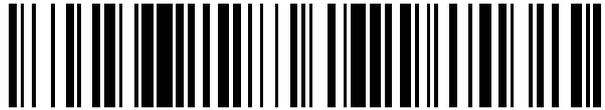


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 646**

21 Número de solicitud: 201830597

51 Int. Cl.:

**A61L 27/06** (2006.01)  
**A61L 27/28** (2006.01)  
**A61C 8/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**19.06.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.12.2019**

71 Solicitantes:

**BIOTECHNOLOGY INSTITUTE, I MAS D, S.L.**  
**(100.0%)**  
**SAN ANTONIO 15, 5º**  
**01005 VITORIA (Araba/Álava) ES**

72 Inventor/es:

**ANITUA ALDECOA, Eduardo**

74 Agente/Representante:

**TRIGO PECES, José Ramón**

54 Título: **MÉTODO DE TRATAMIENTO SUPERFICIAL DE UN IMPLANTE DENTAL O COMPONENTE PROTÉSICO, Y UN IMPLANTE DENTAL O COMPONENTE PROTÉSICO PROVISTO DE UNA SUPERFICIE NANOPOROSA**

57 Resumen:

Método de tratamiento superficial de un implante dental o de un componente protésico fabricado de titanio o de una aleación de titanio, que permite obtener una superficie exterior del implante o del componente protésico con notable capacidad de prevenir la adhesión bacteriana y mejor acabado estético. Dicho método comprende los pasos de dotar a una superficie exterior del implante o del componente protésico de una rugosidad superficial, y aplicar un anodizado sobre el implante o el componente protésico suavizando la rugosidad y generando nanoporos en dicha superficie exterior del implante o del componente protésico. La invención se refiere asimismo a un implante dental o un componente protésico fabricado de titanio o de una aleación de titanio, que comprende una superficie exterior que es rugosa y está además provista de nanoporos.

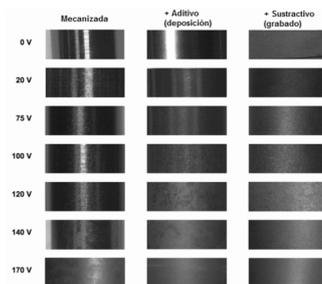


FIG. 1

**DESCRIPCIÓN**

**MÉTODO DE TRATAMIENTO SUPERFICIAL DE UN IMPLANTE DENTAL O COMPONENTE PROTÉSICO, Y UN IMPLANTE DENTAL O COMPONENTE PROTÉSICO PROVISTO DE UNA SUPERFICIE NANOPOROSA**

5

**Sector de la técnica**

10 La invención se refiere a un método de tratamiento superficial de un implante dental o componente protésico, y en particular a un método que comprende la formación de una rugosidad superficial en el implante dental o el componente protésico y el posterior anodizado del implante dental o del componente protésico para suavizar dicha rugosidad, formar  
15 nanoporos sobre dicha rugosidad y dotar de una coloración particular a la superficie. La invención se refiere asimismo a un implante dental o componente protésico provisto de una superficie exterior rugosa que presenta nanoporos.

20 **Estado de la técnica**

Los implantes dentales, generalmente fabricados de titanio, permiten anclar una o más prótesis dentales en huesos maxilares o mandibulares parcial o totalmente desdentados. Ello es posible gracias a  
25 la capacidad que presenta el titanio de oseointegrarse, es decir, de establecer una interacción directa e íntima con el hueso. Además, el titanio espontáneamente forma una capa superficial de óxido que previene la corrosión del implante y su degradación mecánica cuando recibe las fuerzas originadas en su función.

30

En el campo de la implantología dental, es conocido el tratamiento superficial de los implantes dentales con el fin de dotar a la superficie del implante de propiedades mejoradas que favorecen la integración del implante en el tejido óseo y por tanto incrementan las tasas de éxito de la  
35 implantación. Sin embargo, a pesar del desarrollo de la técnica, aún se producen fallos en la implantación del implante debidos a diferentes

causas.

Es conocido que la fijación de los implantes dentales es un evento complejo porque hay tres tipos de tejidos implicados: el tejido epitelial, el  
5 tejido blando conectivo y el hueso. Se ha descrito en la literatura que, en dispositivos transepiteliales, se dan cuatro modalidades predecibles de fallo. La primera consiste en la recesión del tejido blando alrededor del implante, creando un saco o vacío. En segundo lugar, el tejido conectivo todavía inmaduro penetra en los poros del implante generando una fuerza  
10 de levantamiento en un proceso llamado "permigración". Esta desestabilización del tejido blando rompe el sellado protector alrededor del implante y deja vía libre para la potencial entrada de patógenos a esa zona entre el implante y el tejido blando. Las otras dos modalidades de fallo son la infección y los procesos traumáticos. Por ello existe un  
15 consenso claro acerca de la necesidad de generar un sellado lo más ajustado posible en la interfaz entre el tejido blando y el implante como primera barrera ante la infección y como elemento primordial para el éxito a largo plazo de los implantes y componentes transepiteliales. De hecho, la causa más frecuente de fallo en la implantación de implantes dentales  
20 tiene origen en la colonización de microbios en la zona entre el implante y la prótesis. Esta causa de fallo destaca entre el resto debido a que se produce con más frecuencia y a que presenta importantes implicaciones clínicas.

Es por ello que existe una creciente preocupación por el  
25 mantenimiento de los tejidos blandos gingivales y por conseguir un sellado biológico ajustado entre los tejidos blandos y la superficie del implante y de la prótesis ya que se sabe que es crucial para el éxito a corto y medio plazo de la implantación. Los fibroblastos gingivales son el  
30 mayor constituyente del tejido periodontal, y se encargan de mantener la integridad estructural de los tejidos conectivos así como de proporcionar un cierre ajustado del tejido blando en la parte transmucosal del implante.

La acumulación de bacterias en esta zona entre el implante, la  
35 prótesis dental y los tejidos blandos gingivales puede originar la formación de biocapas, es decir, a acumulación ordenada de bacterias en capas

gruesas de muchos individuos, que son resistentes al tratamiento con antibióticos, y producir enfermedades inflamatorias tales como la mucositis peri-implante y la peri-implantitis. La peri-implantitis se caracteriza por la pérdida del hueso soporte alrededor del implante. Se estima que la peri-implantitis se produce en un 6,6 a un 36,6% de los implantes colocados en hueso.

Si no se previene la acumulación de bacterias, las posibles infecciones producidas en consecuencia pueden requerir la retirada del implante y los tejidos afectados, y la posterior limpieza y curación de la zona antes de que sea posible colocar un nuevo implante. Estas operaciones implican un coste y una molestia adicionales para el paciente y pueden acarrear problemas de salud graves.

Por ello, es fundamental desarrollar superficies de implantes en la zona transmucosa y transeptal del implante que reduzcan el número inicial de bacterias adheridas y, así, minimizar el riesgo de formación de placa y la subsiguiente inflamación de los tejidos blandos.

Con el fin de intentar reducir el desarrollo de la placa bacteriana en implantes se han probado en la cavidad oral numerosos materiales con diferentes características y tratamientos superficiales. Algunos de estos tratamientos contienen iones metálicos como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , etc., que, una vez liberados al entorno alrededor del implante, tienen un efecto bactericida. Sin embargo, en componentes de implantación prolongada, este tipo de superficies puede suponer un problema por la acumulación de estos metales en la sangre. En estos casos la acción bactericida de estos iones metálicos está generalmente limitada a los momentos iniciales de la implantación y busca la asepsia durante la cirugía. Si se quiere que estos iones metálicos actúen en un plazo más largo de tiempo, existen estrategias de "atrapamiento" de los iones en capas de óxido de manera que éstos sólo se liberen una vez que esas capas protectoras se degradan. Esto ocurre en aquellos implantes o prótesis sometidos a fenómenos tribológicos, como son las prótesis de rodilla o de cadera.

Por otro lado, existen tratamientos cuyos efectos antibacterianos se basan en la textura superficial. Es conocido que una microrrugosidad creciente facilita la formación de biocapas bacterianas en superficies de implantes y componentes protésicos. Por el contrario, las modificaciones en la escala nanométrica, ya sea mediante la inclusión de nanotubos o nanoporos se han demostrado muy efectivas en la inhibición de la adhesión bacteriana. Las técnicas de obtención de estas nanoestructuras, especialmente aquéllas que producen estructuras más ordenadas, hacen difícil su traslación a geometrías complejas como las de la producción ordinaria de implantes. Además, estos tratamientos por sí mismos, suelen tener un acabado superficial grisáceo que es poco estético para la aplicación deseada.

Con el fin de dotar a los componentes transepiteliales de una estética favorable para la reconstrucción protésica posterior, se han realizado recubrimientos duros como los generados por la deposición por vapor de plasma (PVD) de nitruro de titanio. Sin embargo, su efectividad antibacteriana es limitada y se debe, en gran parte, a su baja rugosidad y el hecho de que el endurecimiento superficial limita la liberación de iones al medio.

Es necesario, por tanto, disponer de superficies antibacterianas que cumplan estos tres requisitos a la vez: que su actividad bacteriana no se base en la liberación de iones metálicos al cuerpo que puedan acumularse en el organismo; que estén estéticamente adaptadas a la reconstrucción protésica; y que sean inhibidoras de la adhesión bacteriana inicial para la prevención de la formación de biocapas microbianas y de placa bacteriana que pueda poner el riesgo la implantación.

30

### **Descripción breve de la invención**

Es objeto de la invención un método de tratamiento superficial de un implante dental o de un componente protésico fabricado de titanio o de una aleación de titanio, que permite obtener una superficie exterior del implante o del componente protésico con notable capacidad de prevenir la

35

adhesión bacteriana. Dicho método comprende los pasos de dotar a una superficie exterior del implante o del componente protésico de una rugosidad superficial, y aplicar un anodizado sobre el implante o el componente protésico suavizando la rugosidad y generando nanoporos en dicha superficie exterior del implante o del componente protésico. Es decir, en la presente invención se propone el uso combinado de condiciones suaves de modificación de la textura superficial con nanoporos a través del anodizado sobre superficies previamente dotadas de rugosidad por otros métodos.

Es objeto asimismo de la invención un implante dental o un componente protésico fabricado de titanio o de una aleación de titanio, que comprende una superficie exterior rugosa provista de nanoporos.

La invención permite conseguir un implante dental o componente protésico con una mayor resistencia a la adhesión bacteriana. Además, la invención proporciona una mejora de las características estéticas de la implantación del implante o del componente protésico ya que las tonalidades superficiales obtenidas permiten un mejor acabado estético del propio implante o componente protésico. Además, el implante o componente protésico según la invención presenta la ventaja de que no libera iones metálicos. Por otra parte, el implante y componente protésico de la presente invención permite una mejor fijación del tejido blando (adhesión de fibroblastos). Por último, el método según la invención evita el uso de compuestos fluorados, que son la base de la obtención de nanotubos/nanoporos en titanio según métodos convencionales y que presentan una elevada toxicidad/riesgo durante su manipulación.

### **Descripción breve de las figuras**

Los detalles de la invención se aprecian en las figuras que se acompañan, no pretendiendo éstas ser limitativas del alcance de la invención:

- La Figura 1 muestra el aspecto visual en función del voltaje de anodizado aplicado en función de la superficie preexistente: tras

el proceso de mecanizado, tras el tratamiento aditivo de nitrurado y tras el tratamiento sustractivo ácido.

- 5 - La Figura 2 muestra el histograma de distribución del diámetro de poro en nm en función de una selección de voltajes de anodizado sobre muestras con tratamiento aditivo de nitrurado [A) 75V, B) 100V, C) 125V, D) 140V, E) 170V].
- 10 - La Figura 3 muestra el histograma de distribución del diámetro de poro en nm en función de una selección de voltajes de anodizado sobre muestras con tratamiento sustractivo ácido [A) 75V, B) 100V, C) 125V].
- 15 - La Figura 4 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido que proporcionan el aspecto topográfico en la micro y nanoescala de las superficies antes y después de la aplicación de un mismo tratamiento de nanotexturizado [A) Superficie tras el mecanizado B) Superficie tras el mecanizado más anodizado 100V C) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo D) 20 Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo más anodizado 100V E) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado F) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado más anodizado 100V].
- 25 - La Figura 5 muestra los resultados de los experimentos de adhesión bacteriana de las cepas *Streptococcus Sanguinis* (SS) y *Staphylococcus Aureus* (SA) en condiciones estáticas [A) Superficie tras el mecanizado B) Superficie tras el mecanizado más anodizado 100V C) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo D) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo más anodizado 100V E) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado F) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado más anodizado 100V].
- 30 - La Figura 6 muestra los resultados de los experimentos de adhesión bacteriana de las cepas *Streptococcus Sanguinis*
- 35 - La Figura 6 muestra los resultados de los experimentos de adhesión bacteriana de las cepas *Streptococcus Sanguinis*

5 (SS), Streptococcus Mutans (SM) y Aggregatibacter Actinomycetemcomitans (AA) en condiciones dinámicas y acondicionamiento en saliva artificial o natural [A) Superficie tras el mecanizado B) Superficie tras el mecanizado más anodizado 100V C) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo D) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo más anodizado 100V].

10 - La Figura 7 muestra los resultados de los experimentos de extracción de ADN mediante técnicas de metagenómica realizados tras 24h de adhesión bacteriana in vivo., recogándose en la gráfica los resultados de las 6 bacterias más abundantes encontradas en las diferentes superficies [A) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado B) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado más anodizado 100V].

15 - La Figura 8 muestra los resultados de los experimentos de extracción de ADN mediante técnicas de metagenómica realizados tras 24h de adhesión bacteriana in vivo, recogándose en la gráfica los resultados de las 25 bacterias más patógenas en relación con fenómenos de peri-implantitis encontradas en las diferentes superficies [A) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado B) Superficie tras el tratamiento aditivo de nitrurado más anodizado 100V].

20 - La Figura 9 muestra los resultados de los experimentos de adhesión celular de fibroblastos primarios de origen gingival en términos de estiramiento y ocupación superficial sobre: A) Superficie tras el mecanizado; B) Superficie tras el mecanizado más anodizado 100V; C) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo; y D) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo más anodizado 100V.

25 - La Figura 10 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados representativas de la ocupación de las células fibrobásticas sobre: A) Superficie tras

el mecanizado; B) Superficie tras el mecanizado más anodizado 100V; C) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo; y D) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo más anodizado 100V.

5

- La Figura 11 muestra los resultados de los experimentos de diferenciación celular de fibroblastos primarios de origen gingival en términos síntesis de procolágeno tipo 1 y fibronectina [A) Superficie tras el mecanizado B) Superficie tras el mecanizado más anodizado 100V C) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo D) Superficie tras el tratamiento ácido sustractivo más anodizado 100V].

10

#### **Descripción detallada de la invención**

15

La presente invención tiene como objeto un método de tratamiento superficial de un implante dental o de un componente protésico fabricado de titanio o una aleación de titanio. Dicho método comprende un paso de dotar a una superficie exterior del implante o del componente de una rugosidad superficial, y un posterior paso de aplicar un anodizado sobre el implante o el componente, suavizando la rugosidad y generando nanoporos en dicha superficie exterior del implante o del componente. Por nanoporos se entiende una pluralidad de agujeros con un diámetro dentro de una dispersión alrededor de un diámetro medio menor o igual que 300 nm, donde los agujeros presentan una profundidad sustancialmente igual o equivalente al diámetro y están distribuidos de manera aleatoria cubriendo toda la superficie.

20

25

30

35

En algunos modos de realización del método según la invención, el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial comprende crear una rugosidad superficial mediante un mecanizado del implante o del componente protésico. En otros modos de realización, dicha rugosidad superficial se crea mediante un tratamiento mecánico del implante o del componente. En otros modos de realización, dicha rugosidad superficial se crea mediante un tratamiento químico del implante o del componente, mediante un proceso de deposición, o

mediante un tratamiento térmico del implante o del componente. En otros modos de realización, el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial comprende crear una rugosidad superficial mediante un tratamiento electroquímico del implante o del componente.

5

Por su parte, el paso de aplicar un anodizado sobre el implante o el componente puede comprender, en algunos modos de realización de la invención, los pasos de sumergir el implante o el componente en un baño electroquímico de al menos un electrolito y someter a dicho baño a un voltaje. Pueden utilizarse electrolitos tales como ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido fluorhídrico (HF), ácido oxálico ( $C_2H_2O_4$ ) o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el baño electroquímico puede comprender entre el 1% y el 50% de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). En otro ejemplo, el baño electroquímico puede comprender entre el 1 y el 3% de ácido oxálico ( $C_2H_2O_4$ ). El voltaje puede ser de 25 a 200 V, y preferentemente de 75 a 170 V, y más preferentemente de 80 a 120 V. El voltaje puede aplicarse, preferentemente, durante al menos 1 segundo y menos de 10 minutos.

10  
15  
20

En algunos modos de realización, el paso de aplicar un anodizado sobre el implante o el componente se realiza a una temperatura cuyo valor es de  $-25$  a  $100^\circ C$ . Por ejemplo, en ciertos modos de realización el paso de aplicar un anodizado sobre el implante o el componente puede realizarse a temperatura ambiente.

25

Es objeto asimismo de la invención un implante dental o componente protésico, fabricado de titanio o de una aleación de titanio, que comprende una superficie exterior rugosa provista de nanoporos. Por nanoporos se entiende una pluralidad de agujeros con un diámetro dentro de una dispersión alrededor de un diámetro medio menor o igual que 300 nm, donde los agujeros presentan una profundidad sustancialmente igual o equivalente al diámetro y están distribuidos de manera aleatoria cubriendo toda la superficie. En algunos modos de realización, la superficie exterior rugosa comprende una distribución aleatoria de poros circulares de diámetro y profundidad variables entre 10 y 300 nm.

30  
35

A continuación se describen ensayos realizados sobre el método según la invención y productos resultantes.

## 1. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS

5

### *1.1 Evaluación estética y topográfica de las superficies*

La nanotextura superficial objeto de la presente invención se generó sobre diferentes superficies preexistentes para valorar tanto el efecto estético como el funcional. Para mayor representatividad, se escogieron tres tipos de sustrato: sustratos sin modificación tras el mecanizado, es decir, con la superficie tal y como queda después del paso de la herramienta de torneado para formar un implante; sustratos de la misma índole pero a los que se les ha aplicado un tratamiento aditivo con el fin de dotar a la superficie de un acabado de mayor dureza (nitrurado); y sustratos de la misma índole pero a los que se les ha aplicado un tratamiento superficial sustractivo (grabado ácido) con el fin de dotar de rugosidad según los estándares de la industria. Para dotar de nanotextura, se realizaron distintos tratamientos de anodizado a diferentes voltajes sobre los tres sustratos. El aspecto estético de las distintas superficies obtenidas se ha observado mediante microscopía óptica, observándose en la Figura 1 imágenes obtenidas en el microscopio. Después de consultar con varios expertos protésicos, los tonos más favorables para la zona gingival eran los producidos por las muestras con nanotextura después de tratamiento aditivo (a 100V, 140V o 170V) o después del tratamiento sustractivo (a 100V). En particular, se destacó el efecto de la superficie con tratamiento aditivo y posterior nanotexturizado a 100V por generar unos reflejos rosáceos muy parecidos al tono natural de la encía. El histograma de distribución de diámetro de poro de las nanotexturas sobre tratamiento aditivo (visible en la Figura 2) muestra que a medida que se aumenta el voltaje de anodizado, aumenta también la dispersión en el diámetro del poro, siendo la media del mismo alrededor de 60 nm (75V), 70 nm (100V), 100 nm (125V y 140V) y 210 nm (170V). Lo mismo ocurre en el caso de las nanotexturas sobre tratamiento sustractivo (Figura 3) aunque las medias son ligeramente inferiores: 55 nm para 75V, 65 nm para 100V y 70 nm

para 125 V.

5 Por sus resultados estéticos y su mayor homogeneidad de tamaño de poro en el entorno de los 100 nm de diámetro, para los siguientes experimentos se utilizaron superficies con tratamiento de nanotexturizado mediante anodizado a 100V. En la Figura 4 se muestra el aspecto topográfico de estas superficies respecto a sus predecesoras (mecanizado, tratamiento sustractivo o aditivo) obtenido mediante microscopía electrónica de barrido a 20.000 aumentos. En todos los  
10 casos se puede observar que, tras el tratamiento de nanotexturizado, se pueden ver las características topográficas del tratamiento superficial preexistente al que se le añaden los nanoporos. Es notable el efecto en el caso del tratamiento aditivo, ya que el nanotexturizado genera una superficie con una distribución de la porosidad más homogénea y regular.

15

### *1.2 Cuantificación de la adhesión bacteriana*

El propósito de esta serie de ensayos es comparar la capacidad de las superficies con nanotextura porosa objeto de la presente invención con las superficies de referencia usadas normalmente en componentes transepiteliales.  
20

En una primera etapa, se realizaron experimentos in vitro, en condiciones estáticas, con dos cepas significativas de procesos infecciosos generales (Staphylococcus Aureus) y más vinculados a la cavidad oral (Streptococcus Sanguinis). En todos los casos, la nanotextura permitió rebajar de manera estadísticamente significativa la adhesión de ambas cepas bacterianas en comparación a los controles sin nanotextura.  
25

30

Seguidamente, se realizaron experimentos más complejos y representativos del funcionamiento real de las superficies en boca mediante un modelo dinámico de adhesión bacteriana bajo acondicionamiento de saliva artificial y natural (obtenida de pacientes sanos) y con cepas, todas ellas, representativas de la cavidad oral: la citada Streptococcus Sanguinis, la Streptococcus Mutans y la  
35

Aggregatibacter Actinomycetemcomitans. En este caso, se compararon sólo superficies mecanizadas y con tratamiento sustractivo con y sin el tratamiento de nanotexturizado. Llama la atención que, a diferencia del ensayo en estático, sólo el nanotexturizado sobre la superficie  
5 previamente modificada con tratamiento sustractivo (y no sobre la superficie mecanizada) obtiene unos resultados sistemática y significativamente menores de adhesión bacteriana independientemente de la cepa bacteriana estudiada y de si el medio estaba condicionado con saliva artificial o natural.

10

El siguiente paso fue la evaluación in vivo de la capacidad adhesiva de las superficies sin y con nanotextura, en este caso en superficies dotadas previamente del tratamiento aditivo. Para ello se dispusieron discos con superficies modificadas o no en férulas adaptadas  
15 específicamente a 6 pacientes y, al cabo de 24h en boca, se procedió a la medición de la cantidad de bacterias presentes en ellos mediante técnicas metagenómicas. Para el análisis de los datos, se seleccionaron, en un primer momento, las 6 bacterias más abundantes en boca (Figura 7, correspondiéndose los resultados A y B con las superficies sin y con nanotextura, respectivamente), posteriormente, las 25 bacterias más patógenas relacionadas con procesos infecciosos en la cavidad oral (Figura 8, correspondiéndose los resultados A y B con las superficies sin y  
20 con nanotextura, respectivamente). El resultado, en ambos casos arrojó una disminución estadísticamente significativa de la adhesión bacteriana en presencia de la nanotextura.

25

### *1.3 Evaluación de la adhesión de fibroblastos gingivales*

Una vez determinado el mayor rechazo a la adhesión bacteriana de  
30 las superficies con nanotextura, es conveniente determinar que ese rechazo no sea generalizado a cualquier célula, en particular a las células de interés en el área gingival: los fibroblastos gingivales. Por consiguiente, se realizaron experimentos de adhesión y extensión celular sobre discos solamente mecanizados y discos con rugosidad por tratamiento sustractivo, ambos tipos a su vez con superficies sin y con nanotextura.  
35 Por un lado se evaluó la circularidad de las células (como la inversa de su

extensión), lo que demostraría que las células que se han adherido están bien adheridas y son funcionales y, por otro, la cantidad de área total cubierta por las células, lo que demuestra la afinidad de cada tipo de superficie por la adhesión de este tipo particular de células. Los resultados que se muestran en la Figura 9 (donde A se corresponde con superficies mecanizadas y sin nanotextura, B se corresponde con superficies mecanizadas con nanotextura, C se corresponde con superficies con rugosidad por tratamiento sustractivo y sin nanotextura, y D se corresponde con superficies con rugosidad por tratamiento sustractivo y con nanotextura) indican que las superficies pretratadas y con nanotextura (D) permiten una mayor extensión de los fibroblastos, especialmente cuando las células se exponen a la superficie en tiempos mayores a 60 minutos. En el caso de la cobertura superficial, las superficies pretratadas y con nanotextura (D) son las que más porcentaje de superficie está ocupado por las células de manera muy diferencial a los 90 minutos de exposición, aunque en los tiempos anteriores los resultados son muy similares entre todas las superficies con algún tipo de tratamiento superficial (B, C y D). Las imágenes de microscopía electrónica de la Figura 10 corroboran estos resultados.

#### *1.4 Evaluación de la síntesis de matriz por parte de los fibroblastos gingivales*

Además de que haya un mayor número de células y de que éstas tengan una disposición funcional, es decir, estén bien estiradas sobre la superficie, mediante tests específicos de medición de proteínas liberadas por las células, se puede tener una cuantificación del potencial regenerador, es decir, del potencial de creación de matriz extracelular, que las diferentes superficies estudiadas tienen. En la Figura 11 (donde A se corresponde con superficies mecanizadas y sin nanotextura, B se corresponde con superficies mecanizadas con nanotextura, C se corresponde con superficies con rugosidad por tratamiento sustractivo y sin nanotextura, y D se corresponde con superficies con rugosidad por tratamiento sustractivo y con nanotextura) se muestran los resultados de diferenciación celular mediante la cuantificación de la síntesis de procolágeno tipo 1 y de fibronectina. En el caso de la síntesis de

procolágeno, no se observa ningún aumento significativo cuando las superficies son tratadas con nanotextura (B y D). Tan solo aquéllas más rugosas por el tratamiento sustractivo previo (C y D), independientemente de la nanotextura, obtienen resultados mejores de manera estadísticamente significativa. En cuanto a la síntesis de fibronectina, sólo el tratamiento con nanotextura posterior al pretratamiento de la superficie (D) consigue resultados significativamente mayores.

En conclusión, los resultados de adhesión y diferenciación celular con fibroblastos gingivales muestran que la inhibición de la adhesión es específica para las bacterias y no para las células eucariotas propias del tejido gingival. Más bien al contrario, la nanotextura añadida al pretratamiento de la superficie permite, además de inhibir la adhesión bacteriana de elementos patógenos de la cavidad oral, aumentar el potencial regenerativo a través de una mayor cantidad de células formadoras de tejido sano.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 *Preparación de las superficies*

Para los experimentos se prepararon discos de 12.7 mm de diámetro y 2 mm de espesor y de 6 mm de diámetro y 1 mm de espesor a partir de titanio comercialmente puro en grado IV usado rutinariamente para la fabricación de implantes dentales. Las superficies llamadas de mecanizado corresponden al estado superficial que queda tras el mecanizado (torneado) de las piezas. Sobre esta superficie control se hicieron dos tipos de tratamiento superficial que sirven como modelo. Por un lado se realizó un tratamiento sustractivo, consistente en la inmersión de las piezas en estado de mecanizado en un baño ácido de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HCl concentrado a 90°C y durante 20 minutos y después en HNO<sub>3</sub> al 15% y a temperatura ambiente durante 20 minutos. Por otro lado se realizó un tratamiento aditivo, consistente en la deposición mediante vapor de plasma (PVD) de una capa de 1 a 2 µm de nitruro de titanio. El nanotexturizado se realizó sumergiendo los discos en un baño de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 25% durante 1 minuto y aplicando un voltaje de anodizado variable

entre los 20 y los 170 V. Estos tratamientos se realizaron sobre superficies en estado de mecanizado, tras tratamiento sustractivo y tras tratamiento aditivo. Tras la preparación de cada una de las superficies, los discos se limpiaron inmediatamente en condiciones de sala blanca tipo A  
 5 antes de su esterilización en envases individuales mediante irradiación por rayos  $\beta$  para su almacenaje previo a los ensayos.

### *2.2 Evaluación cualitativa de las superficies por microscopía*

10 Microscopía óptica: la observación cualitativa del acabado estético de las piezas se analizó mediante un microscopio óptico Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con una cámara digital acoplada modelo Leica DFC300FX y con una magnificación 10x.

15 Microscopía electrónica: para la determinación de la micro y la nanotopografía se usó un microscopio electrónico de barrido (SEM, Quanta 200FEG, FEI Eindhoven, Países Bajos) en modo electrones secundarios, con un voltaje de aceleración de 30 kV y un tamaño de haz de 5 Å a distintas magnificaciones entre 1000x y 40000x.

20

### *2.3 Determinación del diámetro de poro*

La evaluación del diámetro medio de los poros se realizó a partir de imágenes de microscopía electrónica de barrido (ver más arriba) a 30000x  
 25 aumentos de 10 zonas diferentes por cada tipo de muestra. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ mediante la aplicación de un filtro de brillo/contraste que permitió aislar los nanoporos del resto de la imagen. Posteriormente se aplicó un algoritmo de recuento que permite determinar aspectos geométricos básicos tales  
 30 como el diámetro de cada poro. Una vez extraídos los datos, se usó el software Origin (v7.0654651) para calcular los histogramas de distribución del diámetro de poro en función de los tratamientos aplicados.

35

### *2.4 Ensayos microbiológicos in vitro*

Cepas bacterianas: Los ensayos en estático se realizaron con con

las cepas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC29213 y *Streptococcus sanguinis* ATCC10556 (*S. sanguinis*). Y los ensayos en dinámico con: *Streptococcus mutans* ATCC25175 (*S. mutans*), *Streptococcus sanguinis* ATCC10556 (*S. sanguinis*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC43718 (*A. actinomycetemcomitans*)

Condiciones experimentales: Las bacterias se precultivaron en placa de agar BHI sin suplementación durante 48 h, para *S. Mutans*, *S. Sanguinis* y *S. aureus* en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, o 72 h para *A. actinomycetemcomitans*, en condiciones de anaerobiosis, a 37°C. A continuación, se incubaron durante 24 h, para *S. Mutans*, *S. Sanguinis* y *S. aureus* en 100 ml de BHI, o 48 h para *A. actinomycetemcomitans* en 200 ml de BHI, a 37°C. Los tiempos y volúmenes del medio de crecimiento bacteriano indicados son los que corresponden a las condiciones óptimas de viabilidad y crecimiento para llevar a cabo los experimentos y se seleccionaron después de analizar varios tiempos diferentes. La concentración de bacterias en las suspensiones fue de 10<sup>8</sup> bacterias/ml, determinada con cámara de Neubauer. Para ser puestas en contacto con los sustratos las bacterias fueron suspendidas en saliva artificial (Jean-Yves Gal, 2001) libre de proteínas y con un valor de pH de 6,8. La adhesión en estático se realizó a 37°C y durante 60 min. El dispositivo experimental empleado para la adhesión en dinámico fue una cámara de Robbins de 9 puertos que permite analizar 9 muestras de forma simultánea y en condiciones de flujo laminar, a una velocidad de 2 ml/min y a temperatura fisiológica. Previamente a los ensayos de adhesión inicial, se realizó un estudio para determinar que las posiciones del dispositivo de Robbins no influirían en los resultados de adhesión final. El experimento de adhesión en dinámico se realizó durante 60 min de forma ininterrumpida, y una vez finalizado, se cuantificó la adhesión y viabilidad. En este caso, todos los experimentos se realizaron simultáneamente para todos los sustratos (superficies mecanizadas con y sin nanotextura, y superficies con rugosidad previa por tratamiento sustractivo con y sin nanotextura). El análisis final de la adhesión se realizó mediante microscopía de fluorescencia con kit de tinción LIVE/DEAD BacLight™. Los experimentos en dinámico se agruparon en dos grupos: un primer grupo, considerando la respuesta del material de

forma directa, en cuyo caso las muestras eran colocadas directamente en el dispositivo de Robbins sin acondicionamiento previo; un segundo grupo, considerando la respuesta del material con acondicionamiento previo, en cuyo caso las muestras eran sometidas a un periodo de 60 min de  
5 acondicionamiento con saliva natural (Sánchez MC, 2011), de un pool obtenido de voluntarios sanos de jóvenes de ambos sexos, incluyendo fumadores y no fumadores. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y con cultivos independientes. Para cada sustrato se ha estudiado la viabilidad y la adhesión en 6 posiciones distintas de la  
10 superficie.

Análisis estadístico: El estudio estadístico se ha realizado mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y prueba T de Student para contrastar si se acepta o no la hipótesis nula de que las medias de distintas  
15 poblaciones coinciden. Si al realizar la prueba ANOVA o T de Student para muestras independientes se obtiene una significación baja (menor que 0,05) se rechaza la hipótesis de que las medias de los grupos son iguales. En el análisis de la varianza (ANOVA), para identificar en qué grupos se han producido las diferencias, se han utilizado los contrastes no  
20 planeados o contrastes post-hoc, empleados cuando no hay una idea previa de en qué grupos son de esperar las mayores diferencias. Este análisis se considera bastante conservador, puesto que las diferencias entre grupos tienen que ser realmente grandes para ser detectadas, de modo que es probable que haya situaciones donde existan diferencias  
25 sutiles entre grupos que no sean detectadas por las pruebas post-hoc. Se han utilizado las técnicas de comparaciones múltiples, que buscan establecer diferencias entre grupos basándose en diferencias dos a dos. En este análisis se ha optado por el test “Honestamente Significativo de Tukey” (HSD Tukey) y el test Games-Howell, que son técnicas que  
30 permiten comparar cada grupo con todos los demás cuando el número de grupos es alto. El tamaño de cada grupo es el número de imágenes que se han capturado y analizado mediante el microscopio de fluorescencia para cada tratamiento superficial: 6 regiones por probeta y por hacerse todos los experimentos por triplicado, 18 datos/grupo. Todos los grupos  
35 son de igual tamaño. Para todos los cálculos se ha utilizado el programa estadístico SPSS v12 (Chicago, Illinois, USA).

### 2.5 Ensayos microbiológicos *in vivo*

Los discos con las distintas superficies de estudio se colocaron en férulas de policarbonato especialmente diseñadas para contenerlos y adaptarse al maxilar superior de 6 pacientes sanos con edades comprendidas entre 24 y 45 años. Las superficies de trabajo quedaron orientadas hacia la zona bucal, por encima de los dientes. Se colocaron dos discos por lado, alternado las ubicaciones en función de las dos superficies ensayadas: sin y con tratamiento de nanotexturizado. Las férulas se llevaron en boca de manera continuada durante 24 h y solo se retiraron para comer y para lavarse los dientes. Después, los discos se retiraron de las férulas, se enjuagaron con abundante agua para eliminar los restos no adheridos y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

#### *Análisis metagenómico y secuenciación del ribosoma 16S*

Los estudios metagenómicos se realizan normalmente mediante el análisis del gen de ARN procariota ribosomal 16S (16S rRNA), el cual contiene unos 1500 pares de bases (bp) y contiene nueve regiones variables entremezcladas con las regiones conservadas. Las regiones variables del 16S rRNA se usan frecuentemente para las clasificaciones filogenéticas como las de género o especie en diversas poblaciones microbianas. El presente protocolo de análisis metagenómico se basa en la secuenciación y análisis de las regiones variables V3 y V4 del gen 16S rRNA. Este protocolo usado combina el sistema de secuenciación MiSeq (Illumina), con análisis primarios y secundarios usando paquetes informáticos específicos y herramientas bioinformáticas con el fin de generar una estrategia completa de análisis metagenómico del 16S rRNA. El protocolo comprende cinco fases diferentes:

1. Aislamiento del ADN microbiano. El ADN microbiano se obtuvo de la superficie de los discos sometidos a ensayo usando un kit específico de aislamiento de ADN que permite aislar con gran calidad el ADN de todo tipo de ejemplares de biofilms. Después, las muestras de ADN se cuantificaron mediante espectrofotometría y análisis fluorimétrico.

2.- Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias objetivo. Las secuencias del par primer de la región V3 y V4 crean un único amplicón de unos ~460 bp. Junto con estos primers, se añaden además secuencias de adaptadores específicos por cuestiones de compatibilidad con el índice Illumina y los adaptadores de secuenciación.

3.- Preparación de la biblioteca. Una vez que la región seleccionada V3 y V4 se amplifica, se añaden los adaptadores de secuencia Illumina y los códigos de barras de doble índice se añaden al amplicon objetivo. Este protocolo permite juntar en una misma secuenciación hasta 96 bibliotecas.

4.- Secuenciación en MiSeq. Usando los reactivos MiSeq y lecturas de pares de bases 300-bp, se secuencia la lectura completa de la región V3 y V4. MiSeq produce aproximadamente > 20 millones de lecturas y puede generar > 100,000 lecturas por muestra, tomando en consideración 96 muestras indexadas.

5.- Análisis bioinformático. Una vez que las secuencias han sido generadas, un análisis secundario se realiza siguiendo el flujo metagenómico para clasificación taxonómica usando las bases de datos disponibles. Esto permite la clasificación bacteriana en función del género o la especie.

### *2.6 Ensayos con células fibroblásticas*

Se cultivaron células primarias de fibroblastos gingivales humanos según está descrito en Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts. J Periodontol 2013;84:1180–90. Brevemente, los fibroblastos gingivales se almacenaron en un medio de cultivo Eagle modificado Dulbecco (DMEM)/F12 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, US) y suplementado con glutamina 2 mM, gentamicina 50 µg ml<sup>-1</sup> (Sigma)

y 15% de suero bovino fetal (FBS) (Biochrom AG, Leonorenstr, Berlin, Alemania). Los cultivos se incubaron en una atmósfera humidificada, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para los experimentos, se seleccionaron las células entre el cuarto y el sexto pase. Se usaron tres replicas por tipo de superficie y experimento.

#### *Adhesión y extensión celular*

Se sembraron las células en su medio completo con una densidad de 20000 células cm<sup>-2</sup> durante 30, 60 y 90 min. Al acabar esos tiempos, el medio de cultivo se desechó y los pocillos se enjuagaron con suero salino tamponado con fosfato. (PBS). El grado de cobertura celular en las superficies se midió a través de imágenes de microscopía electrónica tomadas con un voltaje de aceleración de electrones de 5 kV. Previamente, las muestras se fijaron durante 12-15 horas en glutaraldeído al 3 wt.% y después se lavaron 3 × 10 min con PBS (pH = 7.4). Posteriormente, las muestras se deshidrataron mediante la aplicación de soluciones de concentración creciente de etanol (30, 50, 70, 90 y 100 vol.%). En cada concentración, las muestras estuvieron durante 60 min. Para analizar el porcentaje de área cubierto por las células en las diferentes superficies se usó el software ImageJ. La extensión celular se calculó como la inversa del grado de circularidad de las mismas.

#### *Liberación de proteínas de la matriz extracelular*

Los discos con las diferentes superficies se colocaron en placas de poliestireno de cultivo celular. Las células se cultivaron en ellos con el medio completo y con una densidad de 6000 células cm<sup>-2</sup>. Tras 7 días de cultivo, se emplearon kits ELISA kits (Takara, Shiga, Japón) para determinar tanto la síntesis de fibronectina como de procolágeno tipo 1.

## REIVINDICACIONES

5 1. Método de tratamiento superficial de un implante dental o de un componente protésico fabricado de titanio o una aleación de titanio, que se caracteriza por que comprende los pasos de:

- dotar a una superficie exterior del implante o del componente de una rugosidad superficial; y
- 10 - aplicar un anodizado sobre el implante o el componente, suavizando la rugosidad y generando nanoporos de diámetro y profundidad menor o igual que 300 nm en dicha superficie exterior del implante o del componente.

15 2. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial comprende crear una rugosidad superficial mediante un mecanizado del implante o del componente.

20 3. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial comprende crear una rugosidad superficial mediante un tratamiento mecánico del implante o del componente.

25 4. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial comprende crear una rugosidad superficial mediante un tratamiento químico del implante o del componente.

30 5. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial comprende crear una rugosidad superficial mediante un proceso de deposición.

35 6. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial

comprende crear una rugosidad superficial mediante un tratamiento térmico del implante o del componente.

5           7. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de dotar al implante o al componente de una rugosidad superficial comprende crear una rugosidad superficial mediante un tratamiento electroquímico del implante o del componente.

10           8. Método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que el paso de aplicar un anodizado sobre el implante o el componente comprende sumergir el implante o el componente en un baño electroquímico de al menos un electrolito y someter a dicho baño a un voltaje.

15           9. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el al menos un electrolito comprende ácido fluorhídrico (HF).

20           10. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el al menos un electrolito comprende ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

            11. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el al menos un electrolito comprende ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

25           12. Método según la reivindicación 11, que se caracteriza por que el baño electroquímico comprende entre el 1% y el 50% de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

30           13. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el al menos un electrolito comprende ácido oxálico (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

            14. Método según la reivindicación 13, que se caracteriza por que el electrolito comprende entre el 1 y el 3% de ácido oxálico (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

35           15. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el voltaje presenta un valor de 25 a 200 V.

16. Método según la reivindicación 15, que se caracteriza por que el voltaje presenta un valor de 75 a 170 V.

5 17. Método según la reivindicación 16, que se caracteriza por que el voltaje presenta un valor de 80 a 120 V.

18. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el voltaje se aplica durante al menos 1 segundo.

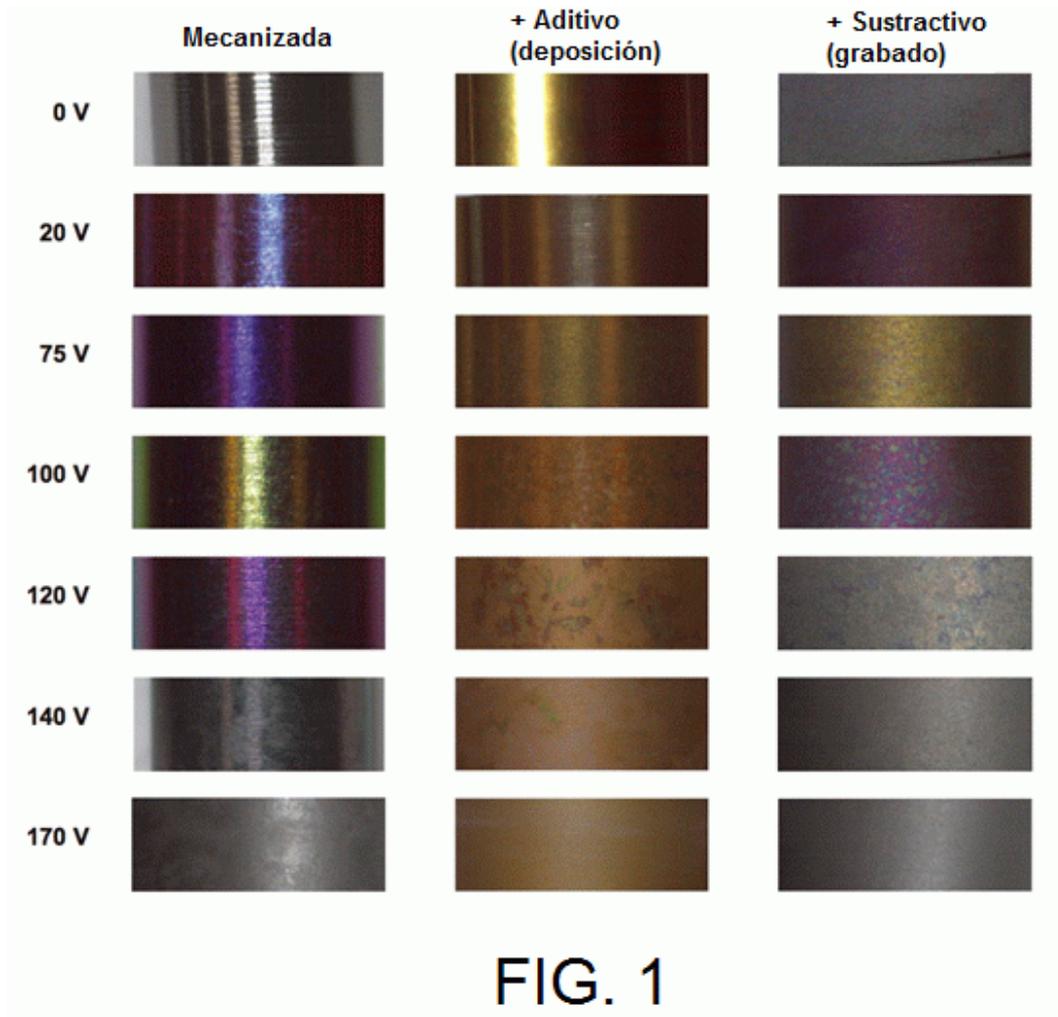
10 19. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el voltaje se aplica durante menos de 10 minutos.

15 20. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el paso de aplicar un anodizado sobre el implante o el componente se realiza a una temperatura cuyo valor es de -25 a 100°C.

20 21. Método según la reivindicación 8, que se caracteriza por que el paso de aplicar un anodizado sobre el implante o el componente se realiza a temperatura ambiente.

25 22. Implante dental o componente protésico, fabricado de titanio o de una aleación de titanio, que se caracteriza por que comprende una superficie exterior rugosa provista de nanoporos de diámetro y profundidad menor o igual que 300 nm.

30 23. Implante dental o componente protésico, según la reivindicación 22, que se caracteriza por que dicha superficie exterior rugosa comprende una distribución aleatoria de poros circulares de diámetro y profundidad entre 10 y 300 nm.



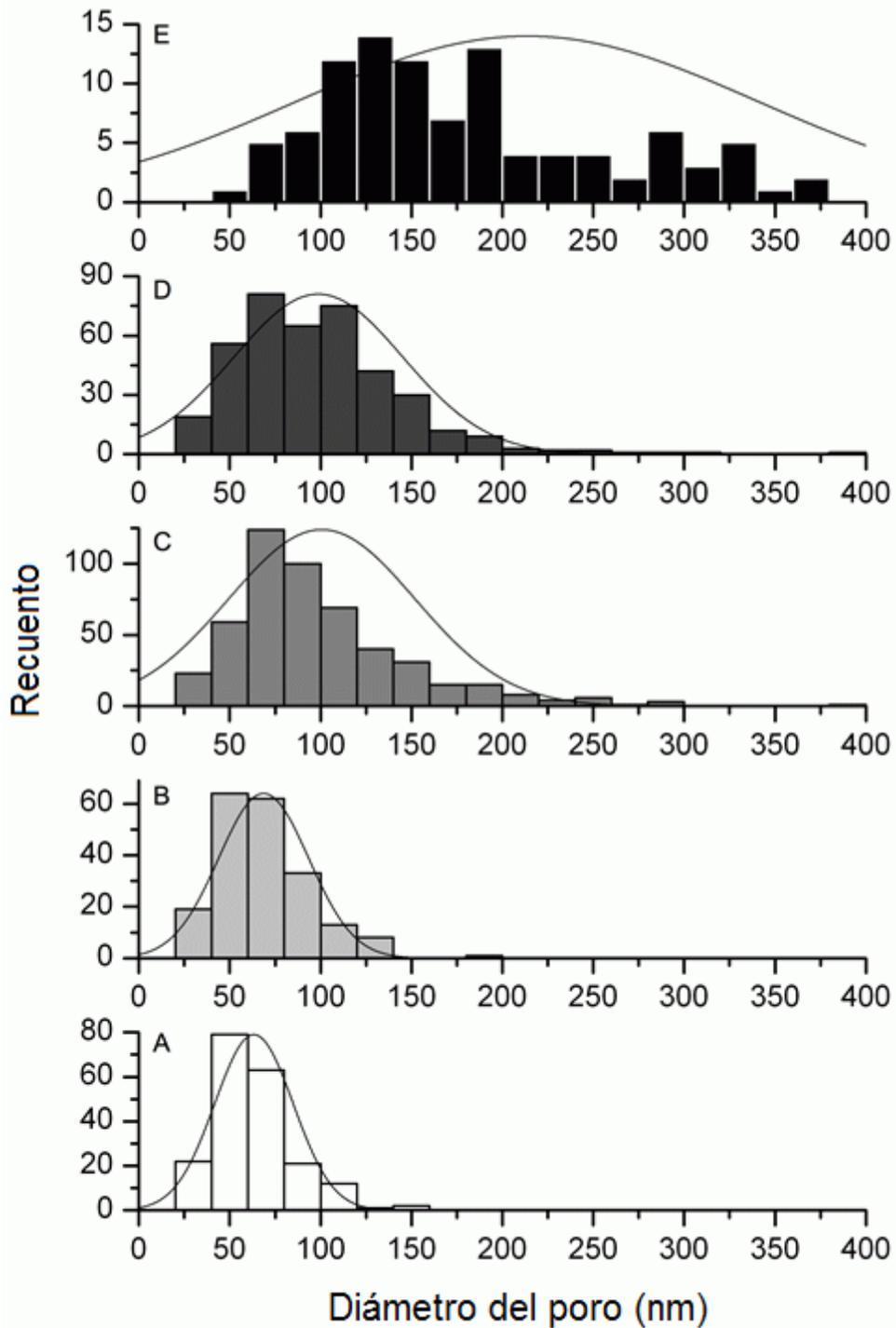
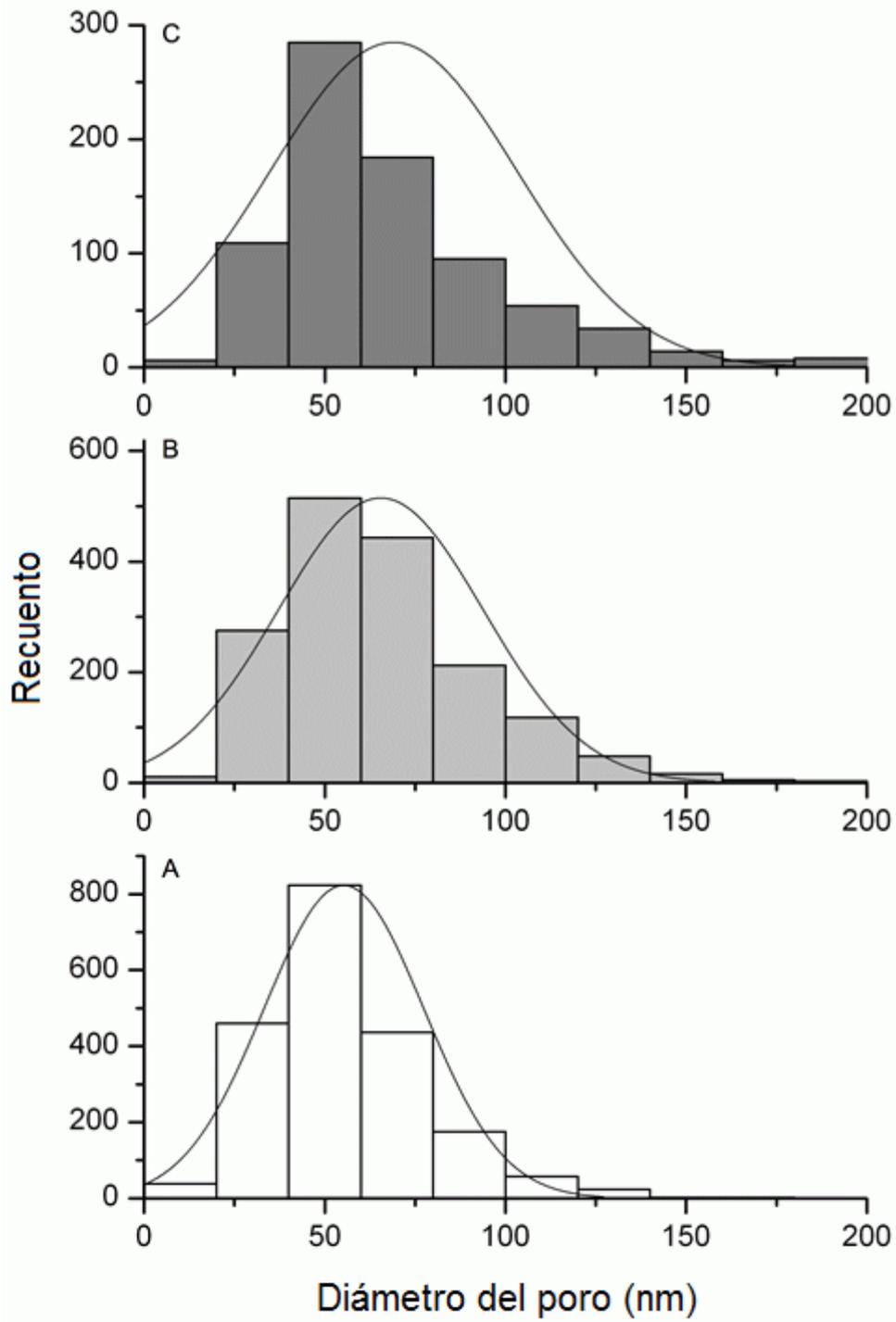


FIG. 2



**FIG. 3**

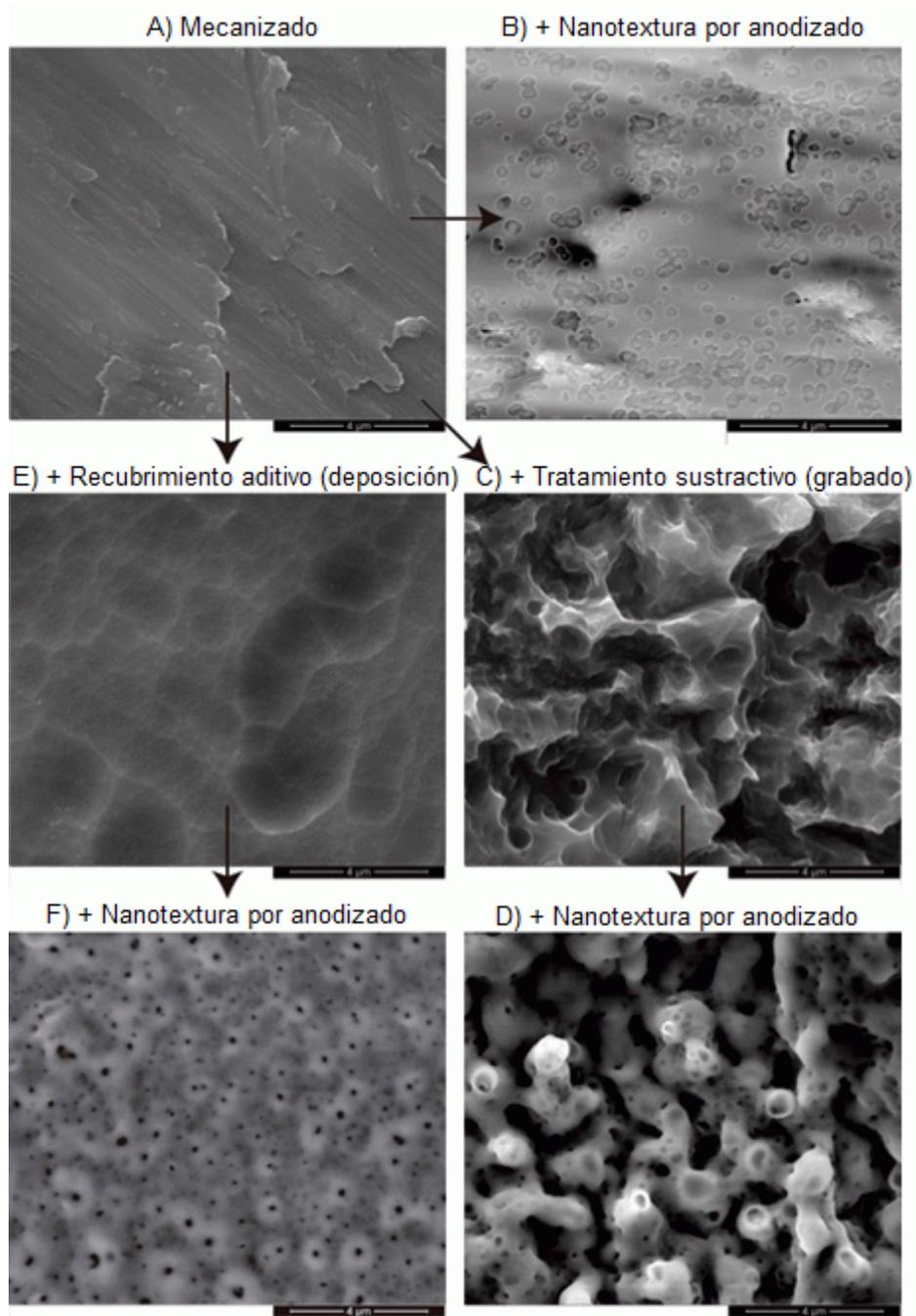


FIG. 4

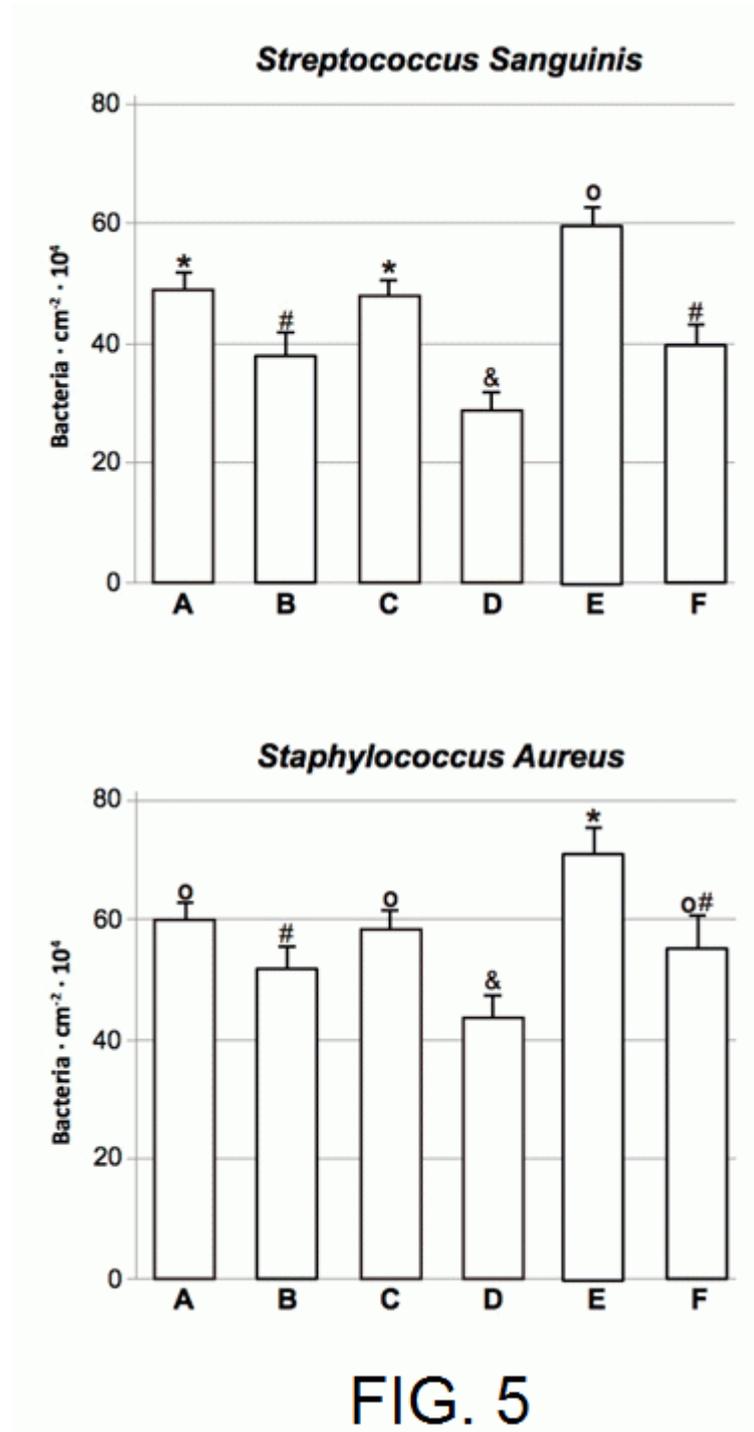
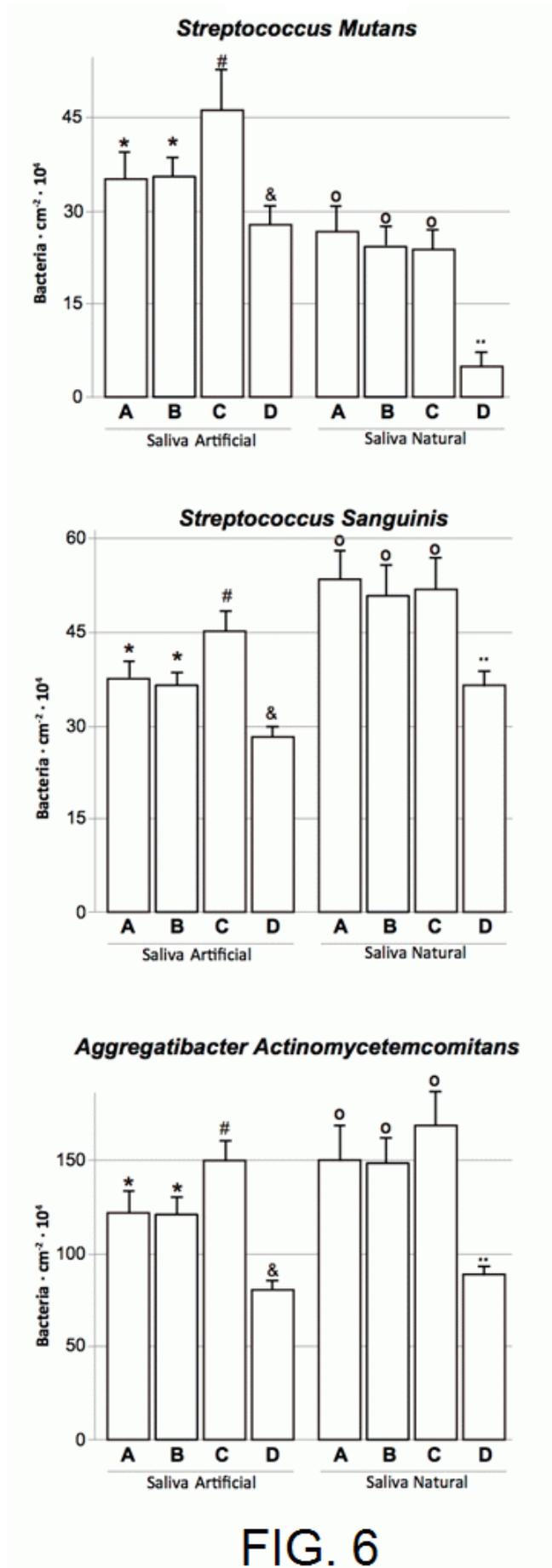


FIG. 5



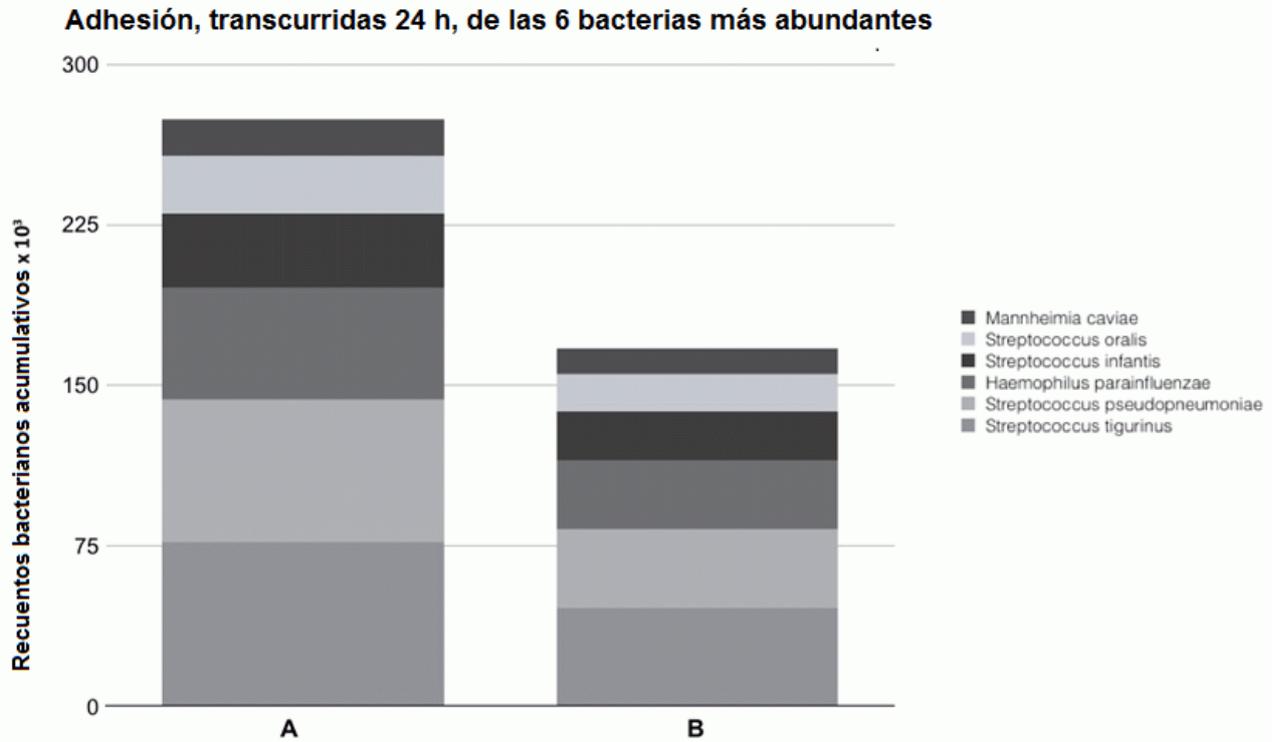


FIG. 7

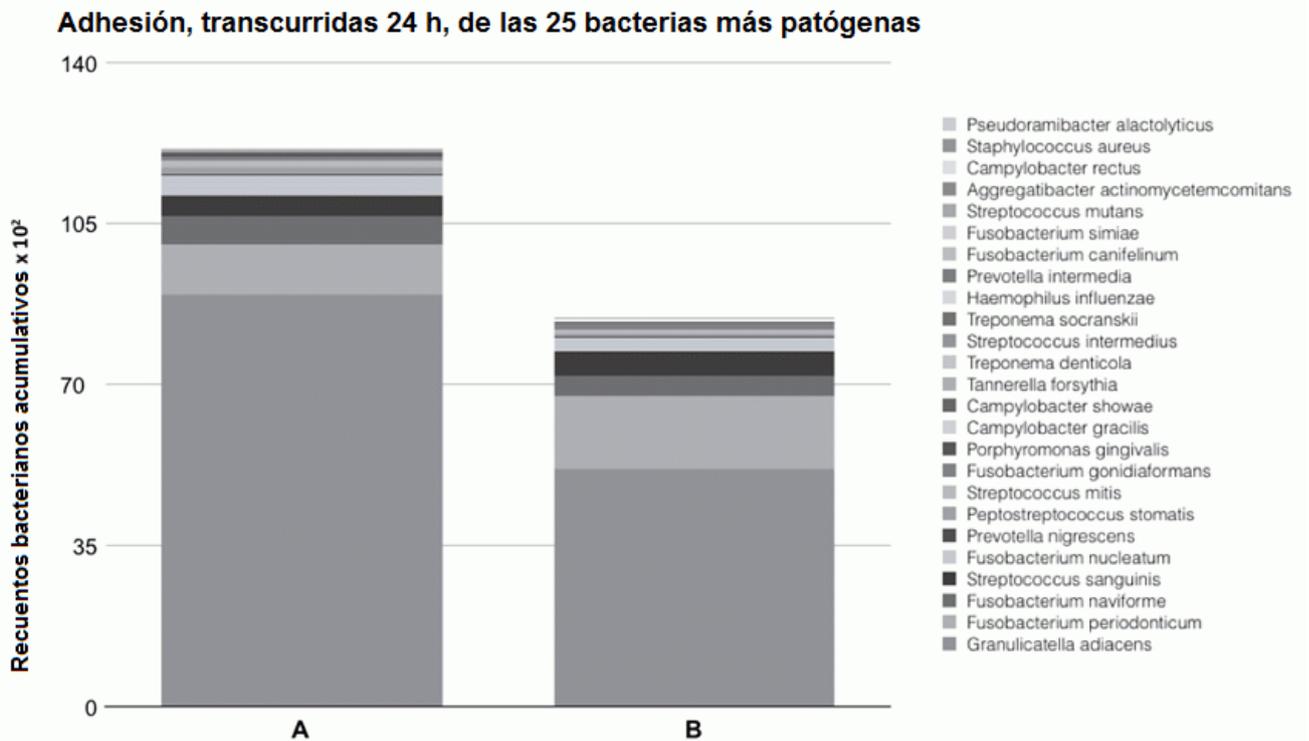
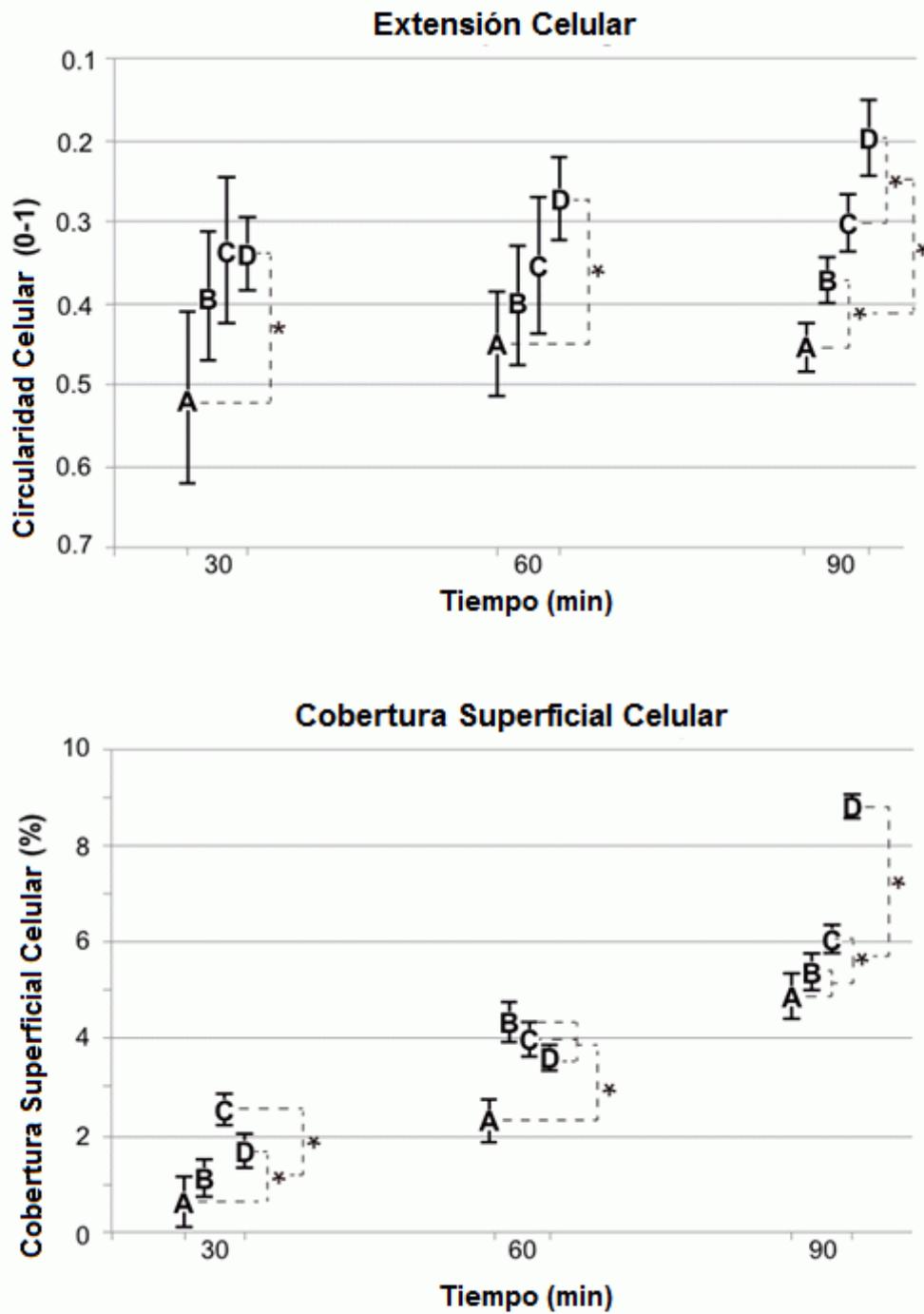


FIG. 8



**FIG. 9**

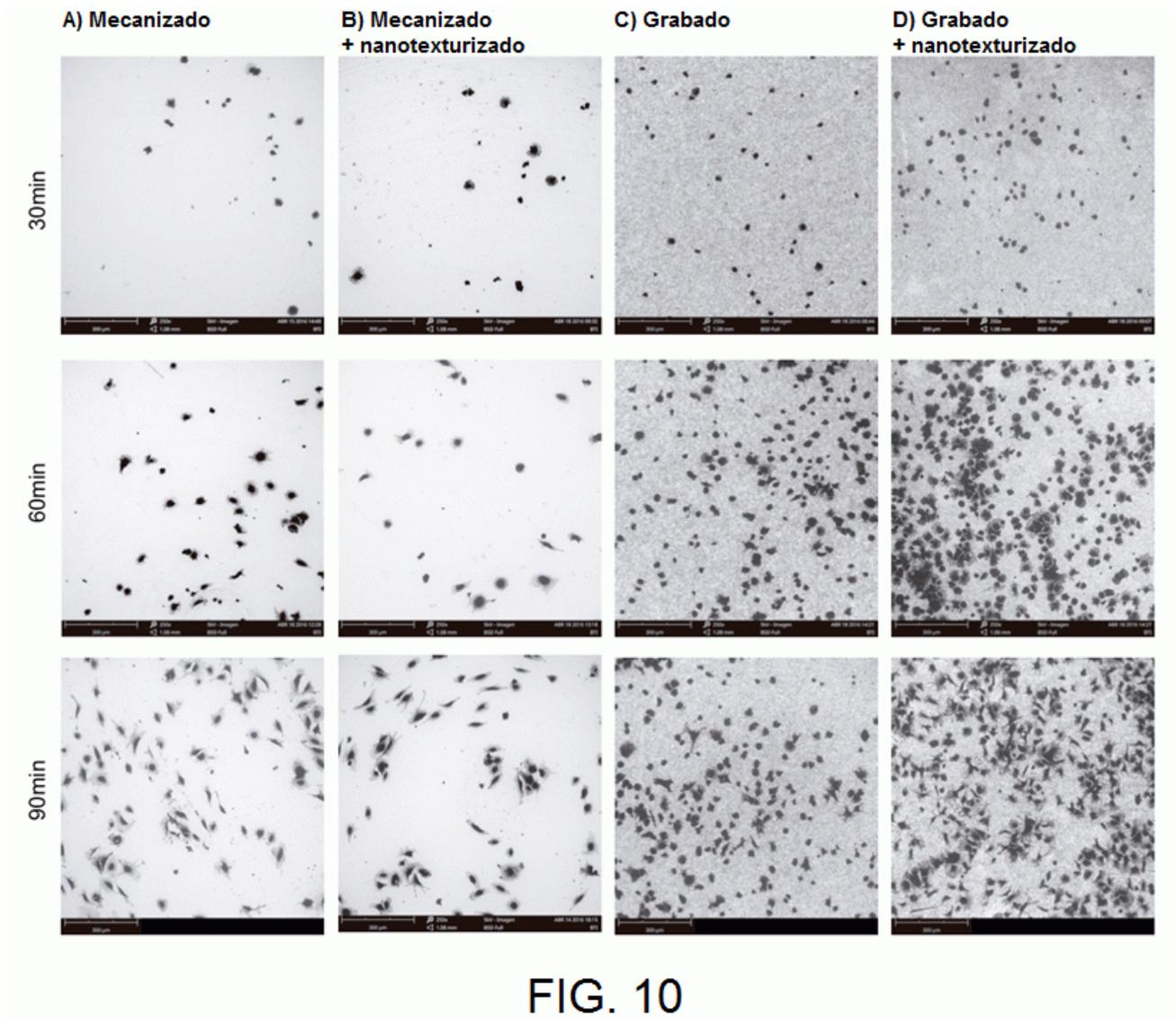
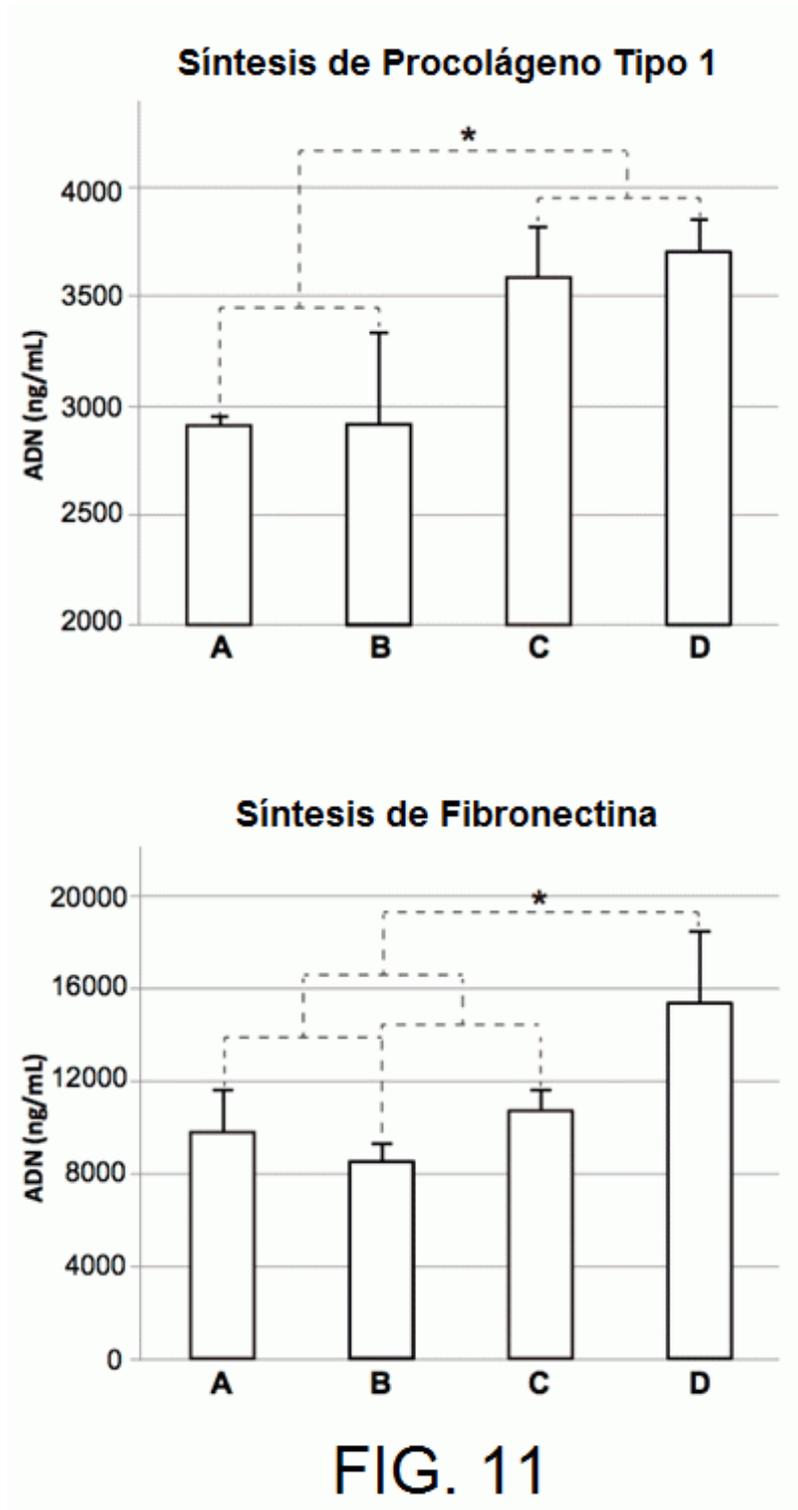


FIG. 10





②① N.º solicitud: 201830597

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.06.2018

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CA 2941660 A1 (NOBEL BIOCARE SERVICES AG) 11/09/2015, Párrafos 7, 25-27, 34, 35, 49, 55 y 56 y reivindicaciones 1-4, 21-25 y 30 y figura 2.	1-8, 10-11, 15-19, 22-23
A	US 2005/0031663 A1 (CECILIA LARSSON, PETER THOMSEN) 10/02/2005, Resumen, párrafos 8-10, 39, 54, 69, 71, 139, 144 y reivindicación 7.	1-23
A	US 2005/0181330 A1 (COWELL MEDI CO LTD) 18/08/2005, Resumen, párrafos 4, 16, 18, 32, 33, 61, 62, 76 y reivindicaciones 1, 2, 4 y 6.	1-23
A	ES 2370248 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC ) 13/12/2011, Todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
21.11.2018

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61L27/06** (2006.01)

**A61L27/28** (2006.01)

**A61C8/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, A61C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, INTERNET