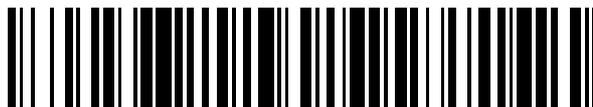


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 240**

21 Número de solicitud: 201232018

51 Int. Cl.:

**A61L 27/14** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**24.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.09.2014**

Fecha de la concesión:

**13.07.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**20.07.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070924**

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (25.0%)  
Avda. de la Constitución, 18  
41071 Sevilla (Sevilla) ES;  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (25.0%);  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (25.0%) y  
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (25.0%)**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ PADILLA, David;  
GARCÍA-PERLA GARCÍA, Alberto;  
GUTIÉRREZ PÉREZ, José Luis;  
TORRES LAGARES, Daniel;  
CASTILLO DALI, Gabriel;  
SALIDO PERACAULA, Mercedes;  
VILCHES TROYA, José;  
VILCHES PÉREZ, José Ignacio;  
TERRIZA FERNÁNDEZ, Antonia;  
BARRANCO QUERO, Ángel;  
YUBERO VALENCIA, Francisco;  
DÍAZ CUENCA, Aránzazu y  
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ-ELIPE, Agustín**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

54 Título: **Membrana reabsorbible para regeneración ósea guiada**

57 Resumen:

Membrana reabsorbible para regeneración ósea guiada.

La invención se refiere a membranas para la regeneración ósea guiada, que comprenden un polímero biodegradable que ha sido tratado en una de sus caras con un plasma, y sobre el que se ha depositado una o más capas nanométricas de óxidos activos en una o en las dos caras. La invención se refiere también a los usos y métodos de obtención de dichas membranas y a implantes basados en las mismas.

ES 2 497 240 B1

## **DESCRIPCIÓN**

### **Membrana reabsorbible para regeneración ósea guiada.**

#### **CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se encuentra dentro de la biomedicina, la farmacia y la ingeniería de tejidos, y se refiere a un film o una membrana para la regeneración ósea guiada, que comprende un polímero biodegradable que ha sido tratado en una de sus caras con un plasma, y sobre el que se ha depositado una o más capas nanométricas de óxidos activos en una o en las dos caras.

#### **10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión. Sin embargo, la cicatrización del tejido óseo es mucho más lenta que la mucosa, y tras una operación quirúrgica y, en particular tras cirugía oral o dental, donde resulta deseable la cicatrización, es difícil proporcionar condiciones que eviten el crecimiento de otros tejidos hacia el interior del área en la que se requiere la regeneración. Por ejemplo, en el caso de la extracción de una parte sustancial de una raíz dental por caries o por una enfermedad, resulta deseable que se produzca la regeneración de hueso sano en sustitución del tejido óseo extraído. Sin embargo, en general, la cavidad dejada por la extracción del hueso se ve rápidamente rellena por tejido conectivo y este crecimiento hacia dentro de tejido conectivo impide la regeneración ósea.

Con el fin de resolver dichas dificultades, se ha desarrollado la técnica conocida como “regeneración ósea guiada”. En este procedimiento, se inserta quirúrgicamente una membrana alrededor de la periferia de la cavidad de la herida. La membrana impide o dificulta la invasión de la cavidad de la herida por tipos celulares no deseados y permite de esta manera que las células preferidas crezcan hacia el interior de la cavidad, cicatrizando de esta manera la herida.

Así, la regeneración ósea guiada (ROG) es una técnica que tiene como objetivo favorecer la formación de tejido óseo frente al tejido conectivo y epitelial en el proceso de cicatrización

En la actualidad se utilizan generalmente dos tipos de membrana en la regeneración guiada de tejidos:

(1) Membranas sintéticas no reabsorbibles, que son utilizados como barreras para ROG, y que han sido aprobadas para su uso en el tratamiento de defectos óseos, entre ellas una de la que

se obtienen mejores resultados es la de politerafluoroetileno expandido (e-PTFE) reforzadas con titanio, y

5 (2) Membranas sintéticas reabsorbibles, fundamentalmente las formadas a partir de copolímeros de ácido glicólico y poliláctico. Las membranas reabsorbibles se clasifican en dos tipos: las hechas con polímeros sintéticos y las hechas con materiales naturales. Los polímeros sintéticos bioabsorbibles son macromoléculas compuestas por la unión de múltiples unidades repetidas, los monómeros, los que a su vez están formados por átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y, ocasionalmente, sílice y azufre. Estos se degradan en el interior y se eliminan o metabolizan en el organismo.

10 Aunque las reabsorbibles presentan la ventaja de que no es necesario una segunda cirugía, consiguiendo así una disminución en la morbilidad de la técnica, ambos tipos de membrana adolecen de graves desventajas. La membrana de PTFE, aunque muestra características adecuadas de porosidad, resistencia y flexibilidad, sigue siendo no reabsorbible y por lo tanto se requiere una segunda operación quirúrgica para extraerla. La necesidad de procedimientos quirúrgicos adicionales puede resultar traumática para el paciente y también puede dañar el nuevo tejido regenerado, extendiendo de esta manera el periodo de tratamiento. El segundo tipo de membrana presenta muchas veces como elemento limitante el que los productos de descomposición son irritantes y esta irritación puede presentar efectos no deseables sobre el

15

20 paciente.

Es necesario encontrar una membrana que proporcione condiciones óptimas para el crecimiento celular y para la cicatrización.

25 Se han propuesto diversos métodos de preparación de membranas reabsorbibles para aplicaciones de regeneración ósea guiada que, implantadas en zonas del cuerpo intervenidas quirúrgicamente, potencien el crecimiento de ciertas células, típicamente osteoblastos en el caso de membranas de regeneración ósea guiada, evitando que otras colonicen esas zonas. La mayor parte de estos métodos se basa en el uso de procedimientos en fase líquida donde los componentes activos para la regeneración del hueso se incorporan a la membrana, generalmente polimérica, a partir de disoluciones acuosas o semejantes (JP2009018086-A, KR738476-B1) o métodos de “*spin coating*” o inmersión también a partir de disoluciones (JP2009061109(A)). Otro tipo de aproximaciones a este problema se basa en la fabricación de estructuras de “andamios” (*scaffolds*) complejas donde dos materiales se desintegran a distinta velocidad en las condiciones fisiológicas del organismo,

30

35 permitiendo la colonización de los poros liberados en primera instancia por células del organismo (US2011190903-A1, WO2009054609-A1; KR2009042529-A; KR946268-B1). Otra alternativa

propuesta consiste en la fabricación de “films” o tejidos con una estructura de bicapa, de forma que la capa más externa favorezca el desarrollo celular guiado y su colonización celular (CN20031017481 20030318, US2011060413-A1; JP2011056047-A; KR20030002224 (A)). Aunque en la mayor parte de los casos estas membranas se fabrican mediante polímeros u otros materiales sintéticos, existen también casos en que se incorporan en el mismo material una parte sintética y otra de origen animal (KR20030097156 (A)), en este último caso en los poros de la primera.

El material sintético que constituye la base de estas membranas suele ser un polímero biodegradable, siendo común el uso de ácido poliláctico o poliglicólico, al que se le suelen agregar otros polímeros (por ejemplo quitosano) y, muy comúnmente, materiales inorgánicos como la hidroxiapatita o variedades no cristalinas de la misma que se reconocen como materiales activos para la regeneración ósea guiada. En todas estas aplicaciones, la cantidad de material activo es macroscópico y, como se ha mencionado, se añade mediante métodos de síntesis química convencional. Según demuestra este análisis del estado del arte, no existe ninguna aproximación comercial o protegida donde el principio activo, en cantidades nanométricas, se incorpore en forma de capa delgada sobre el sustrato polimérico mediante métodos de vía seca basados en el uso de plasmas o similares, tal y como los planteados en esta invención. Tampoco que se incorporen materiales activos como óxidos simples a las capas poliméricas que sirven de base ni que este material polimérico se someta a tratamientos de activación por plasma para favorecer su descomposición en el medio fisiológico y, por lo tanto su reabsorción en el organismo.

En relación con este último punto cabe señalar que son bien conocidos los métodos de síntesis convencionales de “films” de polímeros degradables y biodegradables como los ácidos polilácticos o poliglicólicos o mezclas de ambos. Sin embargo, en los materiales preparados mediante estos métodos tradicionales no puede controlarse de manera simple la velocidad a la que tendrá lugar su degradación en el medio fisiológico, siendo generalmente esta degradación más lenta de lo que exige la función requerida para una membrana de regeneración ósea guiada. En la literatura científica, se ha postulado la incorporación de poros en la estructura de estas capas como un método para aumentar la interacción con el medio y, consecuentemente, la velocidad de degradación.

Es importante, por tanto, desarrollar una membrana que sea biodegradable, con una adecuada estabilidad y velocidad de degradación, que permita la regeneración ósea guiada sin necesidad de retirar el material implantado, y que posea características nanotecnológicas que puedan mejorar la bioactividad de los implantes, a fin de promover la conducción y osteo-inducción *in situ* del

implante del paciente y las células osteoprogenitoras, y para mejorar la osteointegración entre el implante y el hueso circundante.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Los autores de la presente invención han desarrollado un film o membrana polimérica reabsorbible, biodegradable (sufre hidrólisis cuando entran en contacto con el medio fisiológico), suficientemente estable, de gran flexibilidad de diseño, que permite adecuar su composición y estructura a necesidades específicas. Los autores de la invención controlan la velocidad de degradación de los polímeros mediante tratamientos de plasma. Las mejoras en las propiedades de las membranas así construidas no se limitan sólo a las propiedades mecánicas, ni ése es el principal objetivo de la invención. Se mejora la bioactividad de la membrana, mejorando y modificando la respuesta celular y tisular.

## 15 MEMBRANA DE LA INVENCION

Aunque bien contrastada, la biodegradabilidad de las membranas o "films" poliméricos en un medio fisiológico real "*in vivo*" o su imitación "*in vitro*" es limitada, requiriendo en ocasiones tiempos muy superiores a los exigidos por la práctica clínica. Para poder controlar y reducir estos tiempos de degradación, esta invención ha desarrollado un procedimiento que consiste en activar una o las dos caras de los films sintetizados, por exposición de los mismos a un plasma de oxígeno u otro gas activo generado en un reactor de plasma convencional (argón, mezclas oxígeno y argón, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O o mezclas de ellos, etc., incluyendo esta invención todas las posibilidades capaces de generar especies activas que produzcan efectos de erosión superficial física y/o química sobre la superficie del polímero). De esta manera, los inventores obtienen una membrana reabsorbible con velocidad de degradación controlada en el medio fisiológico.

### *Polímero*

30

Por tanto, un primer aspecto se refiere a una membrana, de ahora en adelante membrana de la invención, que comprende un polímero biodegradable, obtenible por un método que comprende exponer al menos una cara de un film polimérico al efecto de un plasma. Respecto al plasma, este puede ser de oxígeno o de cualquier otro gas activo generado en un reactor de plasma convencional, incluyendo esta invención todas las posibilidades capaces de generar especies activas que produzcan efectos de erosión superficial física y/o

35

química sobre la superficie del polímero En una realización preferida de este aspecto de la invención, el plasma está compuesto por oxígeno, argón, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, o cualquiera de sus mezclas. Según la función requerida y el tiempo de reabsorción exigible para las mismas, estas membranas o “films” pueden tener un espesor variable comprendido entre algunas  
5 centenas de micras de espesor hasta medio milímetro o más, siendo la manejabilidad de las mismas otro criterio de se utiliza para definir este parámetro.

Como “films” poliméricos que actúen como sustratos y elemento de separación de zonas del organismo intervenidas quirúrgicamente, se utilizan capas de polímeros tales como el ácido  
10 poliláctico, ácido poliglicólico o mezclas de ambos preparados mediante métodos tradicionales. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el polímero se selecciona de entre ácido poliláctico, ácido poliglicólico, o cualquiera de sus mezclas.

Mediante la tecnología de plasma reivindicada, la velocidad de degradación del “film”  
15 polimérico se puede controlar bien variando el tiempo de tratamiento de activación del polímero, favoreciéndose la degradación para tiempos mayores, o las condiciones del plasma. En este caso se maximizan los efectos aumentando la concentración de especies activas en el plasma mediante todos los parámetros ajustables propios de esta tecnología (potencia del plasma, características de la radiación electromagnética utilizada para activar  
20 el plasma, presión de los gases, flujo de los mismos, etc.).

#### *Capa nanométrica de óxidos activos*

La presente invención plantea la activación de una o las dos caras de las membranas frente  
25 a su colonización con osteoblastos u otras células mediante la incorporación de capas nanométricas de óxidos activos en la superficie del film polimérico.

Por tanto, en otra realización preferida, la membrana de la invención se obtiene por un método que además comprende depositar una o más capas nanométricas de óxidos activos  
30 en una o en las dos caras del film polimérico. En otra realización más preferida, los óxidos activos se seleccionan de la lista que consiste en SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, hidroxiapatita o derivados, o cualquiera de sus combinaciones, u otros óxidos que no sean tóxicos ni que tengan efectos secundarios y que favorezcan el crecimiento de osteoblastos.

35 Para evitar la alteración de la membrana, un elemento crítico de la presente invención es que la incorporación de ese material activo, típicamente óxidos simples cristalinos o amorfos

como SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> u otros análogos, o compuestos como la hidroxiapatita o semejantes, se haga mediante un método de vía seca que preserve la integridad del “film” de base. El espesor de esta capa activa puede ser variable entre decenas a cientos de nanómetros o incluso varias micras, siendo a veces una restricción para el caso de las capas más gruesas que la misma pueda separarse del sustrato polimérico debido a la acumulación de tensiones. En el caso de la capa más delgada, ésta puede ser continua y conformal con la rugosidad intrínseca del sustrato o, no llegar a formar una capa continua sino desarrollarse en forma de islas nanométricas sin continuidad a lo largo de la superficie.

10 Tanto el proceso de activación para controlar la velocidad de degradación del polímero como la incorporación de capas nanométricas activas en la superficie se lleva a cabo mediante técnicas de vía seca basadas en plasmas en ausencia absoluta de un medio líquido precursor. La ventaja fundamental que presenta la deposición por vía seca utilizando plasmas o técnicas relacionadas (como por ejemplo, pero sin limitarnos, *magnetron sputtering*) es que permite depositar estos materiales a una temperatura próxima a la ambiental permitiendo la obtención de fases amorfas o de baja cristalinidad y eliminando, a su vez, el riesgo que tiene el polímero de degradarse térmicamente. Por otro lado, estas técnicas permiten incorporar controladamente sobre el polímero los óxidos y compuestos mencionados anteriormente. Asimismo, permiten obtener capas muy homogéneas de espesor controlado, asegurando a su vez unas magníficas propiedades de adhesión de las mismas al film polimérico de base.

Por tanto, en una realización preferida, la incorporación de capas nanométricas activas en la superficie se lleva a cabo mediante técnicas de vía seca basadas en plasmas o similares. En otra realización preferida, las técnicas de vía seca se seleccionan de la lista que consiste en *physical vapor deposition* (PVD), *sputtering*, *plasma enhanced chemical vapor deposition* (PECVD), *pulsed laser deposition* (PLD), cualquier técnica análoga o cualquiera de sus combinaciones. Para cualquiera de estos procedimientos un elemento crítico es que no haya procesos de calentamiento del sustrato polimérico y que el aporte del material de la capa nanométrica activa se haga sin modificar estructuralmente el “film” de base.

El espesor de esta capa activa puede ser variable entre decenas a cientos de nanómetros o incluso varias micras, siendo a veces una restricción para el caso de las capas más gruesas que la misma pueda separarse del sustrato polimérico debido a la acumulación de tensiones. En el caso de las capas más delgadas, ésta puede ser continua y conformal con la rugosidad intrínseca del sustrato o, no llegar a formar una capa continua sino

desarrollarse en forma de islas nanométricas sin continuidad a lo largo de la superficie. Por tanto, en otra realización preferida, la capa o las capas nanométricas tienen un espesor que varía entre 10 nm y 1 micra. Más preferiblemente varía entre 30 y 200 nm, y aún más preferiblemente, varía entre 50 y 100 nm. Para sistemas de deposición de capas convencionales, estos espesores se pueden conseguir, por ejemplo pero sin limitarnos, entre 3 y 20 min, asumiendo velocidades de deposición de alrededor de 10 nm/min-1.

La membrana de la invención puede comprender, además, otros principios activos como factores de crecimiento, proteínas morfogenéticas óseas, y en general, cualquier molécula simple o compleja que tenga un efecto beneficioso sobre el crecimiento óseo y no sea tóxica para el organismo.

Otro aspecto de la invención se refiere a un implante que comprende la membrana de la invención. El implante puede tomar cualquier forma que sea adecuada a la región ósea que se quiera regenerar. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el implante es un implante monolítico o articular, que se selecciona de la lista que consiste en suturas, grapas, prótesis, tornillos o placas.

#### USOS DE LA MEMBRANA DE LA INVENCION

La membrana de los autores de la invención es capaz de regenerar el tejido óseo, induciendo la neoformación de dicho tejido. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la membrana de la invención en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la membrana de la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la membrana de la invención en la elaboración de un medicamento para la regeneración tisular, o alternativamente, a la membrana de la invención para su uso en la regeneración tisular.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la membrana de la invención en la elaboración de un medicamento para la regeneración del tejido óseo, o alternativamente, a la membrana de la invención para su uso en la regeneración del tejido óseo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la membrana de la invención en la elaboración de un medicamento para inducir la neoformación de tejido óseo, o

alternativamente, a la membrana de la invención para inducir la neoformación de tejido óseo.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la membrana de la invención en la elaboración de un medicamento para reparar partes del tejido muscular esquelético, o alternativamente, a la membrana de la invención para reparar partes del tejido muscular esquelético.

10 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, el medicamento se emplea para el tratamiento de una enfermedad ósea.

#### MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LA MEMBRANA DE LA INVENCION

15 Otro aspecto se refiere a un método de obtención de la membrana de la invención, de ahora en adelante método de la invención, que comprende exponer al menos una cara de un film polimérico al efecto de un plasma.

20 El nuevo proceso que constituye un objeto de la presente invención, se basa en aplicar un proceso de activación de la superficie de un film polimérico biodegradable mediante un plasma de oxígeno o mezcla de gases que generen especies activas capaces de producir un desbastado físico y/o químico de la superficie del film polimérico. Estas especies se aplican sobre el film polimérico apoyado sobre un sustrato. Este tratamiento, entre otros  
25 efectos, produce un gran incremento en la rugosidad superficial del film, así como la alteración controlada de la composición química de las primeras capas superficiales con la ruptura de enlaces entre cadenas poliméricas y la incorporación de una gran concentración de grupos funcionales conteniendo oxígeno que se atacan preferentemente en medios acuosos o fisiológicos. En el caso de tratamientos externos se puede llegar a generar una  
30 significativa porosidad interna conectada con el exterior que facilita el acceso de agentes externos. Estos efectos favorecen la degradación del polímero, proceso que puede controlarse variando la intensidad del tratamiento con el plasma.

35 En una realización preferida de este aspecto, el plasma está compuesto por oxígeno, argón, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, o cualquiera de sus mezclas. En otra realización preferida, la cara del film polimérico se expone al efecto de un plasma durante un tiempo que varía entre 2 y 60

minutos, más preferiblemente entre 5 y 50 minutos, aún más preferiblemente entre 8 y 45 minutos, y aún mucho más preferiblemente entre 10 y 40 minutos. En otra realización preferida, el polímero se selecciona de entre ácido poliláctico, ácido poliglicólico, o cualquiera de sus mezclas.

5

Tal activación puede hacerse en reactores a baja presión o a presión atmosférica, en reactores de plasma activados por radiofrecuencias, microondas o de alta tensión, cubriendo la presente invención todas las posibilidades de plasmas fríos con la sola restricción de que el proceso ocurra a temperatura ambiente y no altere sino la parte superficial del "film" expuesto al plasma. Un ejemplo de aplicación de este proceso de activación consiste en el uso de un reactor de plasma de placas paralelas operado con radiofrecuencia para generar un plasma de oxígeno a una presión de trabajo comprendida entre  $1 \times 10^{-4}$  y  $2 \times 10^{-4}$  bares y una potencia comprendida entre 10 y 20 W. Mediante la tecnología de plasma reivindicada, la velocidad de degradación del "film" polimérico se puede controlar bien variando el tiempo de tratamiento de activación del polímero, favoreciéndose la degradación para tiempos mayores, o las condiciones del plasma. En este caso se maximizan los efectos aumentando la concentración de especies activas en el plasma mediante todos los parámetros ajustables propios de esta tecnología (potencia del plasma, características de la radiación electromagnética utilizada para activar el plasma, presión de los gases, flujo de los mismos, etc.). En la segunda etapa del proceso de fabricación de la membrana de regeneración ósea guiada que se reivindica, se procede a depositar bien sobre la superficie no activada por el plasma o sobre la activada, una capa continua (n) o fragmentada (n) de espesor controlado entre algunos decenas de nanómetros y hasta el rango de las micras, de una capa de un material inorgánico que active el crecimiento y la proliferación celular sobre su superficie. Generalmente, pero sin limitarse, se prefiere tratar con el plasma una cara del film polimérico y depositar el material activo sobre la otra, sin embargo, son posibles otras opciones. La membrana así preparada se implanta en la zona del cuerpo a regenerar colocando la parte inorgánica hacia la zona donde se debe regenerar el tejido óseo.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende depositar una o más capas nanométricas de óxidos activos en una o en las dos caras del film polimérico. Más preferiblemente, los óxido activos se seleccionan de la lista que consiste en  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ , hidroxiapatita o derivados, u otros óxidos que no sean tóxicos ni que tengan efectos secundarios y que favorezcan el crecimiento de osteoblastos, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, la incorporación de capas nanométricas activas en la superficie se lleva a cabo mediante técnicas de vía seca. Aún mucho más

preferiblemente, las técnicas de vía seca se seleccionan de la lista que consiste en *physical vapor deposition* (PVD), *sputtering*, *plasma enhanced chemical vapor deposition* (PECVD), *pulsed laser deposition* (PLD), cualquier técnica análoga o cualquiera de sus combinaciones.

- 5 Muchos de estos procedimientos existen en sus variedades de laboratorio a pequeña escala y en su modalidad de escala industrial en reactores de gran tamaño o en otros donde el film polimérico puede tratarse según una aproximación de “*roll to roll*”.

Es importante destacar la posibilidad del procedimiento de la invención de fabricar capas nanométricas de composición mixta mediante la combinación de varios procesos de deposición simultánea o sucesiva.

El proceso es compatible con la utilización de uno o más precursores inorgánicos en el caso de procesos de PECVD o de “blancos” en el caso de PVD, permitiendo por lo tanto incorporar uno o más compuestos inorgánicos de forma secuencial o simultáneamente. En el caso de que el proceso sea de tipo PECVD, los precursores metalorgánicos volátiles se descomponen al interactuar con el plasma. Al estar formados generalmente (aunque no siempre) por carbono, hidrógeno u otros elementos, por reacción con las especies de oxígeno del plasma dan compuestos volátiles (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, etc.) que se retiran de la cámara de reacción por el mismo sistema de bombeo que se utiliza para mantener constante dentro de la cámara la presión del gas o mezcla de gases usados para mantener la descarga de plasma.

Simultáneamente, el elemento metálico presente en el compuesto utilizado, al ser oxidado por las especies del plasma, se incorpora a la capa fina del óxido que se está formando. Controlando la presión parcial del (los) compuesto(s) metalorgánico(s) y las condiciones del plasma se puede variar la velocidad de deposición de la capa inorgánica.

Como ventajas del proceso objeto de la invención cabe mencionar las siguientes:

- Es posible controlar la velocidad de degradación del polímero de base ajustando simplemente el tiempo de tratamiento con el plasma;
- Se pueden sintetizar una gran variedad de capas inorgánicas, buscando una especificidad dada frente al crecimiento de ciertas células (por ejemplo, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, hidroxiapatita...). Para ello basta cambiar el blanco del material a evaporar en las técnicas de PVD o el precursor organometálico volátil en las de PECVD ;
- Existe una gran variedad de complejos metalorgánicos disponibles comercialmente o de blancos para evaporar;

- Se puede implantar de manera sencilla en equipos PVD o PECVD ya existentes;
- Las técnicas de evaporación térmica, *magnetron sputtering*, *PECVD* o similares son económicas y están ampliamente implantadas a nivel industrial;
- El control independiente de varias fuentes para el material de la capa activa permite el ajuste de la composición y/o estructura de multicapa del material resultante;
- Al tratarse de un proceso que se realiza a temperatura ambiente es adecuado para sustratos poliméricos y termosensibles, no restringiéndose a los sustratos poliméricos reabsorbibles objeto primero de esta invención.

Tanto la composición, como el espesor de la capa de material activo depositada pueden controlarse mediante los siguientes parámetros:

- Tipo de precursor o material del blanco utilizados;
- Tiempo del proceso de deposición; y
- Disposición o arquitectura física del reactor para llevar a cabo el procedimiento.

De manera general, el método de fabricación reivindicado se desarrolla en equipos de vacío convencionales para la deposición mediante técnicas PVD, PECVD o similares.

Adicionalmente, el dispositivo o dispositivos utilizados pueden asimismo comprender medios para controlar "in situ" el proceso de deposición, como por ejemplo balanzas de cuarzo para monitorizar los espesores depositados, situadas próximas al portamuestras y con geometría variable. Así mismo, para optimizar el proceso es conveniente disponer de sistemas que permitan la movilidad en condiciones de vacío del portamuestras y las fuentes de deposición.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Organización posicional de las membranas de PLGA en las calotas de los conejos en el ejemplo con SiO<sub>2</sub>.

Fig. 2. Tratamiento con plasma de O<sub>2</sub> y funcionalización superficial de las membranas funcionalizadas de PLGA.

Fig. 3. Procedimiento quirúrgico. Imágenes de la operación.

5

Fig. 4. Microscopía óptica. Coloraciones. Azul de Toluidina (BT). Comparación de los niveles de hueso estructural en los diferentes nanocomposites respecto al Control, tras 1 mes de regeneración; (Izq): control PLGA. (Dcha): SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

10 Fig. 5. Microscopía óptica. Mineralización. Von Kossa: Comparación de los niveles de mineralización entre los tratamientos respecto al control, tras un mes de post-cirugía; (Izq): Control PLGA. (Dcha): SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

15 Fig. 6. Enzimología; Balance Resorción/Aposición. Evidencia de Fosfata Ácida tartrato de sodio resistente de (TRAP) de Osteoclastos, Resorción tras 1 mes de regeneración; (Izq): Control PLGA. (Dcha): SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

Fig. 7. Enzimología; Evidencia de la fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos, Aposición tras 1 mes de regeneración; (Izq): Control PLGA. (Dcha): SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

20

Fig. 8. Fluorescencia. Estudio de calceína; milímetros de hueso neoformado por día; (Izq): Control PLGA. (Dcha): SiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

25 Fig. 9. Organización posicional de las membranas de PLGA en las calotas de los conejos en el ejemplo con TiO<sub>2</sub>.

Fig. 10. Imagen de la radiografía; TiO<sub>2</sub>/PLGA + P-O<sub>2</sub>. Junto al control (T).

30 Fig. 11. Microscopía óptica. Coloraciones. Azul de Toluidina (BT). Comparación de los niveles de hueso estructural en los diferentes nanocomposites respecto al Control, tras 1 mes de regeneración; (Izq): control PLGA. (Dcha): TiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

35 Fig. 12. Microscopía óptica. Mineralización. Von Kossa: Comparación de los niveles de mineralización entre los tratamientos respecto al control, tras un mes de post-cirugía; (Izq): Control PLGA. (Dcha): TiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

Fig. 13. Enzimología; Balance Resorción/Aposición. Evidencia de Fosfata Ácida tartrato de sodio resistente de (TRAP) de Osteoclastos, Resorción tras 1 mes de regeneración; (Izq): Control PLGA. (Dcha): TiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

5 Fig. 14. Enzimología; Evidencia de la fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos, Aposición tras 1 mes de regeneración; (Izq): Control PLGA. (Dcha): TiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

Fig. 15. Fluorescencia. Estudio de calceína; milímetros de hueso neoformado por día; (Izq): Control PLGA. (Dcha): TiO<sub>2</sub>/PLGA+P-O<sub>2</sub>. Objetivo 5x.

10

Fig. 16. Microscopía óptica. Coloraciones con azul de toluidina (BT). Comparación por BT de los porcentajes óseos neoformados en los diferentes nanocomposites tras 1 mes de regeneración. Imágenes tras la coloración con BT (1 mes) objetivo 10x; (Arriba izq): PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo dcha): Control PLGA.

15

Fig. 17. Microscopía óptica. Coloraciones con azul de toluidina (BT). Comparación por BT de los porcentajes óseos neoformados en los diferentes nanocomposites tras 2 meses de regeneración. Imágenes tras la coloración con BT (2 meses) objetivo 10x; (Arriba izq): PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo dcha): Control PLGA.

20

Fig. 18. Microscopía. Enzimología: Evidencia de Fosfatasa Ácida tartrato residente de (TRAP) de Osteoclastos tras 1 mes; imágenes tras la enzimología con TRAP (1 mes) objetivo 5x; (Arriba izq): PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro Izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma 2. (Abajo dcha): Control PLGA. (Contrastados con Azul de Toluidina diluido).

25

Fig. 19. Microscopía. Enzimología: Evidencia de Fosfatasa Ácida tartrato residente de (TRAP) de Osteoclastos tras 2 meses; imágenes tras la enzimología con TRAP (1 mes) objetivo 5x; (Arriba izq): PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro Izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma 2. (Abajo dcha): Control PLGA. (Contrastados con Azul de Toluidina diluido).

30

Fig. 20. Microscopía. Enzimología: Evidencia de Fosfatasa Alcalina (ALP) de Osteoclastos tras 1 mes; imágenes tras la enzimología con ALP (1 mes) objetivo 10x; (Arriba izq):

35

PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro Izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma 2. (Abajo dcha): Control PLGA. Objetivo 20x.

5 Fig. 21. Microscopía. Enzimología: Evidencia de Fosfatasa Alcalina (ALP) de Osteoclastos tras 2 meses; imágenes tras la enzimología con ALP (2 meses) objetivo 10x; (Arriba izq): PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro Izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma 2. (Abajo dcha): Control PLGA. Objetivo 20x.

10

Fig. 22. Coloración Von Kossa; imágenes del tejido tras coloración con Nitrato de Plata de Von Kossa (VK) tras 1 mes de regeneración; imágenes tras la coloración VK (1 mes) a objetivo 10x; (Arriba izq): PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo dcha): Control PLGA. Objetivo 20x.

15

Fig. 23. Coloración Von Kossa; imágenes del tejido tras coloración con Nitrato de Plata de Von Kossa (VK) tras 2 meses de regeneración; imágenes tras la coloración VK (2 mesese) a objetivo 10x; (Arriba izq): PLGA/SiO<sub>2</sub>. (Arriba dcha): PLGA/TiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Centro izq): PLGA/TiO<sub>2</sub>. (Centro dcha): PLGA + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo izq): PLGA/SiO<sub>2</sub> + Plasma O<sub>2</sub>. (Abajo dcha): Control PLGA. Objetivo 20x.

20

Fig. 24. Porcentaje óseo regenerado tras un mes de regeneración. Nanocomposites de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno evaluados frente a un control (PLGA) y frente al hueso original (h.o)

25

Fig. 25. Diferencias entre el hueso original y el hueso neoformado en cada tratamiento respecto al control. Nanocomposites de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

30

Fig. 26. Número de osteoclastos por milímetro. Nanocomposites de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

Fig. 27. Diferencias en el nivel resorptivo entre el hueso original y el neoformado. Nanocomposites de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

35

Fig. 28. Milímetros de Hueso Neoformado por día. Nanocomposites de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

5 Fig. 29. Porcentaje óseo regenerado tras un mes de regeneración. Nanocomposites de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

Fig. 30. Diferencias entre el hueso original y el hueso neoformado en cada tratamiento respecto al control. Nanocomposites de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

10

Fig. 31. Número de osteoclastos por milímetro. Nanocomposites de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

15 Fig. 32. Diferencias entre el nivel resorptivo del hueso original y neoformado. Nanocomposites de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

Fig. 33. Milímetros de hueso neoformado por milímetro. Nanocomposites de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno.

20 Fig. 34. Comparación de los porcentajes óseos neoformados tras 1 mes respecto al control sin membrana.

Fig. 35. Comparación del porcentaje óseo medio neoformado en 1 y 2 meses.

25 Fig. 36. Comparación del porcentaje óseo neoformado a 1 mes, respecto del hueso original.

Fig. 37. Comparación del porcentaje óseo neoformado a 2 meses, respecto del hueso original.

30 Fig. 38. Comparación de las diferencias entre el porcentaje óseo neoformado en 1 y 2 meses.

Fig. 39. Comparación de las diferencias entre el porcentaje óseo neoformado respecto al hueso original preexistente, en 1 y 2 meses tras la regeneración.

35

Fig. 40. Comparación del inverso de las medias de las longitudes óseas mineralizadas en 1 y 2 meses para cada tipo de membrana.

Fig. 41. Comparación del porcentaje resorptivo a 1 y 2 meses en cada tipo de membrana.

5

Fig. 42 Comparación del número de osteoclastos por milímetro tras 1 y 2 meses de cada tipo de membrana.

## EJEMPLOS DE LA INVENCION

10

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la membrana de la invención en la regeneración del tejido óseo, y particularmente, para la regeneración ósea guiada.

15

**Ejemplo 1. Evaluación comparativa *in vivo* de los *nanocomposites* de óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno, mediante ROG.**

20

Se ponen de manifiesto las diferencias funcionales *in vivo*, entre el tratamiento con nanocomposites de óxido de silicio en membranas reabsorbibles de ácido poliláctico-co-políglíclico (PLGA) funcionalizadas con plasma de oxígeno, para favorecer el crecimiento y proliferación de los osteoblastos durante la regeneración ósea guiada craneal con conejos de experimentación.

25

*Elaboración de membranas poliméricas de PLGA*

Las membranas que se desarrollan son scaffolds orgánicos reabsorbibles de aproximadamente 40 µm de espesor, y funcionalizados a escala nanométrica con capas inorgánicas bioactivas de varias decenas de nanómetros de SiO<sub>2</sub>, fabricados en el Instituto de Ciencias de los Materiales de Sevilla (ICMSE).

Se basan en polímeros del ácido poliláctico y/o políglicólico preparados según un procedimiento conocido, y preparadas mediante metodologías de base nanotecnológica basadas en el uso de plasmas fríos y de *magnetron sputtering*, para ser posteriormente funcionalizadas.

35

### *Funcionalización superficial de membranas poliméricas*

Con el fin de promover una mayor osteointegración se realizaron modificaciones en la superficie de las membranas. Estas modificaciones incluyen procesos de recubrimiento con capas inorgánicas de óxidos de titanio ( $\text{SiO}_2$ ) con propiedades potencialmente bioactivas, es decir superficies que puedan formar un enlace químico directo entre el hueso y la superficie del implante fijación activa, equivalente al concepto de osteointegración utilizado por primera vez por Brånemark para describir el comportamiento de implantes dentales de titanio en contacto con el hueso.

10

Para facilitar la degradación tanto *in vivo* como *in vitro* de las membranas de PLGA, se sometieron a un tratamiento con plasma de oxígeno antes de la deposición de la capa inorgánica sobre su superficie. Este tratamiento de Plasma (P-O<sub>2</sub>) produce la funcionalización superficial de la capa de PLGA y aumenta su rugosidad debido al *etching* producido por el plasma. Globalmente este tratamiento hace a la membrana más sensible a medios líquidos de cultivo favoreciendo su degradación. También se produce una mejora de la adherencia entre la capa nanométrica inorgánica y la propia membrana de PLGA. Estos procesos tienen lugar a temperaturas próximas a la ambiente y no afectan a la integridad de la membrana polimérica, no obstante, además de estas muestras, se han testado muestras en cuya preparación no se ha realizado el tratamiento con P-O<sub>2</sub>.

20

Un esquema de este conjunto de procesos se presenta en la figura 2. En el mismo se muestra cómo en una primera etapa, el tratamiento con el plasma de oxígeno produce la activación superficial de la membrana de PLGA aumentando su rugosidad. En una segunda etapa se produce la deposición de la capa nanométrica inorgánica bioactiva, quedando la membrana entonces lista para su uso.

25

- $\text{SiO}_2/\text{PLGA}$  (+P-O<sub>2</sub>)
- PLGA SENCILLO (CONTROL)

30

### *Ejemplares de experimentación animal*

Las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo en el Centro de Cirugía Mínimamente Invasiva Jesús Usón (CCMI, Cáceres, España). Para este estudio se utilizaron 4 conejos de experimentación de raza *New Zeland* blancos e idénticas características; (edad: 6 meses,

35

peso: 3,5-4 Kg), con alimentación diaria de tipo dieta mantenimiento conejos de *Harlan Teckland Lab Animal Diets (2030)*.

*Procedimiento de experimentación animal.*

5

El método de cirugía empleada fue ROG. Se comenzó con la inmovilización de los animales, control de constantes vitales. Para el proceso de anestesia se utilizó: inducción intravenosa con midazolán 0.25 mg/kg y propofol 5 mg/kg, mantenimiento con gas inhalatoria de sevoflurano 2,8% aspirado y analgesia de ketorolaco 1,5 mg/kg y tramadol 3mg/kg. Una vez sedados y preparados los conejos, se realizó una incisión entre las bases de las orejas comunicándola con una incisión en la línea media de la calota desde la incisión anterior al frontal (unos 5 cm) con hoja de bisturí nº15. Seguidamente desplazado de las capas epitelial, conectiva y muscular con periosteotomo de Pritchard, control de sangrado con compresión y aspiración, exposición de la superficie externa del cráneo y lavado de la zona con solución salina. Una vez despegados los colgajos triangulares, se separaron mediante sutura del 2/0 colgando de ellos dos mosquitos para dejar despejado el campo de intervención. Se identificaron dos estructuras, cresta ósea posterior y la una salida de un nervio anterior. Entre ambas estructuras, a sendos lados de la línea media se realizaron tres defectos óseos separados cada uno de ellos por 3 mm, con una trefina montada en micromotor de implantes con irrigación salina. La trefina utilizada es la referencia 08.910.13 de Helmut Zepf, de diámetro interno de 5 mm, de dientes 2,35 mm y longitud 30 mm. Con dicha pieza se marcará el defecto con una profundidad de 1 mm, y a 2000 rpm. El hueso se eliminará usando piezocirugía y controlando la profundidad a 2 mm mediante sonda periodontal.

25

Una vez realizados los defectos, éstos se cubrieron con las distintas membranas de PLGA, tal y como muestra la figura.1, colocadas según el grupo asignado, siguiendo la siguiente organización:

30

Las membranas se fijaron con un adhesivo tisular (TissuCol®) colocado en el reborde óseo adyacentes los defectos para fijar mejor la membrana confirmándose una adecuada adhesión y poca movilidad al desplazar el colgajo a su posición inicial. Se procedió a la sutura en tres planos, utilizando siempre material reabsorbible. De 4/0 en el plano de periostio, de 4/0 en el plano subepidérmico, y de 2/0 en piel. Se utilizaron puntos simples con la mejor aproximación posible de bordes y limpiado de la herida. El tiempo aproximado de la operación fue de 1h por ejemplar.

35

Posteriormente a la cirugía se les administró analgesia antiinflamatoria buprenorfina 0.05 mg/kg y carprofeno 1 ml/12.5 kg pv y reposo programado vigilado.

5 Todos los ejemplares fueron sacrificados utilizando sobredosis de cloruro potásico en disolución vía intravenosa al mes tras la operación, y las muestras fueron obtenidas a partir de la calota de cada ejemplar, cortadas en plano sagital anatómico, y tras la separación de la masa cerebral y lavado con suero fisiológico, se procedió al corte y marcado de las piezas individualmente. Para su manipulación en el laboratorio, las muestras fueron fijadas con Alcohol de 70° para su envío al laboratorio histológico.

10

#### *Procesamiento de las muestras*

El procesado histológico de las muestras de calota, una vez sacrificadas, se desarrollo en la Facultad de Cirugía Dental. EA 2496 (Universidad Paris Descartes), atendiendo al siguiente protocolo:

15

1. El primer paso será un estudio radiológico (R-X) de los bloques para observar la localización y densidad ósea de los defectos en cada grupo.

20

2. Inclusión en Metil Metacrilato (MMA) *Merck* (En bloques).

3. Tallado de los bloques de MMA en media luna, en horizontal y siguiendo el plano perpendicular al eje sagital, en G-Brot 95370, el pulido de los mismos se efectuó en una pulidora de disco G-Brot 95370.

25

4. Cortes histológicos de 5 $\mu$  de espesor realizados en Microtomo *Jung Polycute*, a nivel de la zona media del defecto óseo (para minimizar varianza de espesor intermuestral), en series de 10 sobre portas de cristal pretratados con albúmina, y fijados con alcohol de 80°.

30

5. Coloraciones:

-Azul de Toluidina.

-Von Kossa.

35

6. Enzimología:

-Fosfatasa ácida (TRAP).

-Fosfatasa alcalina (ALP).

7. Fluorescencia:

-Calceína.

5

*Estudio del Porcentaje Óseo Neoformado*

Para comparar el porcentaje óseo neoformado respecto del original tras la regeneración de los defectos se utilizó la coloración histológica de azul de toluidina (BT) *Merck*. Esta coloración es la técnica de rutina habitual para un análisis rápido de contraste en un tejido. Además, el azul de toluidina se comporta como un colorante ortocromático; (color azul), o metacromático (color violeta-rojo), dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida. Coloreando metacromáticamente las estructuras ricas en proteoglicanos sulfatados, como el heparán sulfato, presente por ejemplo en el cartílago joven (condroblastos y matriz inmadura) y en los gránulos de las células cebadas. Por lo tanto, el tejido osteoide (tejido óseo de nuevo con mayor porcentaje de matriz colagenosa de tipo I) y el hueso maduro con mayor proporción de mineral, se observarán con distinta tonalidad de azul ya que poseen distinto pH. Para este estudio se partió de una solución de azul de toluidina al 1%, a pH 3,6 ajustado con HCl. El tiempo de exposición de las muestras al colorante fue de 10 minutos a temperatura ambiente, enjuagados con agua destilada y secados al aire.

Para evaluar la actividad resorptiva del tejido óseo neoformado se utilizó la técnica enzimológica de la evidencia de la fosfatasa ácida tartrato sódico resistente (TRAP), hidrolasa ácida de osteoclastos y preosteoclastos liberada al medio circundante por estas células durante la resorción ó reabsorción ósea para facilitar la disolución del hueso, y que se relaciona con el grado de vitalidad del tejido óseo. Para ello se incubaron (en condiciones de oscuridad) los cortes de las muestras en naphthol ASTR fosfato *Sigma* previamente disuelto en NN dimetil formamide, al que se añadió tampón acetato 0,1M, tartrato de sodio *Sigma* y Fast Red TR *Aldrich* ajustando el pH a 5,2 y filtrado de la solución final. Los cortes se incubaron 1h a 37°C. El resultado positivo son agregados rojizos en el interior bordeando a los osteoclastos, lo que nos permite cuantificar el número de los mismos y la superficie resorptiva del tejido analizado.

35

*Estudio del balance Aposición/Resorción*

Para evaluar la actividad osteosintética del tejido se utilizó la técnica de la evidencia de la fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos y preosteoblastos, enzima hidrolasa marcador de diferenciación osteosintética, responsable de formar colágeno tipo I y nódulos calcificados. Para el estudio se preincubaron los cortes 10 min. en tris-triton 0,1%, posteriormente y tras lavado en tris 0,1M pH 9, se incubaron 30 min. (en oscuridad) y a 37°C en naftol ASTR fosfato *Sigma* acoplado a fast blue RR Salt *Sigma* (revelador de la reacción coloreado), con pH 9 ajustado. Se les añadió también una coloración débil de azul de toluidina al 1% diluido al 10% en agua destilada para dar contraste a las muestras. El resultado positivo son células marcadas de color violeta. Esta coloración nos permite definir las dimensiones de la franja osteogénica de la muestra.

*Estudio de Mineralización*

Para ilustrar las diferencias de calcificación del tejido óseo mineralizado entre las diferentes muestras, se utilizó la técnica de coloración con nitrato de plata de Von Kossa (*VK Sigma*), que corresponde a un método de sustitución del Ca por Ag. El nitrato de plata se une sólo a la parte aniónica de las sales de calcio (fosfatos o carbonatos), compuesto que es de color amarillo y que expuesto al sol o a la luz adquiere color negro por reducción de la plata. Para medir la velocidad de aposición ósea y las bandas de hueso neoformado tras la operación se usó el método de la calceína-demeclociclina (marcadores fluorescentes, que emiten a diferente longitud de onda, administrados vía intravenosa, que señalizan procesos anabólicos de fijación ósea tisular). El análisis histomorfométrico de la presencia del marcador y la distancia entre las señales es un método eficaz para determinar y cuantificar los mecanismos de crecimiento óseo y de adaptación funcional. Ofrecen una visión del tejido óseo neoformado presentando dos líneas de diferenciación que corresponden con el hueso regenerado a 1 y 8 días previos al sacrificio de los ejemplares. Calceína al 2% NaHCO<sub>3</sub> en suero (SIGMA C0875 1g.) y Demeclociclina Hidrocloruro (SIGMA A6140 5g.).

*Estudio Morfométrico*

Para la visualización de los efectos óseos se utilizó el microscopio Zeis Axioscop 2 plus a objetivos de 4x, 10x y 20x. Para la adquisición de las imágenes se utilizó la cámara Sony 3CCD (DSP) junto con el software Smart Matrox Intelicam 8.0. Para la cuantificación del nuevo tejido regenerado y su comparación con el original se analizaron las zonas de estudio de distal (externa) a proximal (interna), mediante análisis ROI de color por regiones con el software Fiji-Image J.

*Análisis Estadístico*

Para la valoración estadística de los resultados obtenidos se utilizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para  $n=4$ . Y Análisis de U-Mann Whitney para el estudio de los grados de significancia individuales intergrupales, mediante el Software (MAC) Statview F-4.5.

*Resultados*

## 10 Microscopía óptica:

Tomando valores promedios  $\pm$  S.D de los resultados obtenidos en el estudio, tras los análisis con azul de toluidina (BT) se obtuvieron los siguientes resultados:

15 - Los porcentajes óseos neoformados medidos a 1 mes de reposo tras el postoperatorio muestran un (39,7% y S.D = 3,53) en las membranas funcionalizadas con  $\text{SiO}_2 + \text{P-O}_2$ , frente a un (30,57% y S.D = 1,96) en las membranas del grupo control.

20 - Las capturas digitales obtenidas tras la coloración de nitrato de plata (VK) ilustran las formaciones de fosfato cálcico durante la regeneración de los defectos óseos y confirma una mayor densidad de calcio mineral en las membranas del tipo  $\text{SiO}_2 + \text{P-O}_2 / \text{PLGA}$ , respecto al Control de PLGA sencillo con calcificación insuficiente. Las membranas que ofrecen menor diferencia respecto al nivel de hueso neoformado son también las funcionalizadas con óxido de silicio con un resultado de 2,9 respecto a un 12 del grupo control.

25 - Los análisis de la calceína a 8 y a un día previos del sacrificio muestran un resultado medio de 0,065 mm/día  $\pm$  0,015 S.D en las membranas de  $\text{SiO}_2 + \text{P-O}_2$ , frente a un 0,032  $\pm$  0,005 S.D en las membranas del grupo control con PLGA únicamente.

30 - Las imágenes obtenidas tras los análisis con enzimología con TRAP y ALP muestran una actividad osteoblástica y osteoclástica normales, sugiriendo un aumento de la actividad en aquellas funcionalizadas con  $\text{SiO}_2 + \text{P-O}_2$  con 13,58 Oc/mm y 9,21 en el grupo control. Demostrando una vitalidad tisular y nivel de aposición normal de las muestras estudiadas.

35 - Así mismo, las membranas que ofrecen menor diferencia respecto al nivel de resorción ósea son también las funcionalizadas con óxido de silicio con un resultado de 7,9 frente a una diferencia de 12,3 en las del grupo control.

Tabla 1. Porcentaje óseo tras un mes de regeneración.

<b>HUESO NEOFORMADO (%)</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R139</b>
<b>SiO2/PLGA + (P-O2)</b>	42,3	33,6	48,5	34,4
<b>Control (PLGA)</b>	32	38,6	36	26
<b>HUESO ORIGINAL (H.O)</b>	39,8	45,4		

5 Tabla 2. Diferencias entre porcentajes óseos de cada grupo de estudio respecto al original.

<b>% Oss</b>	<b>CONTROL (PLGA)</b>	<b>SiO2/PLGA + PO2</b>	<b>H.O</b>
<b>MEDIA</b>	30,57	39,7	42,6
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S.D)</b>	1,96	3,53	3,95
<b>DIFERENCIA (H.O - H.N)</b>	12,03	2,9	

<b>Significancia Estadística (% OS)</b>	
<b>KW</b>	$H = 6,441$
	$p = 0,039^*$

10 Tabla 3. Número de osteoclastos por milímetro tras un mes de regeneración.

<b>RESORCION OSEA</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R139</b>
<b>SiO2/PLGA + (P-O2)</b>	12,3	15,8	12,2	14
<b>Control (PLGA)</b>	10,6	7,3	10,4	11,9

Tabla 4. Número de osteoclastos medio, respecto al original.

<b>Oc/mm</b>	<b>SiO2/PLGA + P-02</b>	<b>CONTROL (PLGA)</b>	<b>H.O</b>
<b>MEDIA</b>	13,58	9,21	21,5
<b>S.D</b>	0,849	0,61	
<b>DIFERENCIA (H.O - H.N)</b>	7,92	12,29	

<b>OC/mm</b>	
<b>KW</b>	$H = 10,649$ $p = 0,0049^{**}$

5

Tabla 5. Estudio de la calceína: nivel de hueso neoformado por día respecto al control.

<b>CALCEINA (mm/día)</b>	<b>Control</b>	<b>SiO2 + (P-02)</b>
1	0,032	0,071
2	0,039	0,090
3	0,029	0,071
4	0,025	0,078
5	0,027	0,039
6	0,029	0,071
7	0,036	0,054
8	0,036	0,045
9	0,039	0,064
10	0,029	0,071
<b>MEDIA (mm/día)</b>	<b>0,032</b>	<b>0,065</b>
<b>S.D +/-</b>	<b>0,005</b>	<b>0,015</b>

10

**Ejemplo 2. Evaluación comparativa *in vivo* de los *nanocomposites* de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en membranas de PLGA funcionalizadas con plasma de oxígeno, mediante ROG.**

- 5 Modelo similar al anterior, con los mismos materiales y métodos, usando en esta ocasión óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>)

Las membranas testadas *in vivo* por comparación fueron:

- 10 - TiO<sub>2</sub>/PLGA (+P-O<sub>2</sub>).  
- PLGA SENCILLO (Control).

*Resultados*

- 15 Microscopía óptica:

Tomando valores promedios ± S.D de los resultados obtenidos en el estudio, tras los análisis con Azul de Toluidina (BT) se obtuvieron los siguientes resultados:

- 20 - Los porcentajes óseos neoformados medidos a 1 mes de reposo tras el postoperatorio muestran un (45,67% y S.D = 6,07) en las membranas funcionalizadas con TiO<sub>2</sub> + P-O<sub>2</sub>, frente a un (30,57% y S.D = 1,96) en las membranas control.

- 25 - Las capturas digitales obtenidas tras la coloración de nitrato de plata (VK) ilustran las formaciones de fosfato cálcico durante la regeneración de los defectos óseos y confirma una mayor densidad de calcio mineral en las membranas del tipo TiO<sub>2</sub>+P-O<sub>2</sub>/PLGA, respecto al grupo control PLGA con mínima calcificación. Las membranas que ofrecen menor diferencia respecto al nivel de hueso neoformado son también las funcionalizadas con titanio con un resultado de (-3,5), frente a un 12 de las control.

- 30 - Los análisis de la calceína a 8 y a un día previos del sacrificio muestran un resultado medio de 0,061 +/- 0,017 S.D en las de Titanio y un 0,032 +/- 0,005 S.D en las membranas Controles con PLGA únicamente.

- 35 - Las imágenes obtenidas tras los análisis con enzimología con TRAP y ALP muestran una actividad osteoblástica y osteoclástica normales, sugiriendo un aumento de la actividad en aquellas funcionalizadas con TiO<sub>2</sub> + P-O<sub>2</sub> con 15,13 Oc/mm frente a 9,21 Oc/mm en las del grupo control. Y demostrando una vitalidad tisular y nivel de aposición normal de las muestras estudiadas.

Así mismo, las membranas que ofrecen menor diferencia respecto al nivel de resorción ósea son también las funcionalizadas con Titanio con un resultado de 6,4 frente a un 12,3 en las del grupo control.

5 Tabla 6. Porcentaje óseo tras un mes de regeneración.

<b>HUESO NEOFORMADO (%)</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R132</b>	<b>R145</b>
<b>TiO2/PLGA + (P-O2)</b>	<b>37,5</b>	<b>57</b>	<b>33,1</b>	<b>55</b>
<b>Control (PLGA)</b>	<b>24,4</b>	<b>33,3</b>	<b>23,2</b>	<b>31,08</b>
<b>HUESO ORIGINAL (H.O)</b>	<b>39,98</b>	<b>45,4</b>		

Tabla 7. Diferencias entre porcentajes óseos de cada grupo de estudio respecto al original.

10

<b>% Oss</b>	<b>CONTROL (PLGA)</b>	<b>TiO2/PLGA + P-O2</b>	<b>H.O</b>
<b>MEDIA</b>	<b>30,57</b>	<b>45,67</b>	<b>42,6</b>
<b>S.D</b>	<b>1,96</b>	<b>6,07</b>	<b>3,95</b>
<b>DIFERENCIA (H.O - H.N)</b>	<b>12,03</b>	<b>-3,05</b>	

<b>Significancia Estadística (% OS)</b>	
<b>KW</b>	<b>H = 6,441</b>
	<b>p = 0,039*</b>

Tabla 8. Número de osteoclastos por milímetro tras un mes de regeneración.

15

<b>RESORCION OSEA</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R132</b>	<b>R145</b>
<b>TiO2/PLGA + (P-O2)</b>	<b>17,2</b>	<b>11,2</b>	<b>18,4</b>	<b>13,7</b>
<b>Control (PLGA)</b>	<b>8,8</b>	<b>9,4</b>	<b>6,8</b>	<b>8,5</b>

Tabla 9. Número de osteoclastos medio respecto al original.

RESORCION OSEA	R4	R5	R132	R145
TiO <sub>2</sub> /PLGA + (P-O <sub>2</sub> )	17,2	11,2	18,4	13,7
Control (PLGA)	8,8	9,4	6,8	8,5

OC/mm	
KW	H = 10,649
	p = 0,0049**

5 Tabla 10. Estudio de la calceína. Nivel de hueso neoformado por día respecto al control.

CALCEINA (mm/día)	Control	TiO <sub>2</sub> + (P-O <sub>2</sub> )
1	0,032	0,068
2	0,039	0,090
3	0,029	0,054
4	0,025	0,036
5	0,027	0,082
6	0,029	0,060
7	0,036	0,045
8	0,036	0,060
9	0,039	0,075
10	0,029	0,043
Media (mm/día)	0,032	0,061
S.D +/-	0,005	0,017

10 **Ejemplo 3. Modelo comparativo *in vivo* de los nanocomposites de TiO<sub>2</sub> y SiO<sub>2</sub> respecto al tratamiento con plasma de O<sub>2</sub>, sobre membranas de PLGA en regeneración ósea guiada *in vivo* en conejos.**

Modelo comparativo de los dos modelos anteriores, con similar procedimiento y materiales y métodos.

Las membranas testadas por comparación fueron;

- PLGA,
- P-O2/PLGA
- TiO2/PLGA
- 5 - TiO2+P-O2/PLGA
- SiO2/PLGA
- SiO2+P-O2/PLGA.

### Resultados

10

Microscopía óptica:

Tomando valores promedios  $\pm$  S.D de los resultados obtenidos en el estudio, tras los análisis con azul de toluidina (BT) se obtuvieron los siguientes resultados;

- 15 - Los porcentajes óseos neoformados a 1 mes de reposo tras el postoperatorio, y las medias de las diferencias con respecto al porcentaje de hueso original que se han obtenido demuestran que las membranas funcionalizadas con:  $SiO_2 + P-O_2$ ; (41,5% y  $D = 9,5$ ), seguidas de las de  $SiO_2$  (42,4% y  $D = 11,53$ ), presentan un mayor porcentaje de hueso neoformado. Las membranas funcionalizadas con  $TiO_2$  (32,83% y  $D = 10,47$ ) son las que les siguen en esos parámetros.

20

- En el caso de las muestras procesadas a 2 meses, las membranas con mayor porcentaje de hueso regenerado y menor diferencia con el original son las que poseen funcionalizaciones del tipo:  $SiO_2+P-O_2$  (59,07% y  $D = -8,07$ ) regenerando mas hueso que el original existente. Las membranas con  $TiO_2$  (41,67 y  $D = 1,76$ ) son las que están en segundo orden de potencial osteoregenerador.

25

- Las capturas digitales obtenidas tras la coloración de nitrato de plata (VK) ilustran las formaciones de fosfato cálcico durante la regeneración de los defectos óseos y confirma las diferencias entre las membranas estudiadas evidenciando una mayor densidad de calcio mineral en las membranas de un mes con  $SiO_2+P-O_2/PLGA$ , seguidos de  $TiO_2/PLGA$  y  $TiO_2+P-O_2/PLGA$ , respecto al Control PLGA con mínima calcificación. En las muestras de

30 dos meses, tras el balance sintético-resortivo, la membrana más destacada es la de  $SiO_2+P-O_2/PLGA$ , frente al Control.

30

- Las imágenes obtenidas tras los análisis con enzimología con TRAP y ALP muestran una actividad Osteoblástica y Osteoclastica normales, sugiriendo un aumento de la actividad en aquellas tratadas con plasma y las funcionalizadas con  $SiO_2$ , y demostrando una vitalidad

35 tisular normal de las muestras estudiadas.

Tabla 11: Porcentaje óseo (Porcentaje óseo neoformado respecto al original), hueso original y neoformado, media de las diferencias (diferencias entre porcentajes óseos entre el primer mes y el segundo mes de regeneración respecto al original), longitud ósea mineralizada, resorción 1 (longitud resortiva), resorción 2 (porcentaje de resorción ósea), osteoclastos 1 (recuento medio del nº de osteoclastos totales), osteoclastos 2 (número de osteoclastos por milímetro de perímetro mineralizado). (\*) Las muestras R11037-5; (1), y el resto marcadas con (-); (2) en las tablas, no están presentes debido a motivos de STOCK (1), y a defectos de deterioro durante la inclusión o manipulación de las mismas (2), respectivamente.

10

ES 2 497 240 B1

	<b>CODIGO ANIMAL</b>	<b>CONTROL PLGA (6)</b>	<b>PLGA/SIO2 (1)</b>	<b>PLGA/TIO2 + (P-O2) (2)</b>	<b>PLGA/TIO2 (3)</b>	<b>PLGA + (P-O2) (4)</b>	<b>PLGA/SIO2 + (P-O2) (5)</b>	<b>CONTROL (NO MEMBRANA)</b>
<b>Porcentaje Óseo</b>	<b>MEDIA (D) 1m</b> +/- S.D	<b>39,77</b> +/- 8,52 %	<b>42,40</b> +/-16,83 %	<b>41,27</b> +/-14,56 %	<b>32,83</b> +/-19,22 %	<b>34,77</b> +/-10,39 %	<b>41,05</b> +/- 14,04 %	<b>8 %</b>
	<b>MEDIA (H.o)</b> +/- S.D	<b>55,63</b> +/-24,99 %	<b>53,93</b> +/-17,59 %	<b>69,13</b> +/-10,19 %	<b>43,43</b> +/-12,47 %	<b>63,73</b> +/-11,37 %	<b>51,00</b> +/-24,93 %	<b>23,40</b> %
	<b>MEDIA (D) 2m</b> +/- S.D	<b>38,2</b> +/-22,67 %	<b>41,8</b> +/-10,38 %	<b>39,5</b> +/-8,94 %	<b>41,67</b> +/-4,80 %	<b>50,27</b> +/-5,35 %	<b>59,07</b> +/-12,15 %	
<b>Hueso original y Neoformado. Media de las Diferencias</b>	<b>MEDIA (D) 1m</b>	<b>39,77 %</b>	<b>42,4%</b>	<b>41,27%</b>	<b>32,83%</b>	<b>34,77%</b>	<b>41,5%</b>	<b>8%</b>
	<b>MEDIA (2m)</b>	<b>38,2%</b>	<b>41,8%</b>	<b>39,5%</b>	<b>41,67%</b>	<b>50,27%</b>	<b>59,07%</b>	
	<b>MEDIA (H.O) 1m</b>	<b>55,63%</b>	<b>53,93%</b>	<b>69,13%</b>	<b>43,43%</b>	<b>63,73%</b>	<b>51%</b>	<b>23,4%</b>
	<b>DIFERENCIA (1m)</b>	<b>15,86%</b>	<b>11,53%</b>	<b>27,86 %</b>	<b>10,47 %</b>	<b>28,96 %</b>	<b>9,5 %</b>	<b>15,4%</b>
	<b>DIFERENCIA (2m)</b>	<b>17,40%</b>	<b>12,13 %</b>	<b>29,63 %</b>	<b>1,76 %</b>	<b>13,46 %</b>	<b>-8,07 %</b>	
	<b>DIFERENCIAS (1-2 m)</b>	<b>1,57%</b>	<b>0,80 %</b>	<b>1,77 %</b>	<b>-8,84 %</b>	<b>-15,50 %</b>	<b>-18,02 %</b>	
<b>Longitud Ósea Mineralizada</b>	<b>MEDIA (LTM) 1m</b> +/- 3,09 mm	<b>17,32</b> +/- 3,09 mm	<b>24,31</b> +/-5,06 mm	<b>16,66</b> +/-2,74 mm	<b>16,81</b> +/-5,19 mm	<b>17,32</b> +/-4,42 mm	<b>11,18</b> +/-7,26 mm	
	<b>1/x 1m</b>	<b>0,058 mm</b>	<b>0,041 mm</b>	<b>0,060 mm</b>	<b>0,059 mm</b>	<b>0,058 mm</b>	<b>0,107 mm</b>	
	<b>MEDIA (LTM) 2m</b> +/-0,98 mm	<b>13,89</b> +/-0,98 mm	<b>15,29</b> +/-0,81 mm	<b>16,74</b> +/-3,68 mm	<b>14,82</b> +/-2,33 mm	<b>17,49</b> +/-4,75 mm	<b>14,73</b> +/-2,33 mm	
	<b>1/x 1m</b>	<b>0,072 mm</b>	<b>0,065 mm</b>	<b>0,060 mm</b>	<b>0,067 mm</b>	<b>0,057 mm</b>	<b>0,068 mm</b>	
<b>Resorción 1</b>	<b>MEDIA (1m)</b> +/- 0,12 mm	<b>0,66</b> +/- 0,12 mm	<b>0,65</b> +/-0,092 mm	<b>0,78</b> +/-0,22 mm	<b>0,64</b> +/-0,36 mm	<b>0,54</b> +/- 0,17 mm	<b>0,35</b> +/- 0,19 mm	
	<b>MEDIA (2m)</b> +/-0,37 mm	<b>0,82</b> +/-0,37 mm	<b>0,95</b> +/-0,48 mm	<b>0,95</b> +/-0,21 mm	<b>0,57</b> +/-0,12 mm	<b>1,49</b> +/-0,95 mm	<b>0,68</b> +/-0,40 mm	
<b>Resorción 2</b>	<b>MEDIA (1m)</b>	<b>3,64 +/-0,59 %</b>	<b>4,20 +/-0,28 %</b>	<b>5,15 +/-1,94 %</b>	<b>3,59 +/-0,88 %</b>	<b>3,34 +/-1,48 %</b>	<b>3,32 +/-0,70 %</b>	
	<b>MEDIA (2m)</b>	<b>5,50 +/-1,73 %</b>	<b>6,47 +/-3,51 %</b>	<b>5,83 +/-0,10 %</b>	<b>4,45 +/-1,90 %</b>	<b>9,76 +/-8,27 %</b>	<b>6,70 +/-2,64 %</b>	
<b>Osteoclastos 1</b>	<b>MEDIA (1m)</b>	<b>18,5 +/-2,50</b>	<b>18 +/-1,0</b>	<b>24,5 +/-4,58</b>	<b>19,5 +/-12,49</b>	<b>16 +/-7,09</b>	<b>8,25 +/-3,89</b>	
	<b>MEDIA (2m)</b>	<b>25,5 +/-13,44</b>	<b>30,5 +/-12,68</b>	<b>32,75 +/-5,30</b>	<b>20,33 +/-6,03</b>	<b>44 +/-31,11</b>	<b>29 +/-17,84</b>	
<b>Osteoclastos 2</b>	<b>MEDIA (1m)</b>	<b>0,91+/- 0,46</b>	<b>1,20 +/- 0,19</b>	<b>1,59 +/- 0,50</b>	<b>1,06 +/- 0,35</b>	<b>0,98 +/- 0,55</b>	<b>0,83 +/- 0,24</b>	
	<b>MEDIA (2m)</b>	<b>1,79 +/- 0,87</b>	<b>2,10 +/- 0,98</b>	<b>1,99 +/- 0,12</b>	<b>1,58 +/- 0,83</b>	<b>2,87 +/- 2,56</b>	<b>2,02 +/- 1,35</b>	

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una membrana que comprende un polímero biodegradable, obtenible por un método que comprende exponer al menos una cara de un film polimérico al efecto de un plasma.
- 5
- 2.- La membrana según la reivindicación anterior, donde el plasma está compuesto por oxígeno, argón, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, o cualquiera de sus mezclas.
- 3.- La membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el polímero se selecciona de entre ácido poliláctico, ácido poliglicólico, o cualquiera de sus mezclas.
- 10
- 4.- La membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, obtenible por un método que además comprende depositar una o más capas nanométricas de óxidos activos en una o en las dos caras del film polimérico.
- 15
- 5.- La membrana según la reivindicación anterior, donde los óxido activos se seleccionan de la lista que consiste en SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, hidroxiapatita o derivados, u otros óxidos que no sean tóxicos ni que tengan efectos secundarios y que favorezcan el crecimiento de osteoblastos, o cualquiera de sus combinaciones.
- 20
- 6.- La membrana según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la deposición de capas nanométricas de óxidos activos se lleva a cabo mediante técnicas de vía seca.
- 7.- La membrana según la reivindicación anterior, donde las técnicas de vía seca se seleccionan de la lista que consiste en *physical vapor deposition* (PVD), *sputtering*, *plasma enhanced chemical vapor deposition* (PECVD), *pulsed laser deposition* (PLD), cualquier técnica análoga o cualquiera de sus combinaciones.
- 25
- 8.- La membrana según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde la capa o las capas nanométricas de óxidos activos tienen un espesor que varía entre 10 nm y 1 micra.
- 30
- 9.- La membrana según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde la capa o capas nanométricas de óxidos activos se depositan en la cara del film o membrana no tratada con plasma.
- 35

- 10.- La membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el tiempo de exposición de la cara del film polimérico al efecto del plasma varía entre 10 y 40 minutos.
- 5 11.- Un implante que comprende una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 12.- Un implante monolítico o articular según la reivindicación anterior que se selecciona de entre suturas, grapas, prótesis, tornillos o placas.
- 10 13.- El uso de la membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la elaboración de un medicamento.
- 14.- El uso de la membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la elaboración de un medicamento para la regeneración tisular.
- 15 15.- El uso de la membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la elaboración de un medicamento para la regeneración del tejido óseo.
- 16.- El uso de la membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la elaboración de un medicamento para inducir la neoformación de tejido óseo.
- 20 17.- El uso de la membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la elaboración de un medicamento para reparar partes del tejido muscular esquelético.
- 25 18.- Un método de obtención de la membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:
- (a) fabricar un "film" reabsorbible de polímero o polímeros biodegradables;
  - (b) activar una o las dos caras del film según (a) mediante un plasma de oxígeno o mezcla de gases,
  - 30 (c) depositar sobre una o las dos caras del film activado de (b) una primera capa de material activo, usando técnicas de vía seca que no alteren la integridad estructural del material polimérico de base.
- 19.- El método según la reivindicación anterior, donde el material activo del paso (c) es inorgánico.
- 35

20.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 18 y 19, que además comprende:

(d) incorporar una segunda o más capas en forma de multicapa sobre la primera para conseguir membranas multifuncionales y aptas para diversos procesos clínicos.

5 21.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, que además comprende:

(e) depositar capas nanométricas de composición mixta mediante la combinación de uno o más procesos de deposición simultánea o sucesiva.

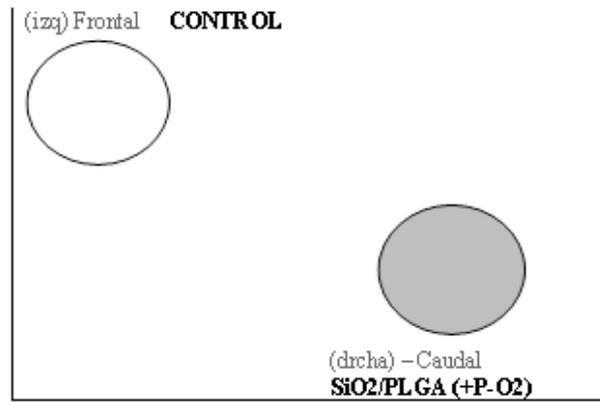


Fig. 1.

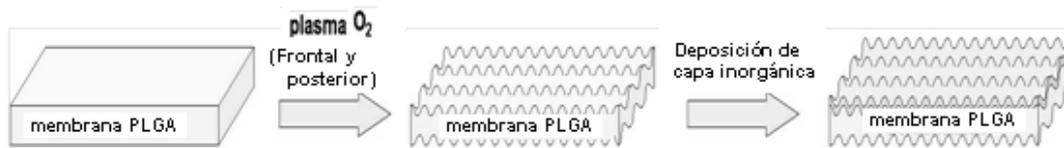


Fig. 2.

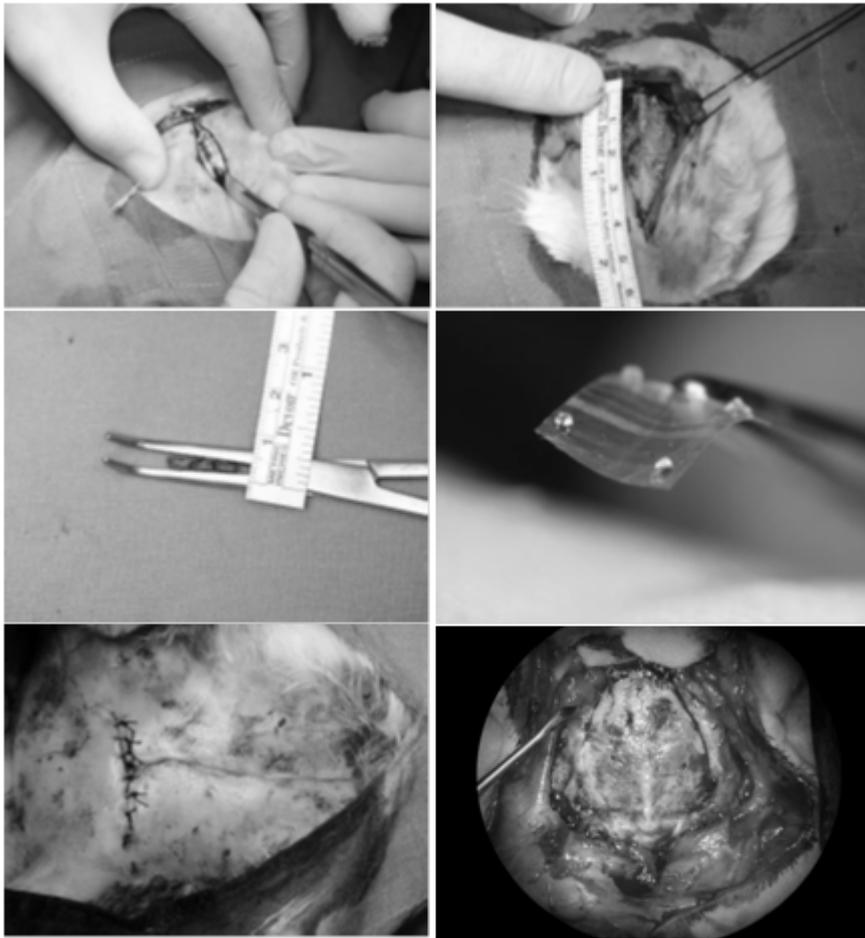


Fig. 3.

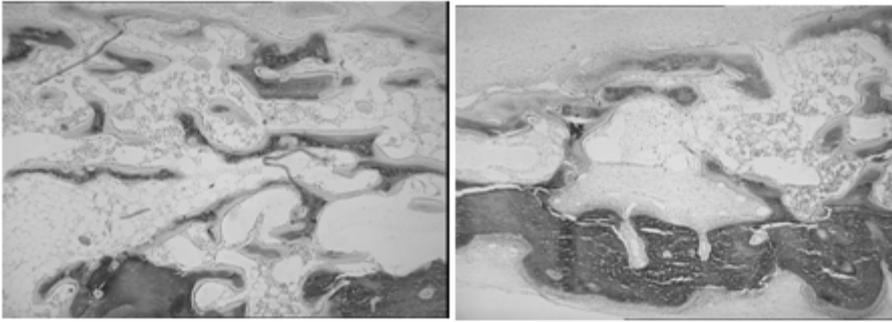


Fig. 4.

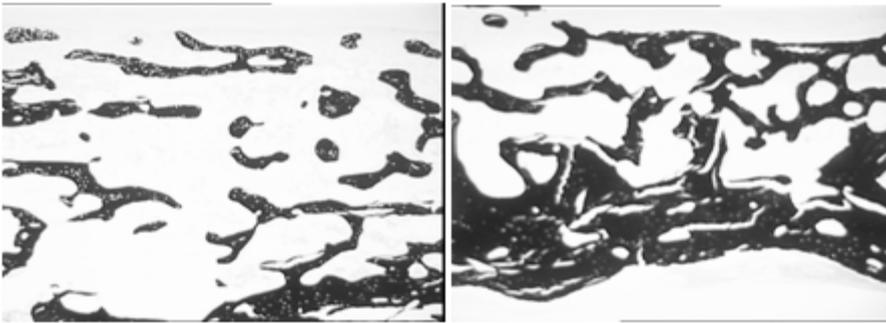


Fig. 5.

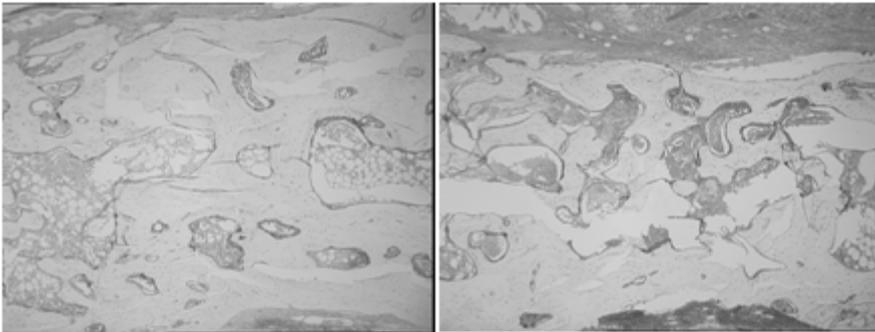


Fig. 6.

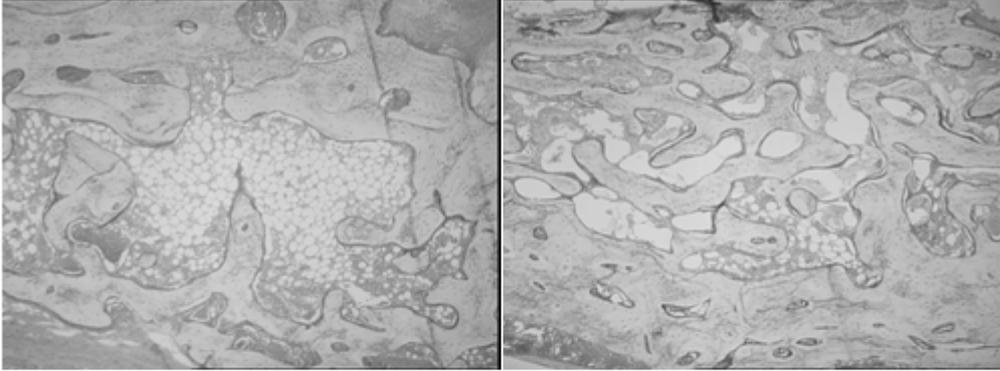


Fig. 7

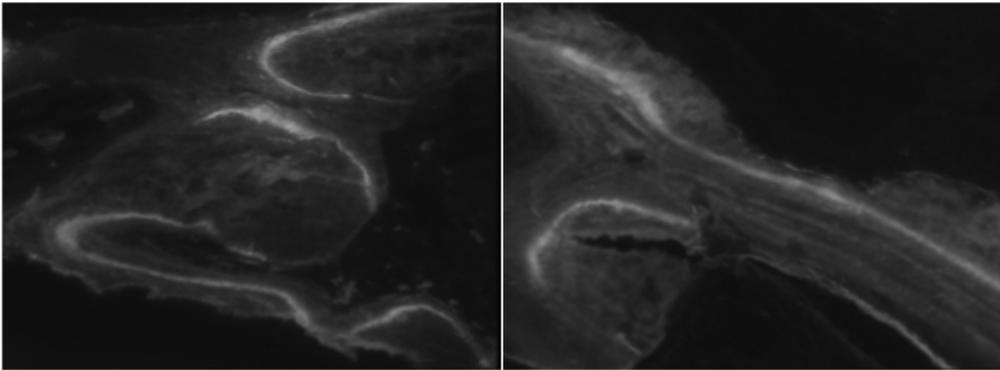


Fig. 8

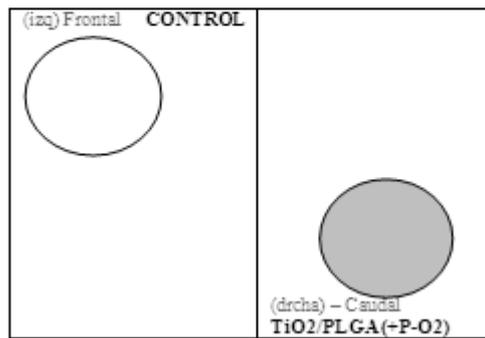


Fig. 9

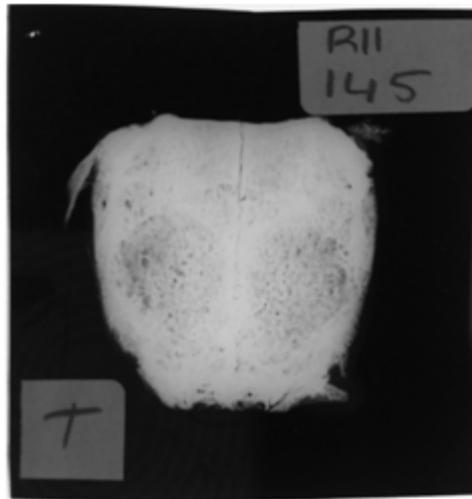


Fig. 10

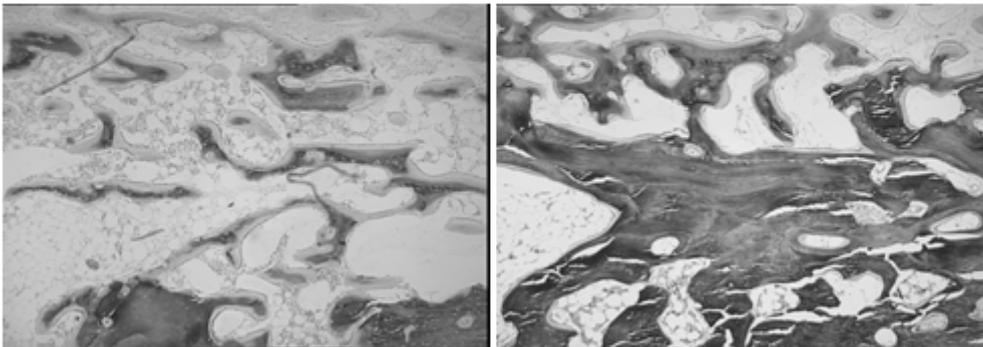


Fig. 11

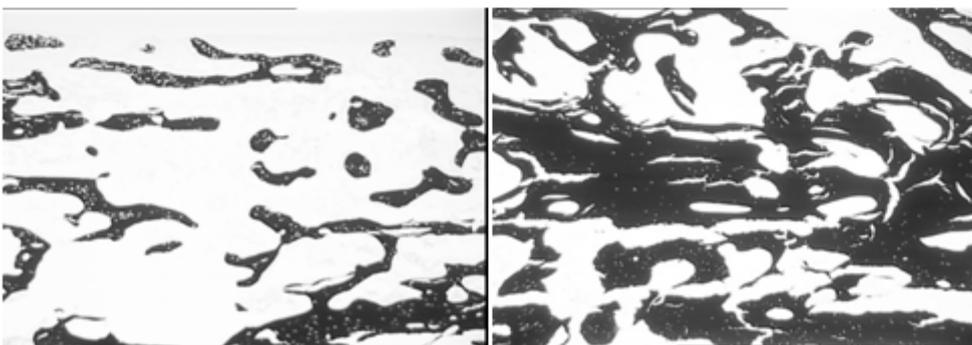
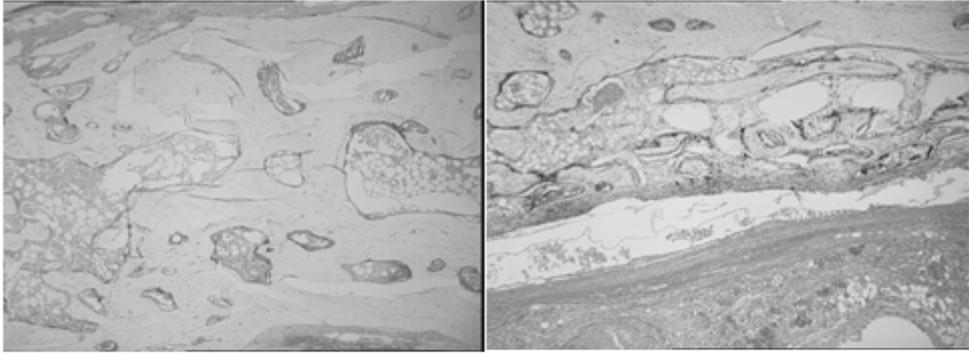
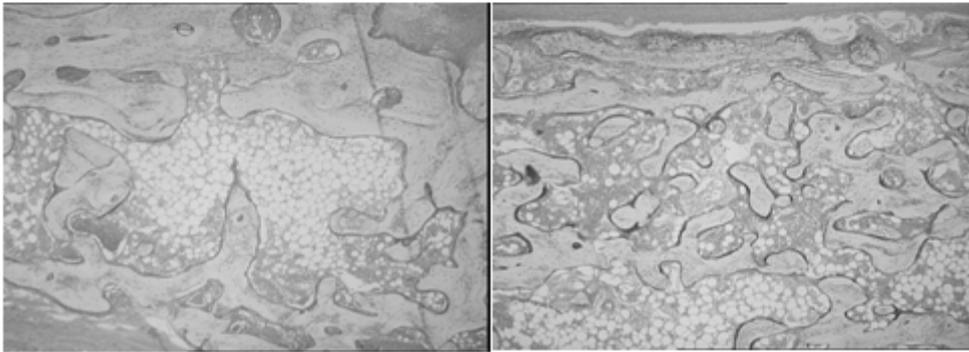


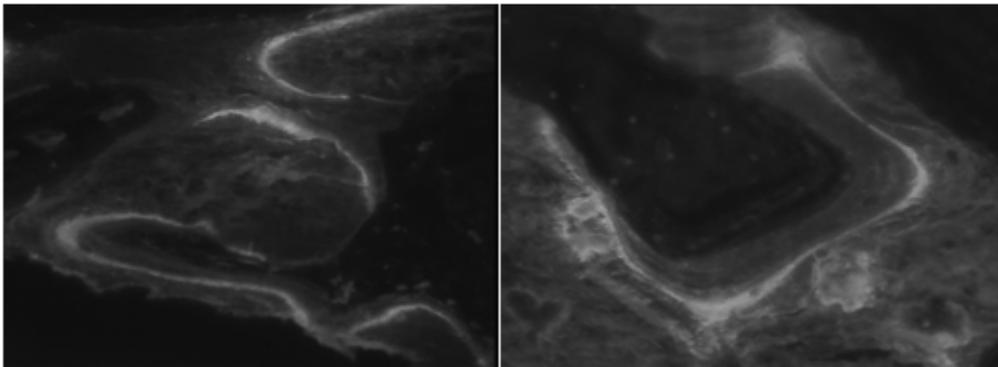
Fig. 12



**Fig. 13**



**Fig. 14**



**Fig. 15**

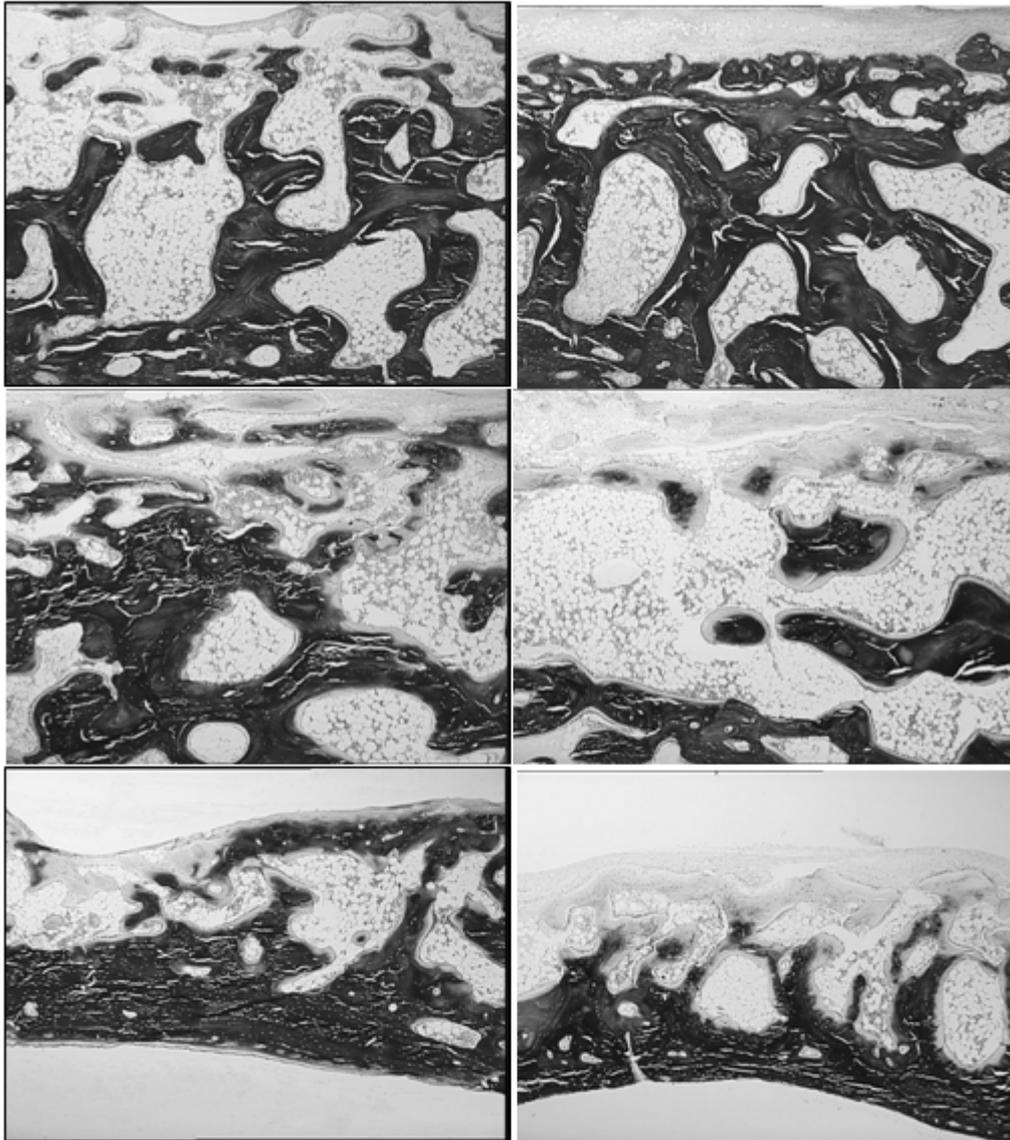
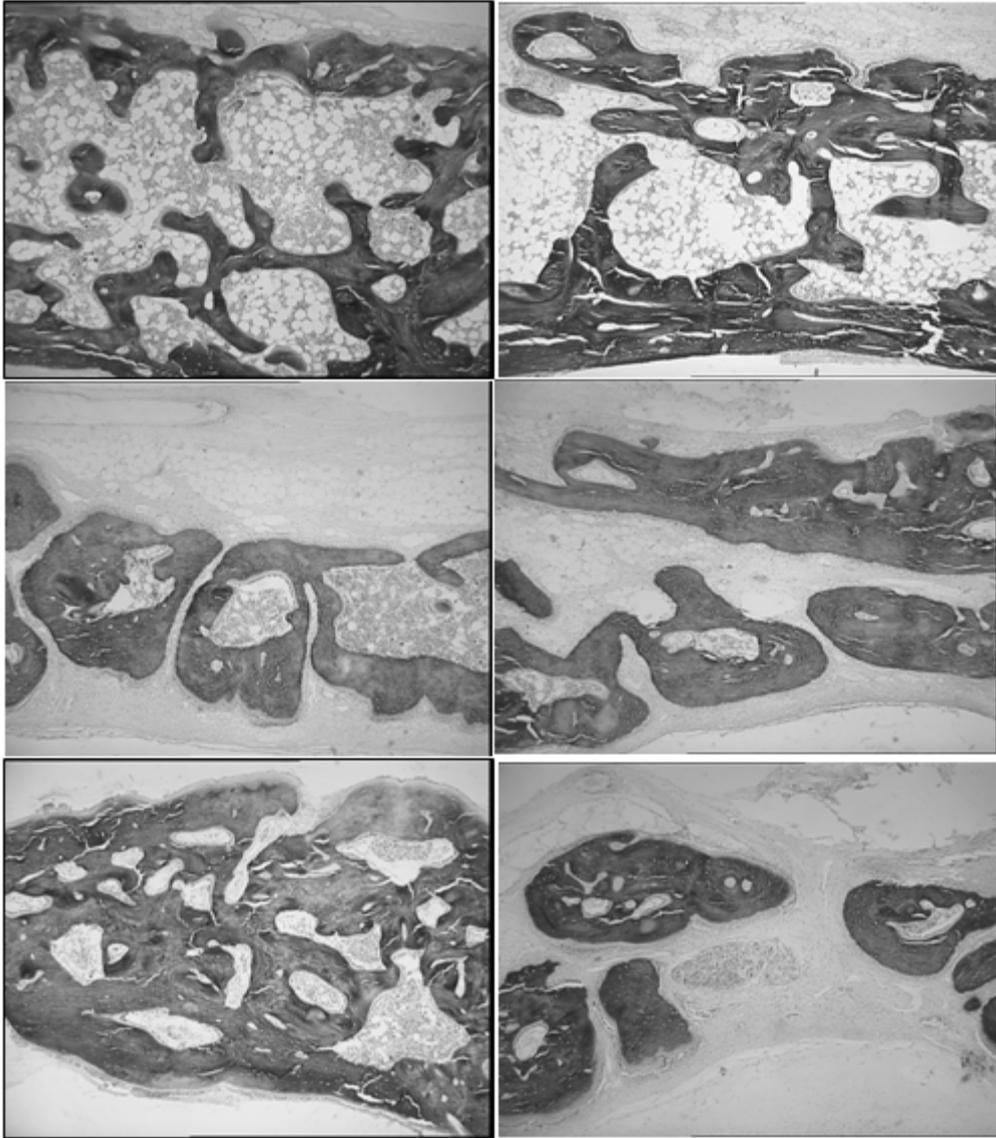


Fig. 16



**Fig. 17**

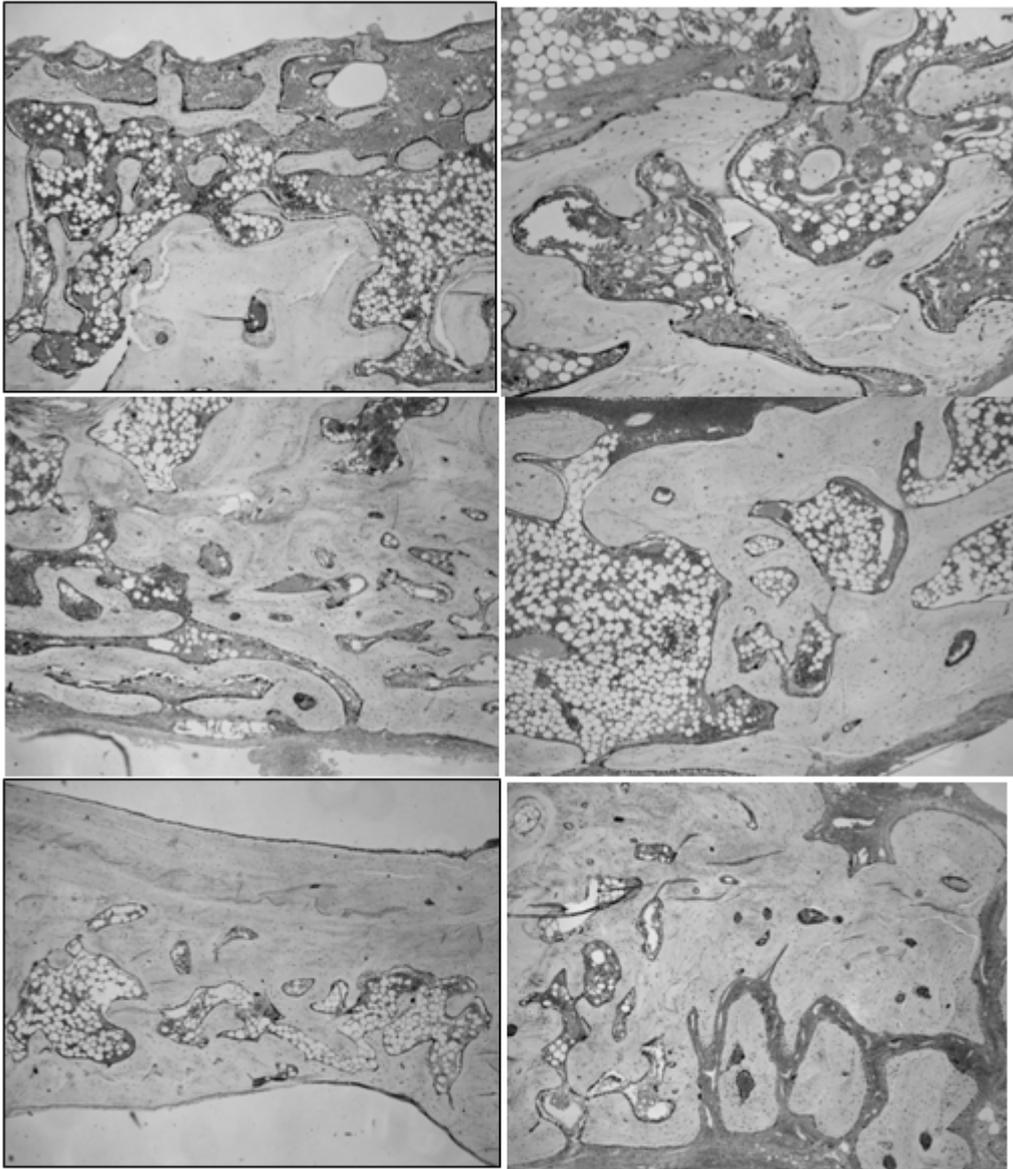
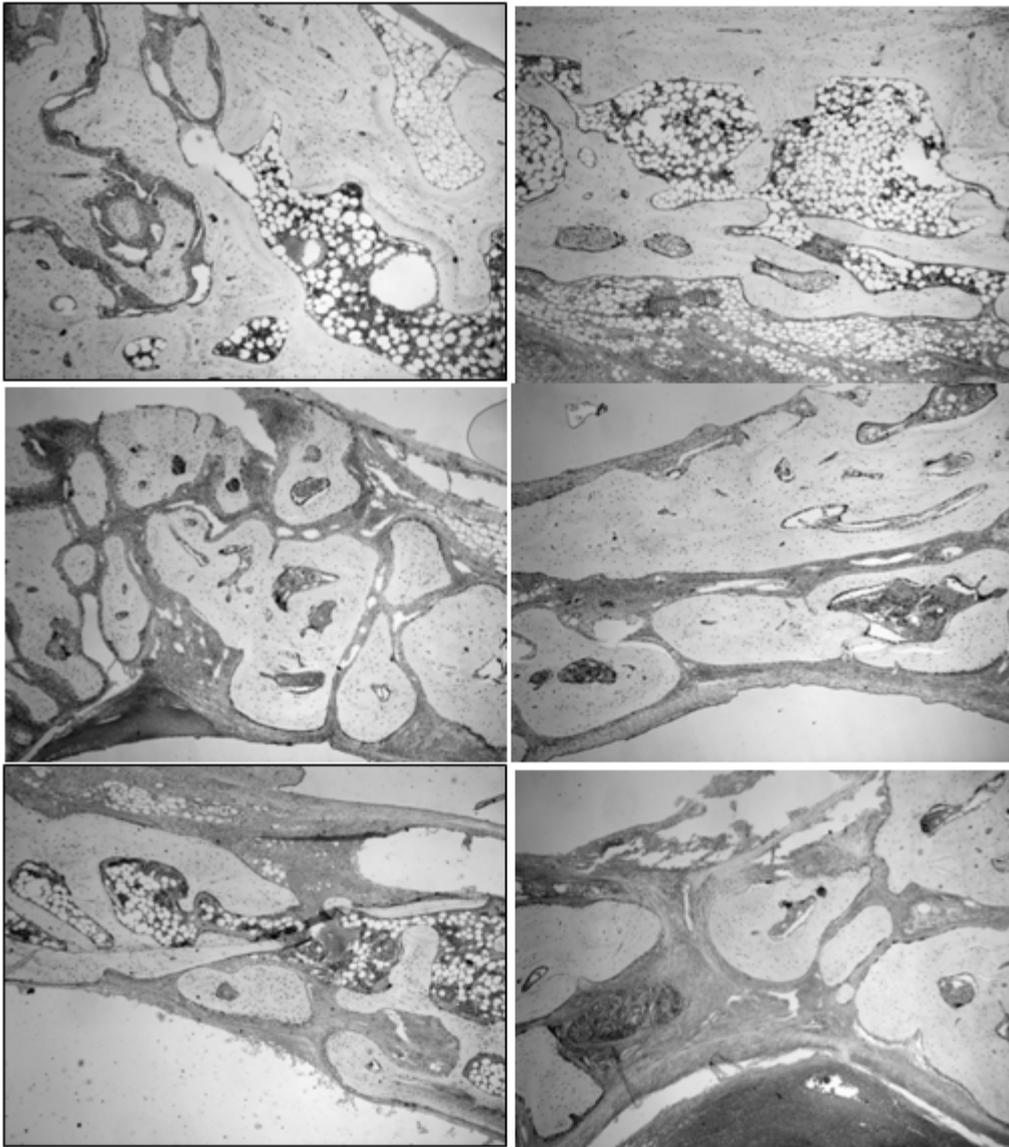
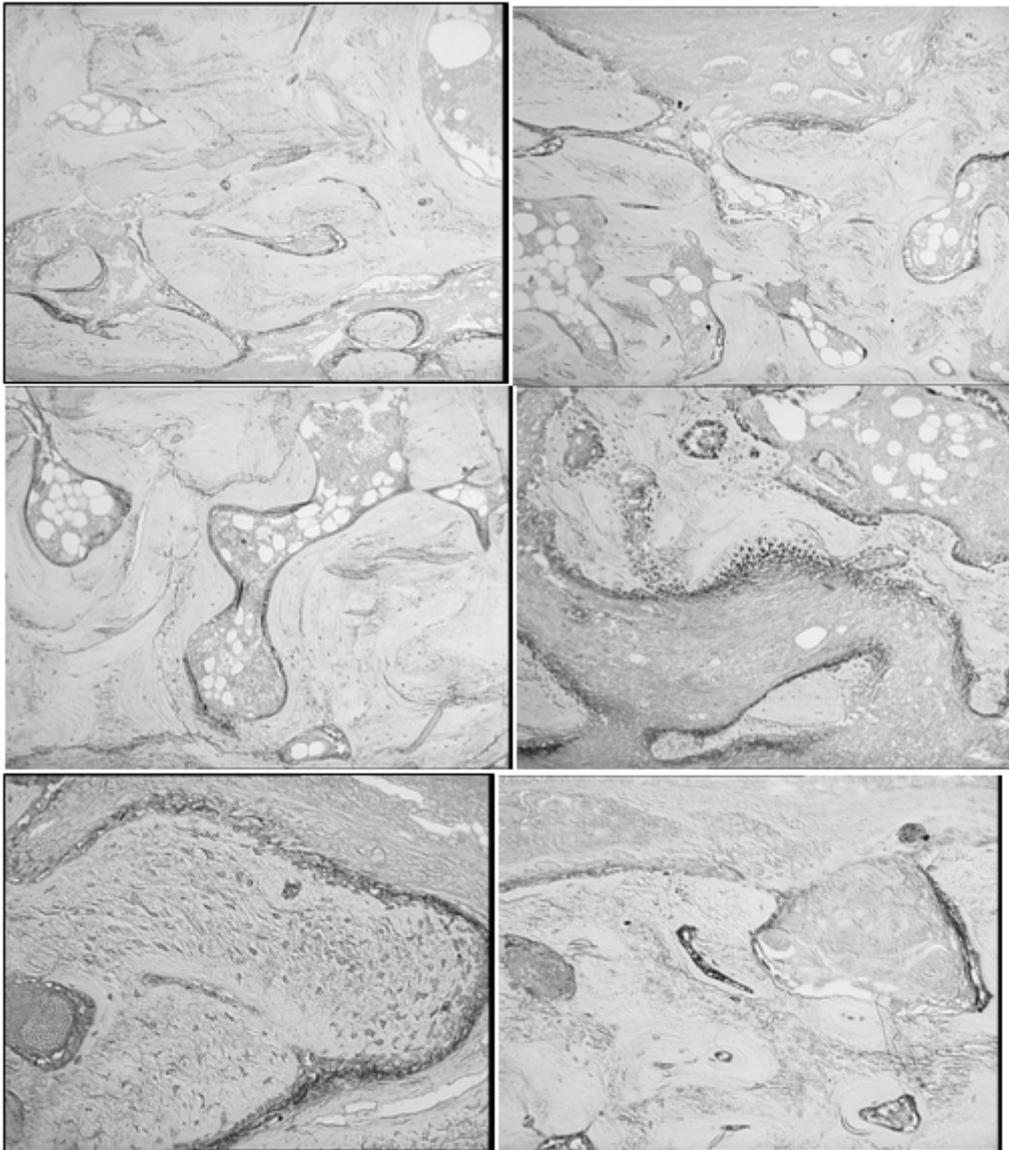


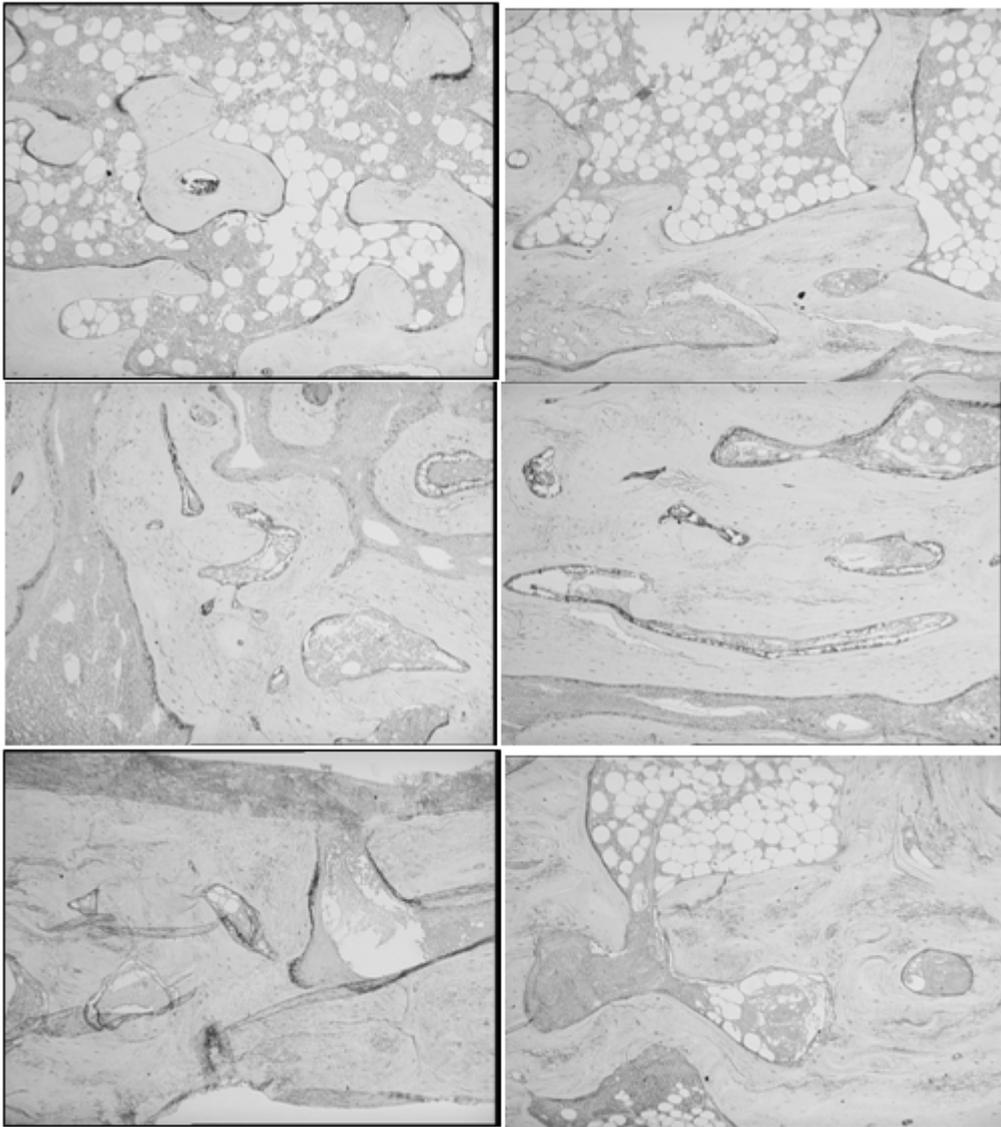
Fig. 18



**Fig. 19**



**Fig. 20**



**Fig. 21**

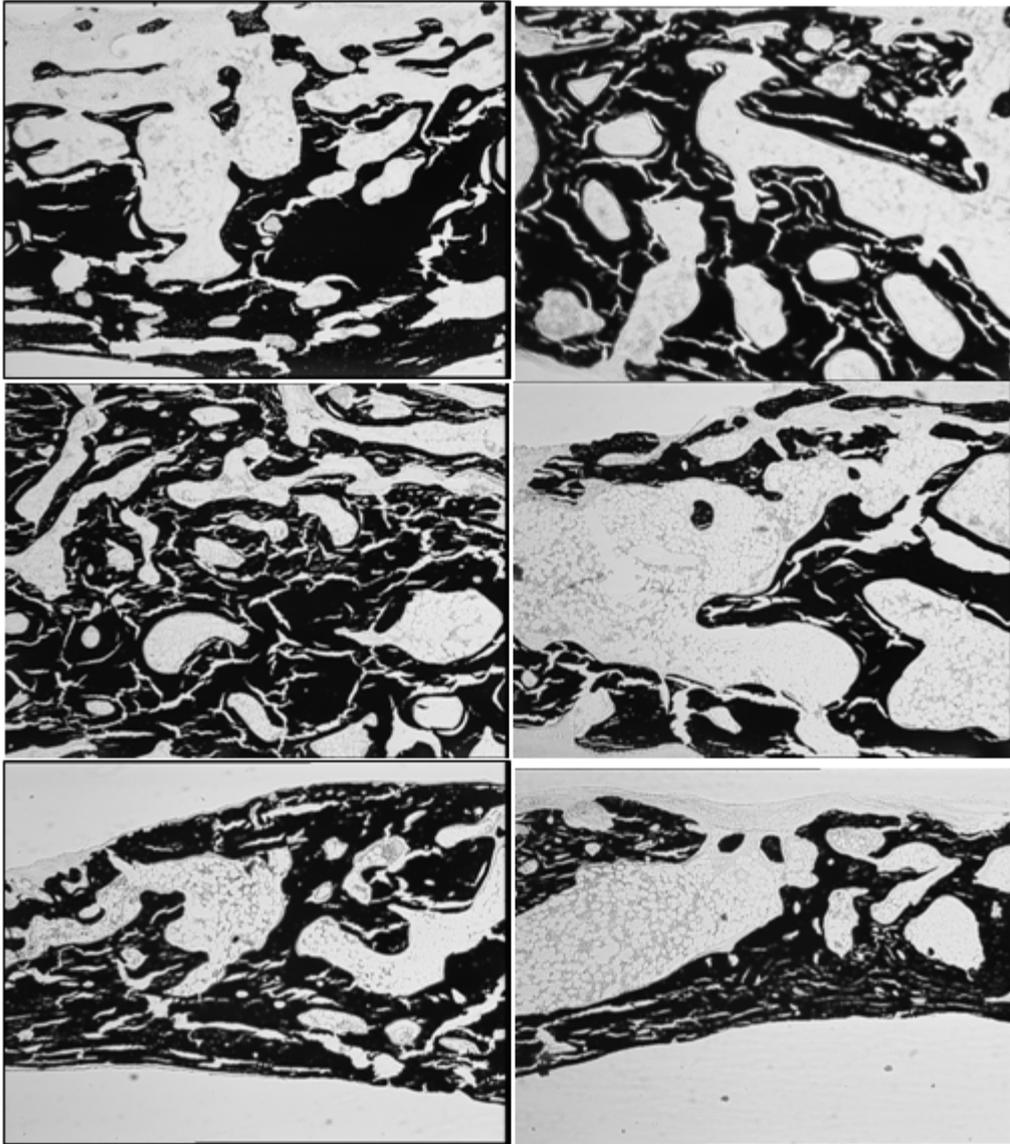


Fig. 22

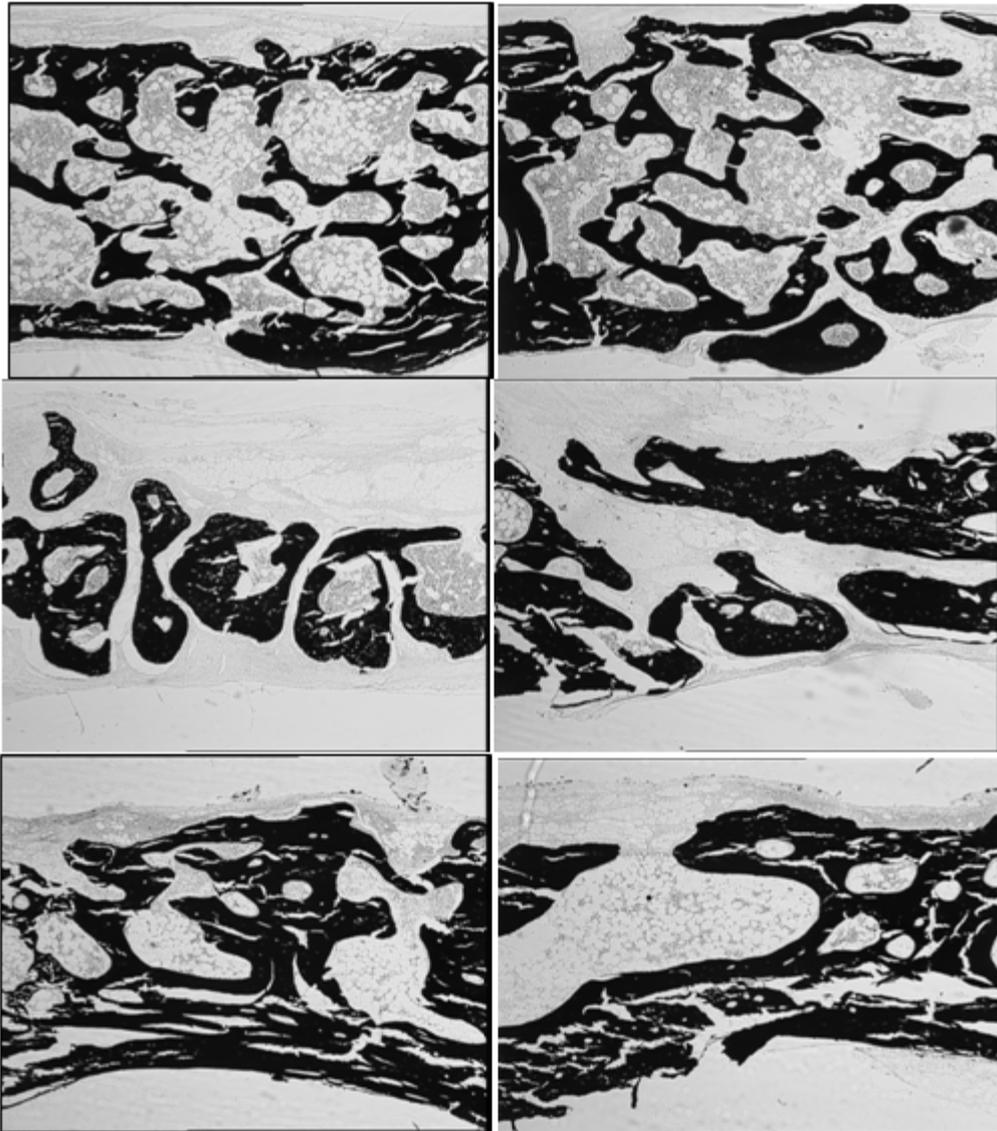


Fig. 23

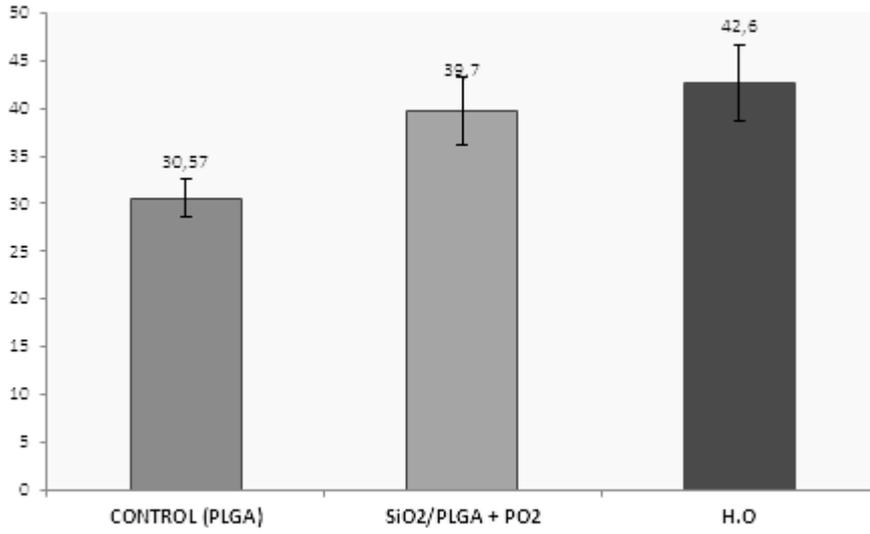


Fig. 24

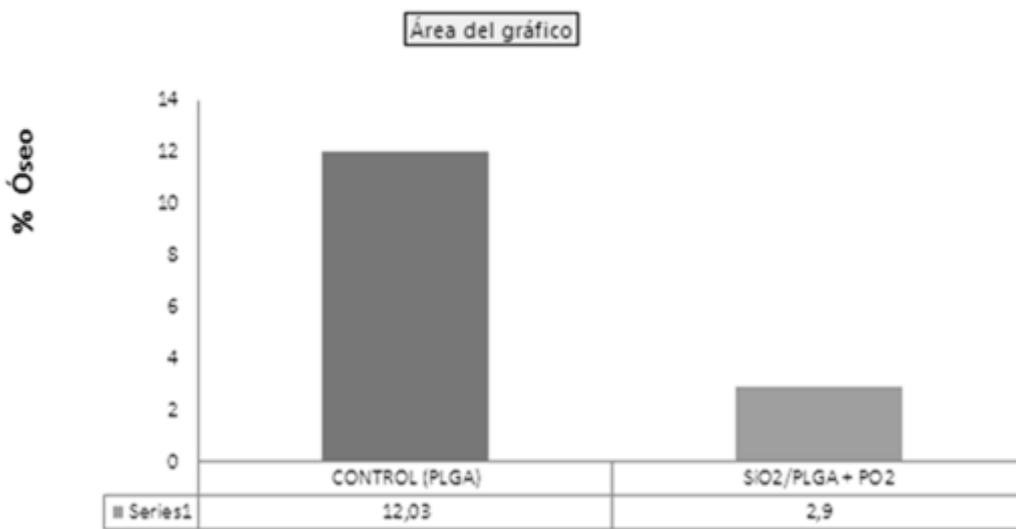


Fig. 25

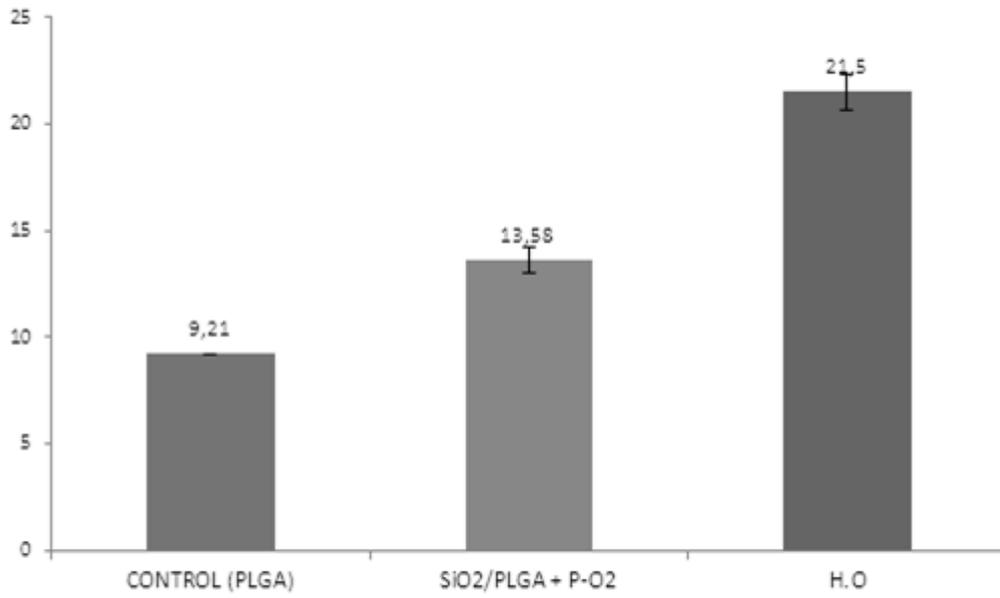


Fig. 26

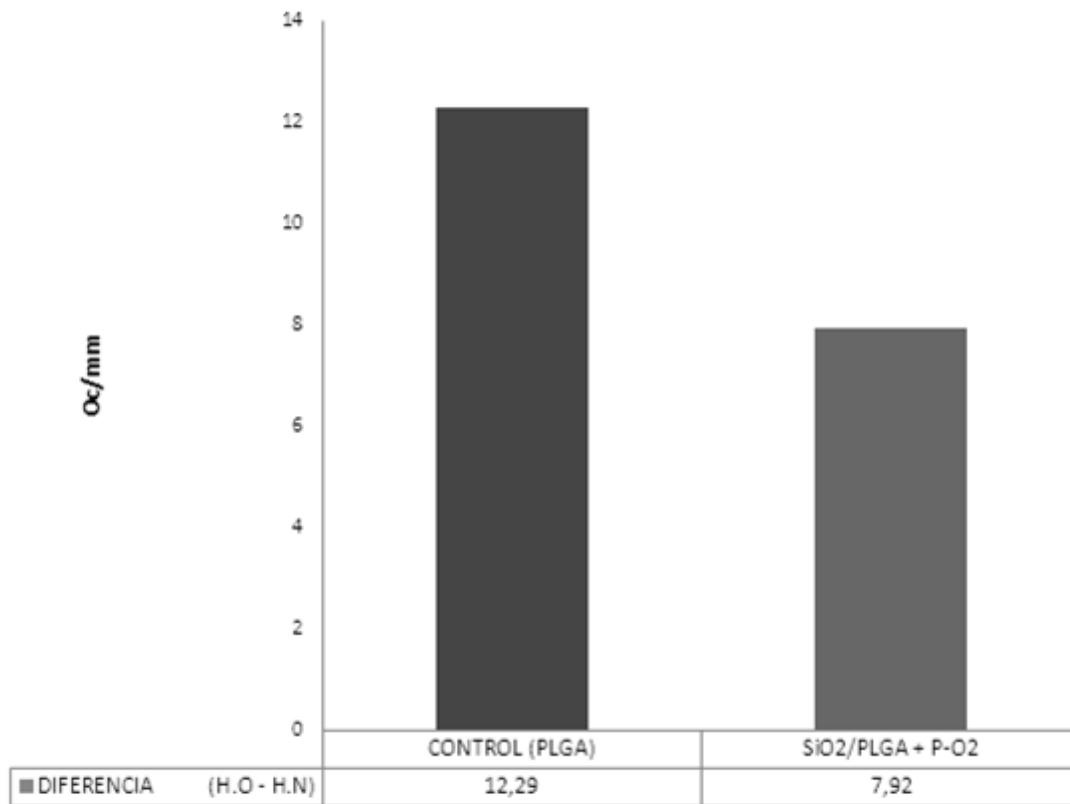


Fig. 27

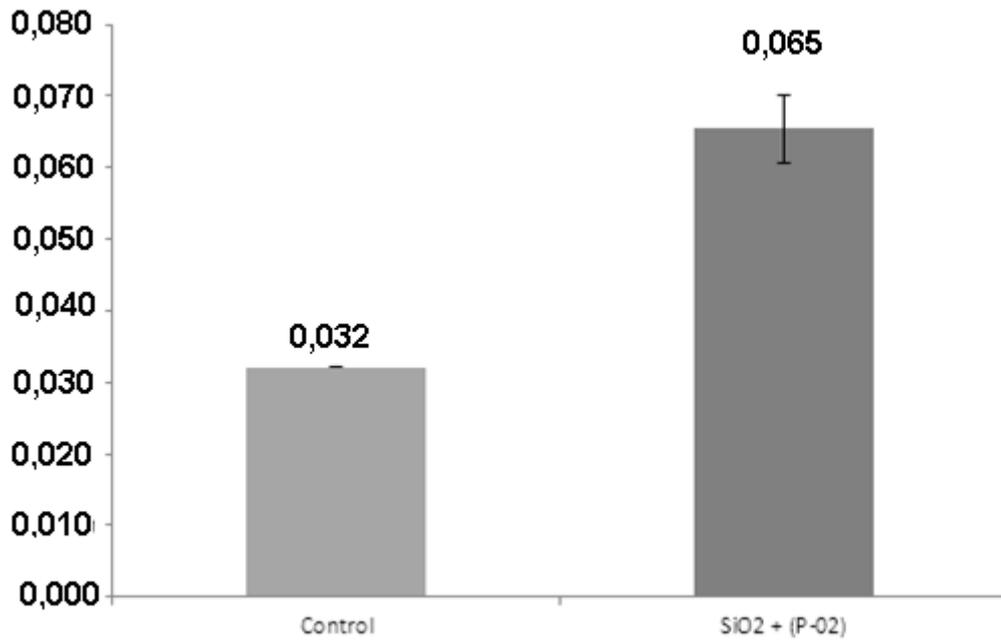


Fig. 28

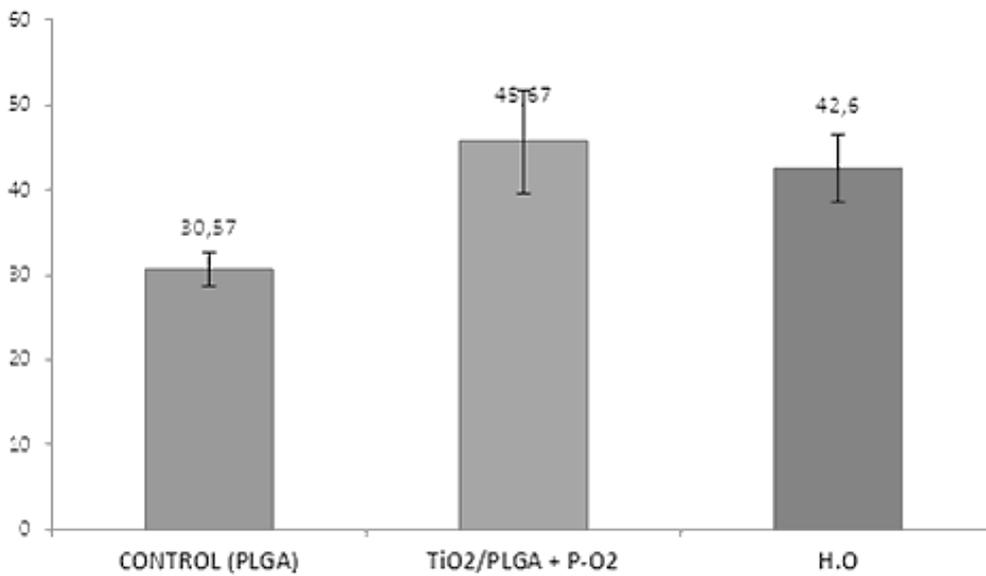


Fig. 29

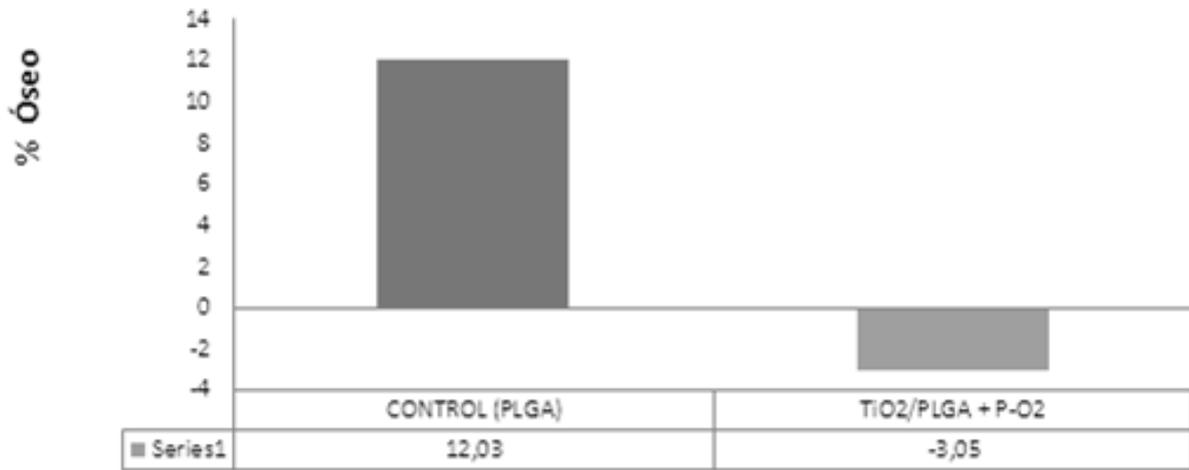


Fig. 30

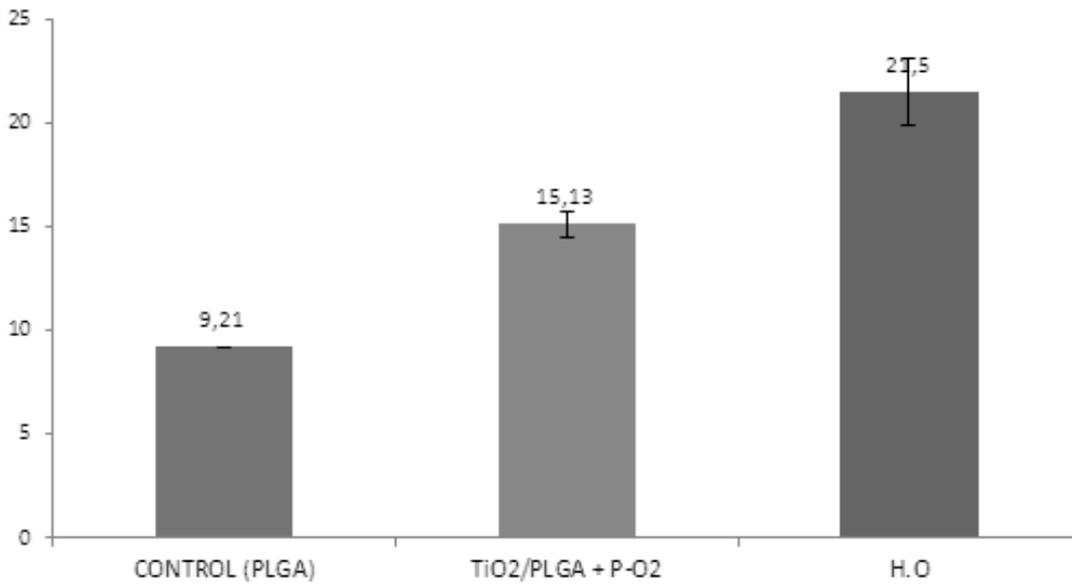


Fig. 31

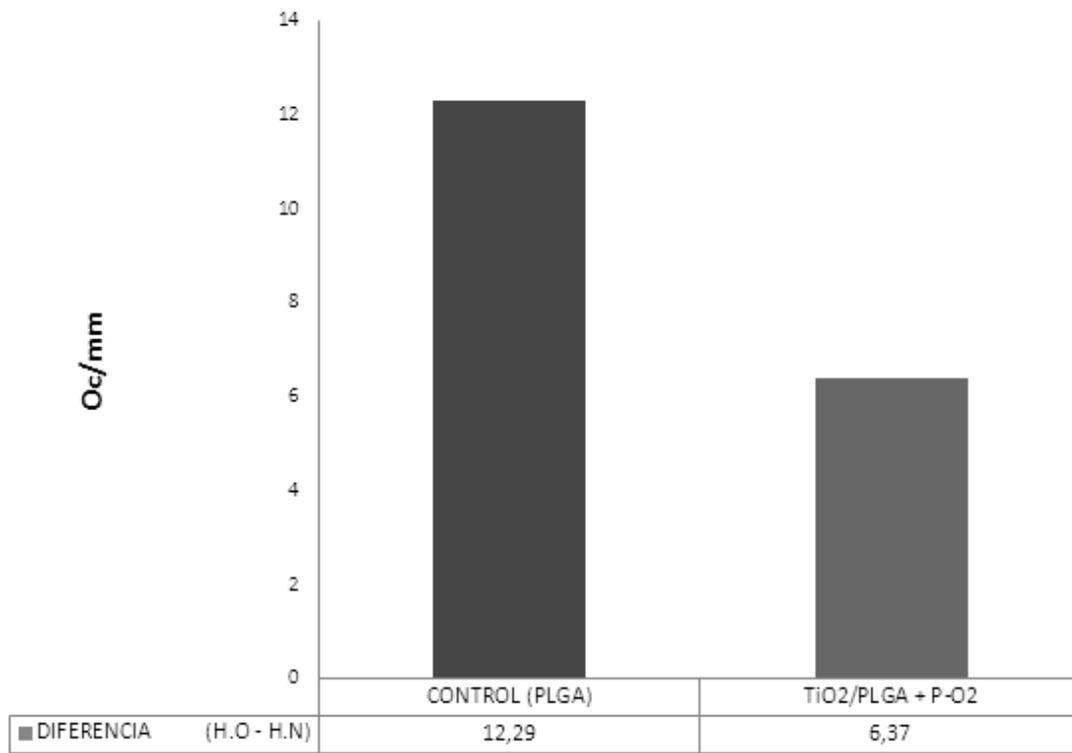


Fig. 32

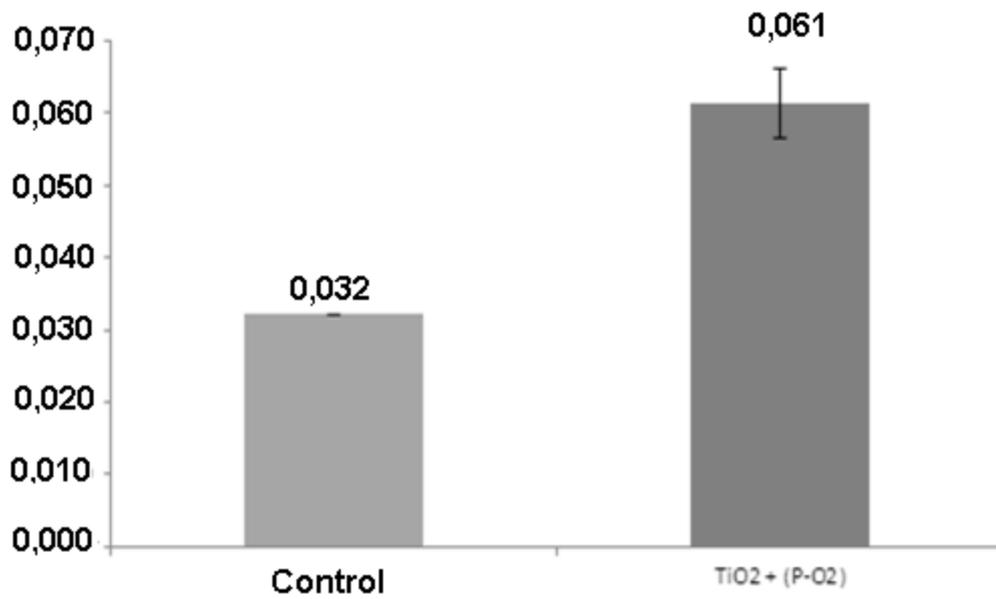


Fig. 33

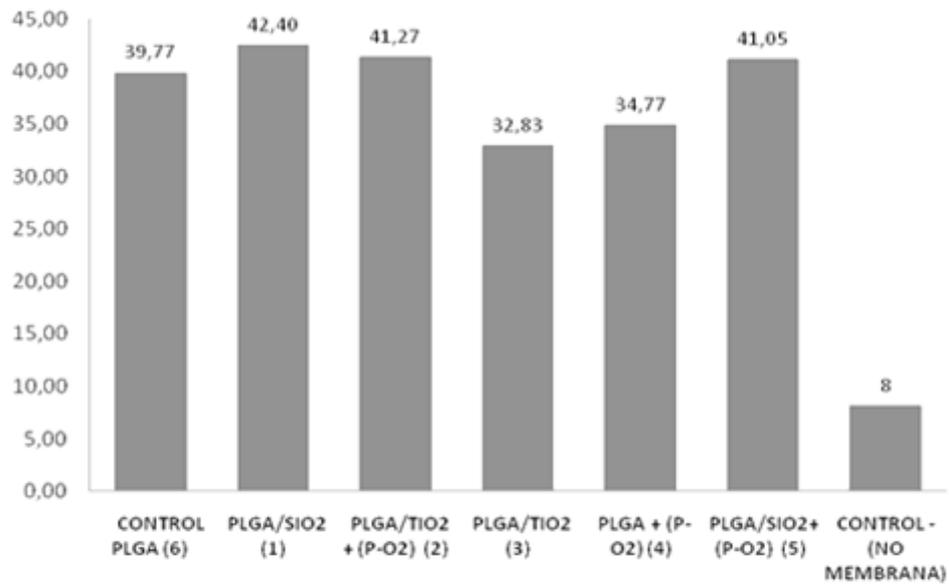


Fig. 34

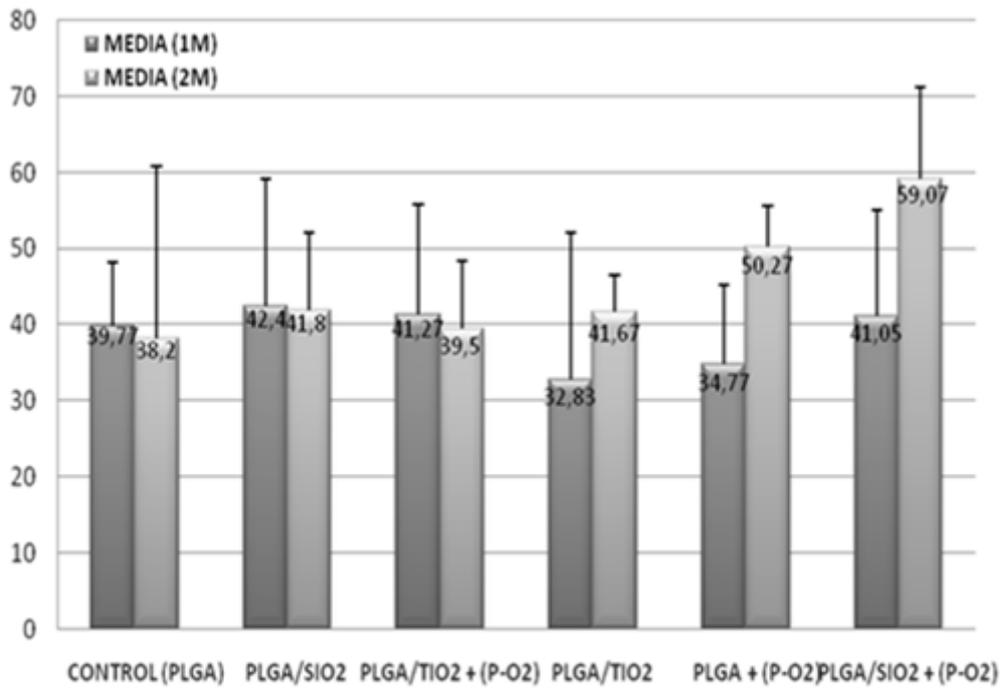


Fig. 35

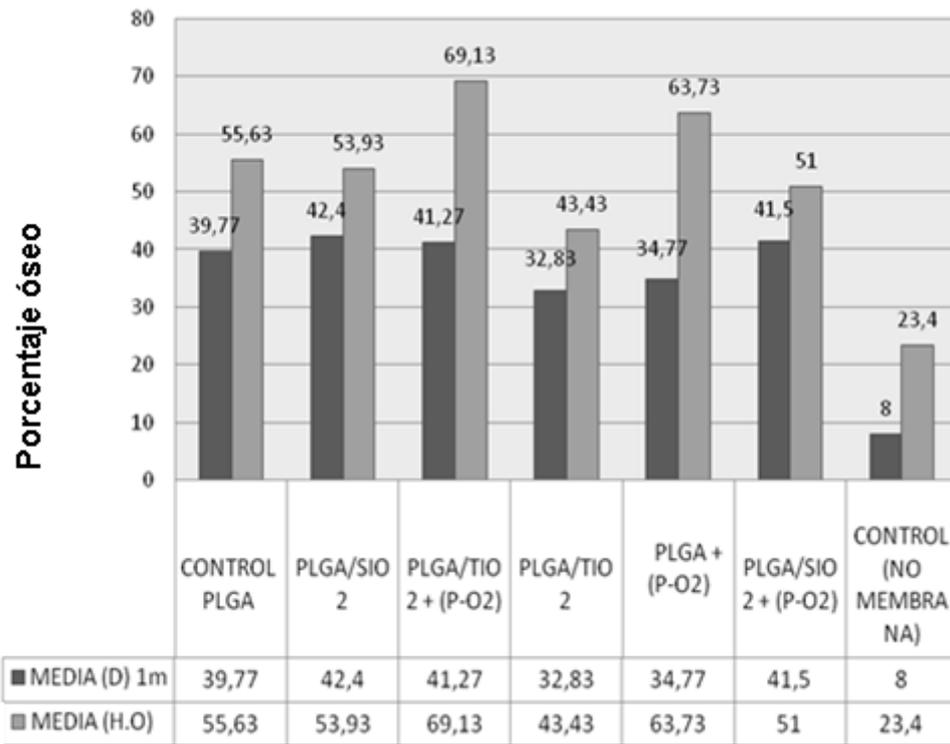


Fig. 36

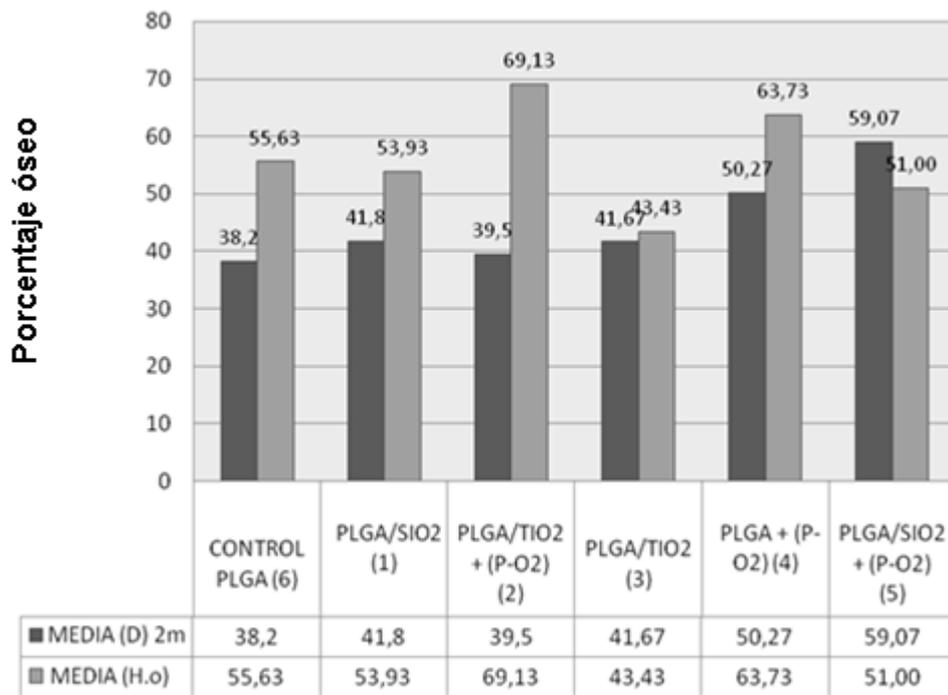


Fig. 37

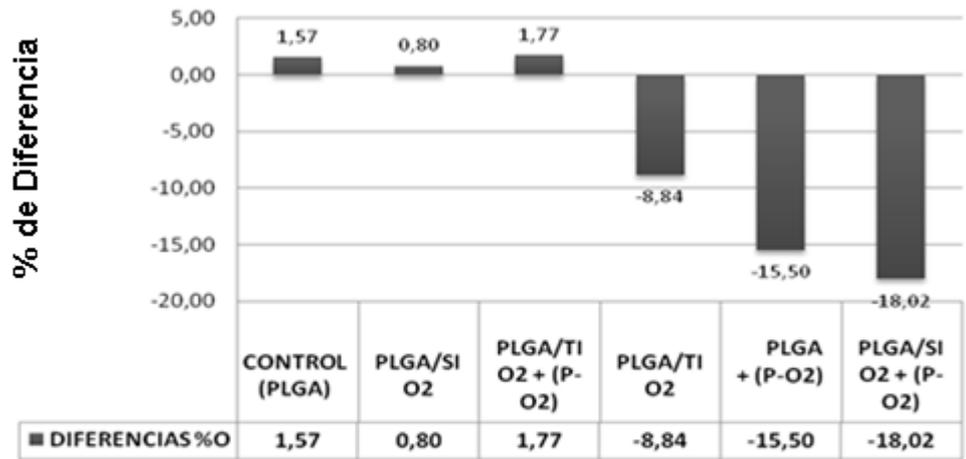


Fig. 38

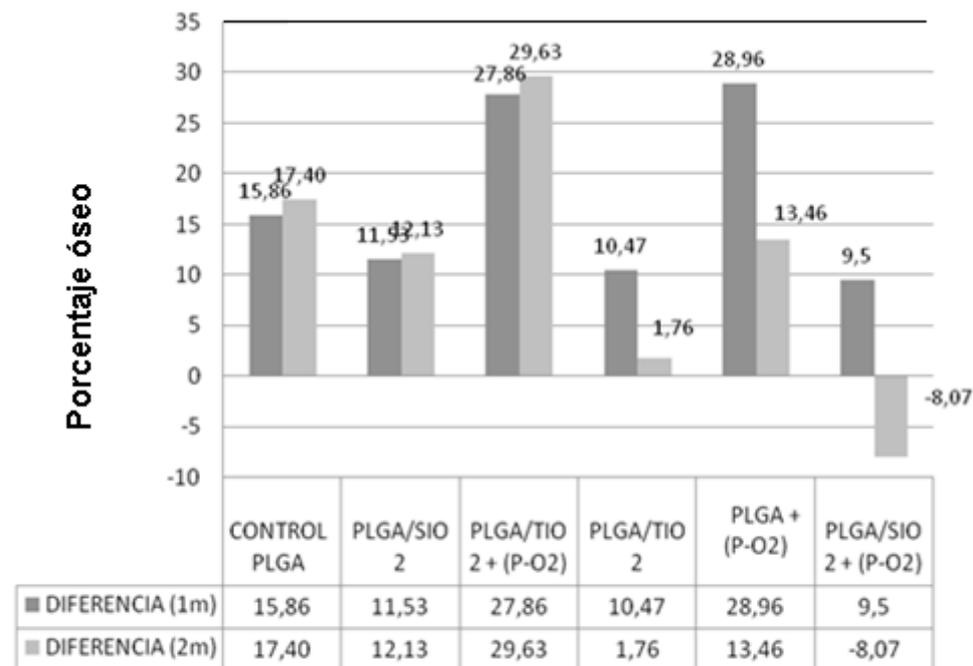


Fig. 39

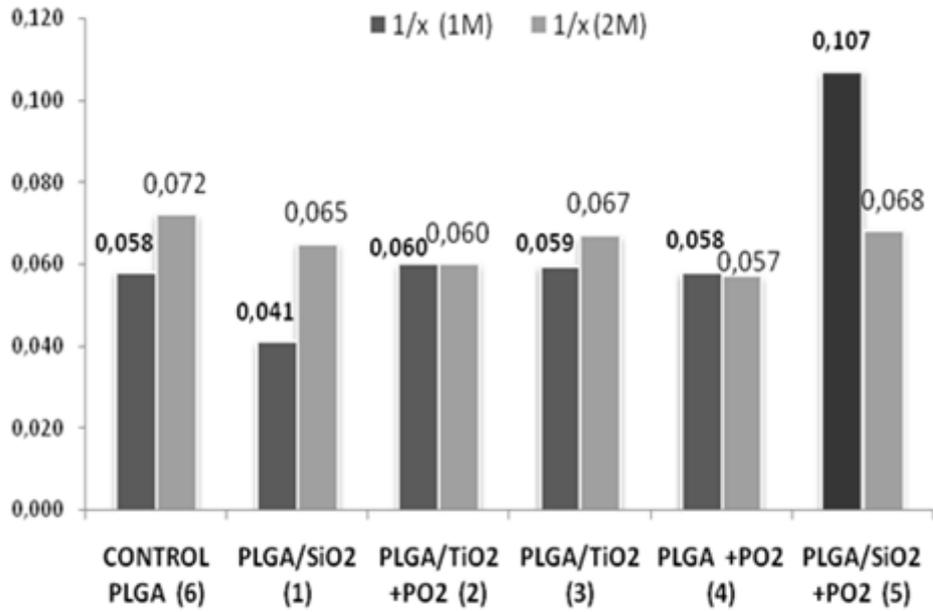


Fig. 40

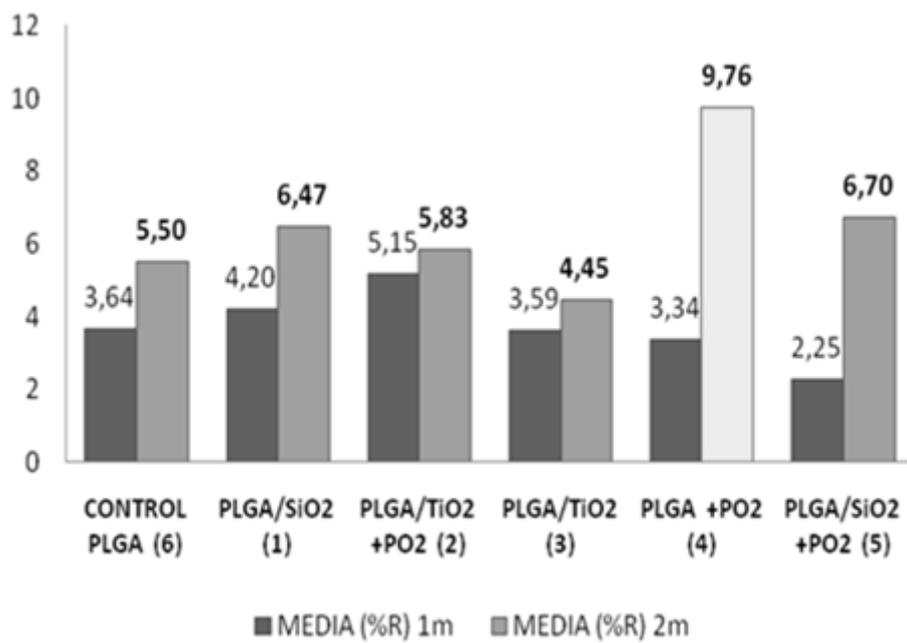


Fig. 41

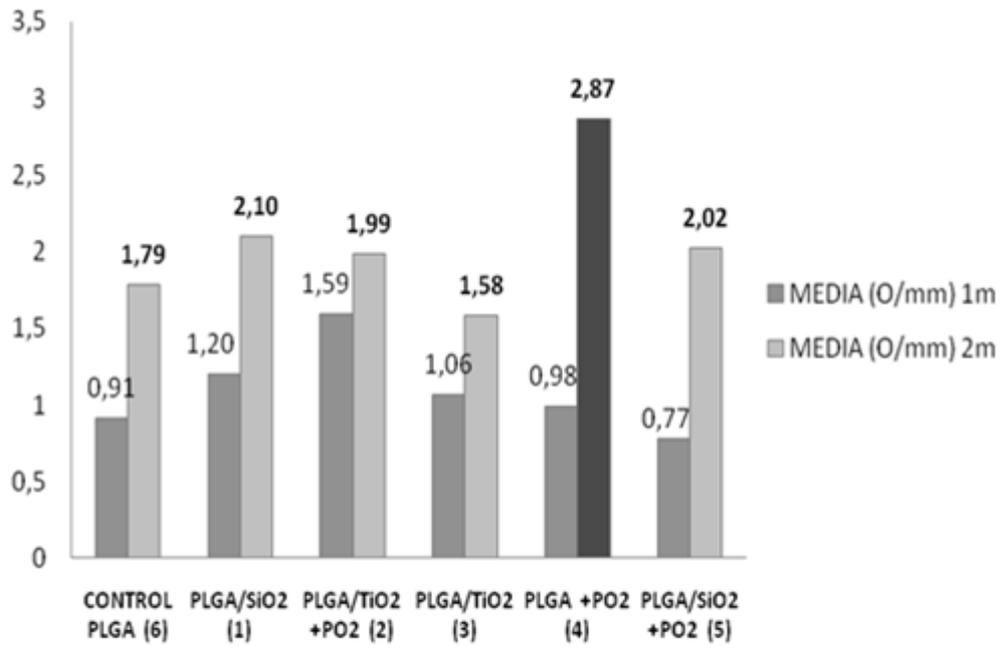


Fig. 42