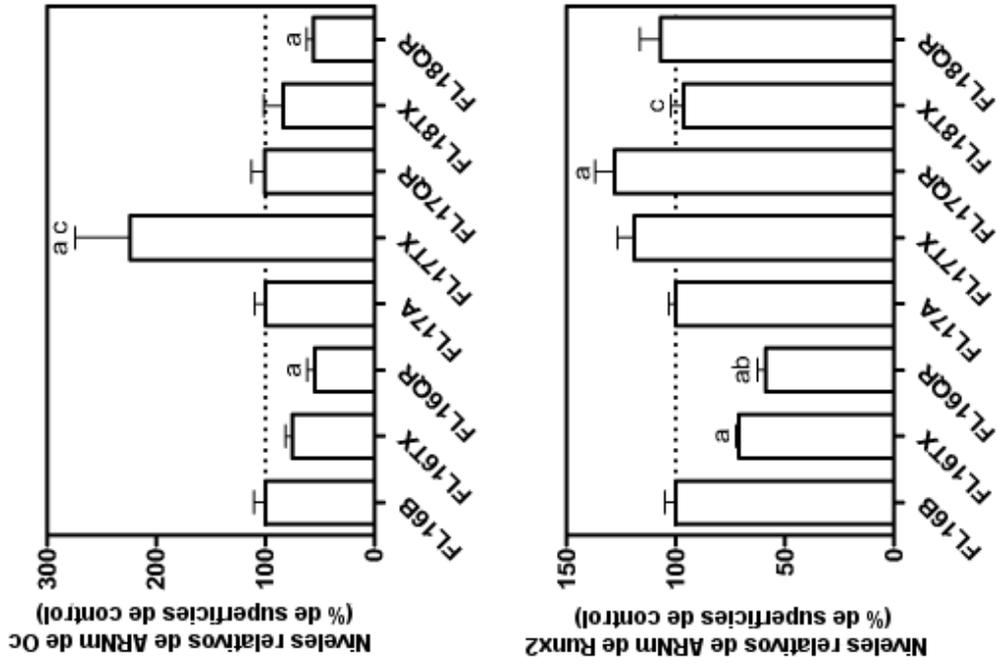


FIG. 17

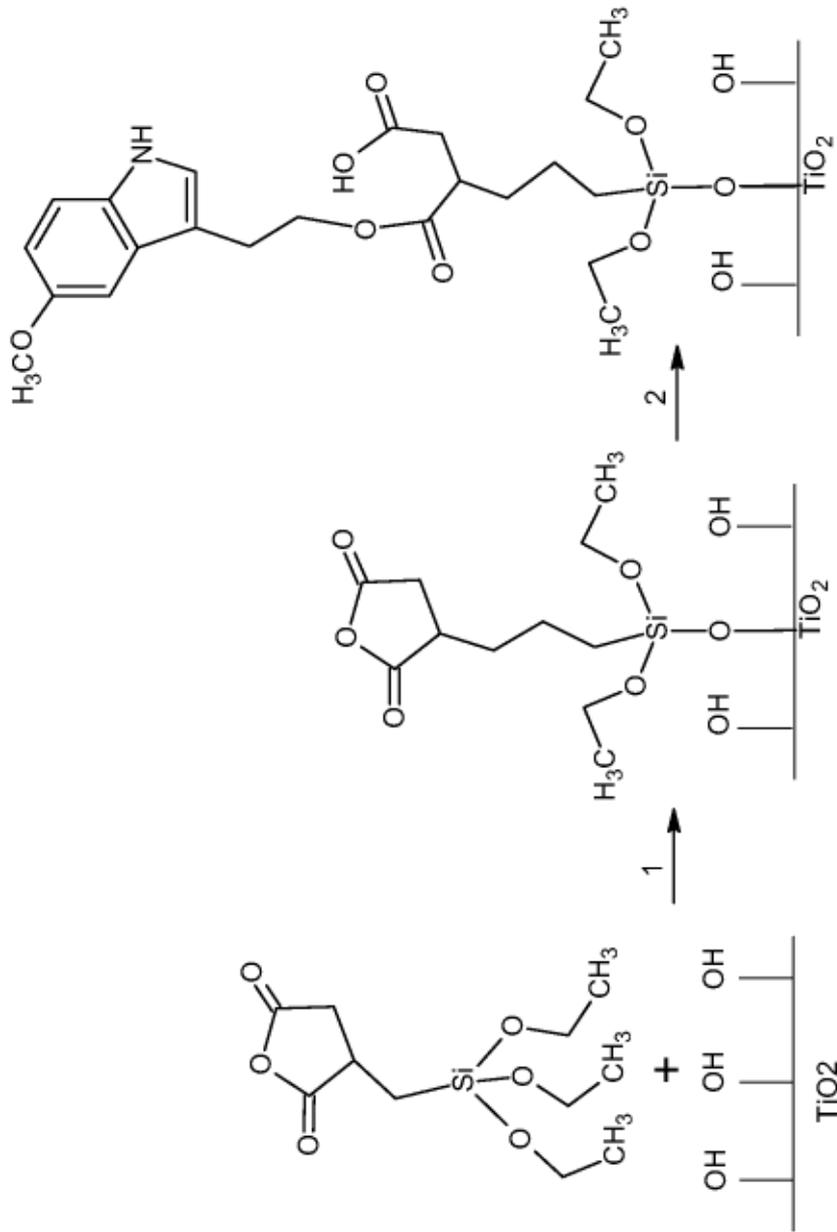


FIG. 18

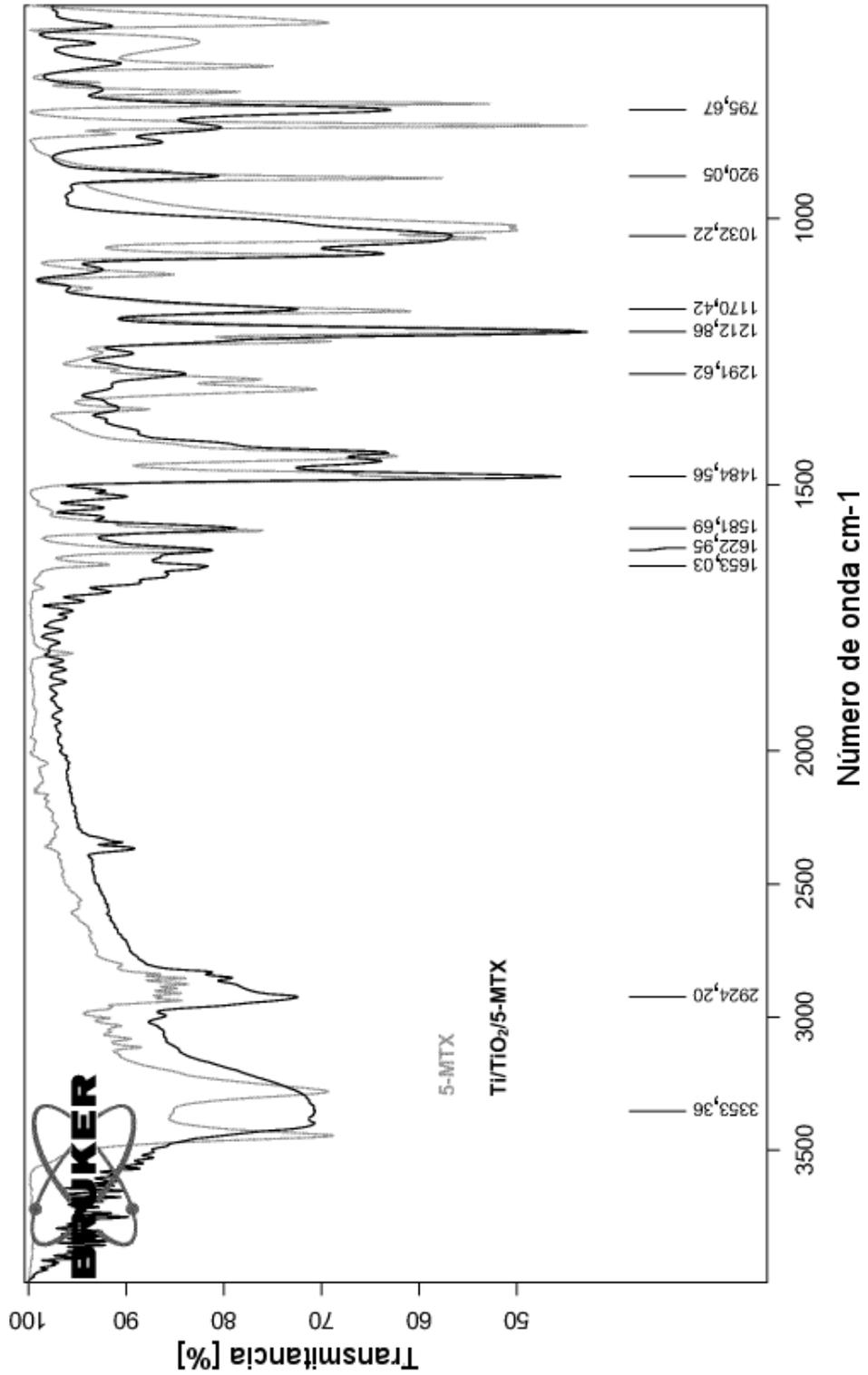


FIG. 19