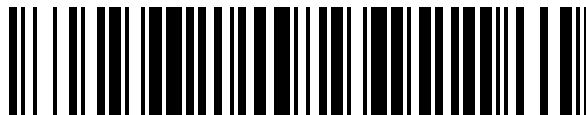


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 286 510**

21 Número de solicitud: 202132549

51 Int. Cl.:

A61C 8/00

(2006.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

28.12.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.02.2022

71 Solicitantes:

**ASOCIACION DE INVESTIGACION DE LA
INDUSTRIA TEXTIL (AITEX) (100.0%)**

**Plaza Emilio Sala, 1
03801 Alcoy (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**BLANES COMPANY, María;
PASCUAL MIRÓ, Carlos y
MARCO BARRACHINA, Bruno**

74 Agente/Representante:

TOLEDO ALARCÓN, Eva

54 Título: **DISPOSITIVO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL**

ES 1 286 510 U

DESCRIPCIÓN

DISPOSITIVO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

SECTOR DE LA TÉCNICA

5

La presente invención se refiere a un dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, tal como la gingivitis o la periodontitis, que posibilita la regeneración del hueso y la encía.

10

Para lograr este propósito, el dispositivo propuesto se configura como un implante dental, integrado por un núcleo poroso obtenido preferentemente por bioimpresión tridimensional, de forma que las distintas caras del núcleo poroso se cubren con capas de velo de nanofibras aditivadas con compuestos que promueven la regeneración tisular, ósea y la desinfección de la zona a tratar.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

La enfermedad periodontal es una patología dental que afecta al conjunto del hueso, el diente, la encía y los ligamentos periodontales. En su fase leve se denomina gingivitis, y en la segunda fase de la enfermedad, periodontitis. Estas patologías pueden causar la pérdida de dientes y otros problemas relacionados.

25

El tratamiento convencional de la enfermedad periodontal puede incluir la cirugía (mediante la regeneración tisular guiada, comúnmente conocida por sus siglas en inglés como GTR) para eliminar la infección de las encías y reconstruir los soportes de los dientes. La técnica GTR consiste básicamente en restaurar el hueso, el cemento y el ligamento periodontal a sus niveles originales. Quirúrgicamente, consiste en levantar el colgajo de la encía y rellenar la zona afectada con un injerto óseo, para posteriormente aplicar una membrana biocompatible (reabsorbible o no reabsorbible), que funciona como barrera para aislar y proteger el defecto óseo. Finalmente, se sutura la barrera y el colgajo. Si se coloca una membrana no reabsorbible, hay que volver a intervenir al cabo de 4-6 semanas para retirarla.

30

35

Otro de los inconvenientes asociados a las técnicas conocidas, tal como GTR son las infecciones, problema muy común debido a la proliferación de bacterias en la zona del

tratamiento.

Por tanto, las técnicas conocidas para el tratamiento de la enfermedad periodontal requieren de un proceso quirúrgico invasivo, siendo incluso necesario realizar dos intervenciones para retirar los productos no absorbibles por la encía o el diente, y llevan asociados molestos efectos secundarios tal como las infecciones.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El dispositivo de la presente invención permite solventar la problemática anteriormente expuesta, ofreciendo una solución de tratamiento que permite la regeneración del hueso alveolar, los ligamentos periodontales y la encía de la zona del diente afectada por la enfermedad periodontal, empleando para ello incluso las células del propio paciente, evitando cualquier tipo de rechazo del dispositivo por parte del organismo del paciente.

Para lograr este propósito, el dispositivo propuesto se configura como un implante dental, integrado por un núcleo poroso, obtenido preferentemente por bioimpresión 3D (tridimensional), donde el núcleo poroso presenta al menos tres caras, cada una de ellas cubierta con un velo de nanofibras aditivado con distintas sustancias en función de la zona del diente a tratar. Dicho núcleo sirve de relleno y soporte de la zona afectada, y al ser poroso está vascularizado, lo que le permite albergar nuevos ligamentos periodontales en su interior. Asimismo, el núcleo poroso ofrece un diseño específico para rellenar el defecto periodontal, permitiendo además del crecimiento de nuevo ligamento periodontal en su interior, la regeneración del hueso y la encía.

El dispositivo de la invención permite por tanto la regeneración de cada uno de los elementos afectados por la enfermedad periodontal (hueso, diente y ligamento periodontal) de forma individualizada y controlada. Adicionalmente, el dispositivo que se preconiza dota a la zona de la encía de un carácter antibacteriano para evitar infecciones; mediante la liberación controlada de aditivos presentes en las nanofibras y, opcionalmente, en el núcleo poroso, que, además de rellenar el hueco del defecto causado por la enfermedad, permitirá el crecimiento de un nuevo ligamento periodontal en su interior.

Como se ha mencionado anteriormente, el núcleo poroso está obtenido preferentemente por

bioimpresión 3D o cualquier otra técnica de fabricación aditiva, empleando para ello una mezcla de un biopolímero o copolímero de DL-PLG o PLGA.

5 El DL-PLG (siglas de 50:50 Poly (DL-lactide-co-glycolide, lo que se traduce como copolímero en proporción 50:50 de ácido glicólico y ácido láctico) es un copolímero de ácido láctico y ácido poliglicólico terminado en un grupo éster, de base biológica y biodegradable. Los polímeros de PLG (ácido poliglicólico) son biodegradables, biocompatibles, no inmunogénicos y con perfiles de liberación controlables que van desde varias semanas a meses.

10

Por otra parte, las siglas PLGA se refieren a (poli (ácido láctico-co-glicólico)).

15

De este modo, en el proceso de bioimpresión 3D se obtiene un núcleo poroso que presenta de forma preferente una densidad de relleno entre un 10% biocompatible y el 60%, y más preferentemente del 40%. La densidad de relleno o 'infill' se refiere a la estructura interna de la pieza impresa en 3D, es decir, se refiere a la cantidad de material que se utiliza para rellenar las piezas impresas.

20

Opcionalmente, el núcleo poroso está aditivado con sales de calcio, factores de crecimiento o incluso células humanas.

25

Se obtiene por tanto un núcleo poroso bioabsorbible y biodegradable, por lo que no es necesario volver a intervenir al paciente tras su colocación para retirar el dispositivo de la invención.

30

Ventajosamente la impresión 3D del núcleo poroso permite, por un lado, personalizar su tamaño a las características específicas del paciente, adaptando el dispositivo a la morfología del hueco a tratar en la enfermedad bucal; y por otro lado, permite estandarizar los tamaños del dispositivo.

Pues bien, de acuerdo con la esencia de la invención, el núcleo poroso presenta, al menos, tres caras que se recubren con velos de nanofibras bioabsorbibles, los cuales permiten anclar el dispositivo al diente, a los ligamentos periodontales y a las encías.

- Los velos de nanofibras se obtienen de forma preferente a partir de soluciones poliméricas de DL-PLG, PLGA y/o gelatina, y, al menos, un disolvente, que se alimentan a un equipo de electrohilatura o *electrospinning*. Así, se obtienen velos o láminas muy porosas, con un gramaje preferente de 20 g/m² a 40 g/m², y más preferentemente de 27 g/m²; integrados por nanofibras con un diámetro preferente de 300 nm a 900 nm, y más preferentemente de 450 nm, capaces de liberar controladamente fármacos o aditivos. Es por ello que los velos de nanofibras se aditivan con diferentes sustancias según su ubicación sobre el núcleo poroso, para ofrecer diferentes funciones según la zona a tratar.
- Una primera cara del núcleo poroso, que entra en contacto con el hueso alveolar del diente, se cubre con un velo de nanofibras aditivado con hidroxiapatita (HA), que puede estar en forma de nanohidroxiapatita. Cabe precisar que el hueso alveolar es el hueso del maxilar o mandíbula que contiene o reviste las cuencas o alvéolos, en las que se mantienen las raíces de los dientes. Ventajosamente, la hidroxiapatita promueve la expresión más temprana de los genes implicados en el proceso de diferenciación de las células hDPSC (siglas de *Human Dental Pulp Stem Cells* o células madre de la pulpa dental) a osteoblastos. De esta forma, los osteoblastos generados permiten regenerar la parte de hueso alveolar afectada por la enfermedad.
- Preferentemente, el velo de nanofibras que cubre la primera cara del núcleo poroso se obtiene por electrohilatura a partir de una solución polimérica que presenta entre un 25% un 35% en peso de DL-PLG, un máximo de un 10% en peso de hidroxiapatita y DMF (dimetilformamida) y CH₃CN (acetonitrilo) como disolventes.
- La segunda cara del núcleo poroso se cubre con un velo de nanofibras aditivado con factor de crecimiento BMP-7 para el tratamiento del cemento dental y el ligamento periodontal, de forma que esta segunda cara se coloca en contacto con los ligamentos periodontales y la parte exterior del diente. El factor de crecimiento BMP-7 hace referencia a la Proteína Morfogénica Ósea 7, también denominada Proteína Osteogénica 1 (OP-1).
- Ventajosamente, el factor de crecimiento BMP-7 promueve la diferenciación de las células hPDLSC (siglas de *Human periodontal ligament stem cell* o células madre del ligamento periodontal) en cementoblastos para el tratamiento del cemento dental y promueve el crecimiento de nuevos ligamentos periodontales.

Preferentemente, el velo de nanofibras que cubre la segunda cara del núcleo poroso se obtiene por electrohilatura a partir solución polimérica que presenta entre un 25% y un 35% en peso de DL-PLG, un máximo de un 0,1 % en peso de BMP-7 y DMF y CH₃CN como disolventes.

5

Finalmente, una tercera cara del núcleo poroso que se coloca en contacto con la encía está cubierta con un velo de nanofibras con un aditivo antibacteriano. Así, de forma preferente, el velo de nanofibras que cubre la tercera cara del núcleo está con quitosano, para el tratamiento antibacteriano de la zona de cierre del colgajo de la encía.

10

Preferentemente, el velo de nanofibras que cubre la tercera cara del núcleo poroso se integra por una mezcla de dos soluciones, de forma que la primera solución es una solución polimérica que presenta entre un 15% y un 35% en peso de gelatina, y ácido acético y agua como disolventes, mientras que la segunda solución presenta entre un 1% y un 5% de quitosano, y ácido acético y agua como disolventes. Estas soluciones se mezclan en unas proporciones que van desde 3:7 a 9:1.

15

En una realización preferente de la invención, el quitosano empleado en el velo de nanofibras que cubre la tercera cara del núcleo poroso es quitosano de alto peso molecular.

20

Ventajosamente, la gelatina y el quitosano hacen que el velo de nanofibras presente una baja citotoxicidad, minimizando la adhesión-proliferación de células, evitando así infecciones, las cuales son un problema muy común en las intervenciones que emplean técnicas conocidas como la GTR.

25

En definitiva, el dispositivo para el tratamiento periodontal de la invención ofrece una solución que permite, por un lado, la liberación de fármacos y/o principios activos contenidos en los velos de nanofibras que cubren las distintas caras del núcleo poroso; y por otro, personalizar la morfología del dispositivo, ya que se podría incluso el defecto causado por la enfermedad periodontal y diseñar el núcleo poroso a la medida del paciente.

30

Así, la invención que se preconiza ofrece una alternativa óptima a los tratamientos conocidos, tal como las membranas sin aditivos que se utilizan actualmente, ya que ofrece

una estructura biodegradable y bioabsorbible que permite el desarrollo celular en cada una de sus caras y la generación de nuevos ligamentos periodontales en su interior.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que seguidamente se va a realizar y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de planos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1.- Muestra un esquema del núcleo poroso del dispositivo para el tratamiento periodontal de acuerdo con una realización preferente de la invención.

La figura 2.- Muestra un esquema del tratamiento de la enfermedad periodontal mediante el dispositivo de la presente invención de acuerdo con la realización preferente ilustrada en la figura 1.

La figura 3.- Muestra los resultados de un ensayo de histología practicado sobre el dispositivo de la figura 1, donde se observa el crecimiento de células hPDLSC y células hDPSC.

La figura 4.- Muestra una representación gráfica de un ensayo de la adhesión y proliferación de células hDPSC sobre el velo de nanofibras con HA, en la que se ilustra la variación de la densidad celular (expresada como células/cm² de muestra) con el tiempo de cultivo (expresado en horas).

La figura 5.- Muestra una representación gráfica de un ensayo de la adhesión y proliferación de células hPDLSC sobre el velo de nanofibras con BMP-7, en la que se ilustra la variación de la densidad celular (expresada como células/cm² de muestra) con el tiempo de cultivo (expresado en horas).

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

A la vista de las figuras reseñadas, puede observarse cómo de acuerdo con una realización preferente de la invención, el dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal se configura a modo de implante dental para su disposición en el hueco generado en la cavidad bucal por la enfermedad periodontal, en contacto con el diente (8) y las zonas afectadas.

Así, el dispositivo presenta un núcleo poroso (7) de un copolímero de DL-PLG o PLGA provisto de tres caras, de forma que la primera cara (1) se dispone en contacto con el hueso alveolar (4), y está cubierta con un velo de nanofibras aditivado con HA.

Concretamente, el velo de nanofibras que cubre la primera cara (1) del núcleo poroso (7) se integra por una solución polimérica que se alimenta a un equipo de electrohilatura, que en una realización preferente de la invención presenta un 30% en peso de DL-PLG, un 4% en peso de HA y DMF y CH₃CN como disolventes.

Por otra parte, la segunda cara (2) del núcleo poroso (7), que se coloca en contacto con los ligamentos periodontales (5) y la parte exterior del diente (8), está cubierta con un velo de nanofibras aditivado con factor de crecimiento BMP-7. Este velo de nanofibras que cubre la segunda cara (2) se integra por una solución polimérica que se alimenta a un equipo de electrohilatura, donde la solución polimérica presenta un 30% en peso de DL-PLG, un 0,001% en peso de BMP-7 y DMF y CH₃CN como disolventes.

Por último, la tercera cara (3) del núcleo poroso (7) que se coloca en contacto con la encía (6) está cubierta con un velo de nanofibras que presenta gelatina y un aditivo antibacteriano, concretamente, quitosano de alto peso molecular. Este velo de nanofibras que cubre la tercera cara (3) se integra por una solución mezcla de dos soluciones en una proporción 8:2, donde la primera solución es una solución polimérica que presenta un 22% en peso de gelatina, y ácido acético y agua como disolventes, mientras que la segunda solución presenta un 2% en peso de quitosano de alto peso molecular y ácido acético y agua como disolventes. Cabe precisar que el quitosano de alto peso molecular empleado presenta un peso molecular medio de 1.500.00 g/mol.

Así, tal y como se ha detallado anteriormente, el dispositivo de la invención resulta totalmente personalizable y bioabsorbible, y permite regenerar las zonas del diente (8)

afectadas utilizando incluso las mismas células del propio paciente (para evitar así cualquier tipo de rechazo), gracias a sus propiedades biomiméticas (con capacidad de liberación de activos específicos y selectivos para cada zona a tratar) para la resolución de lesiones de tejidos vivos, tal como las lesiones ocasionadas por la enfermedad periodontal.

5

Todo ello hace del dispositivo de la invención una alternativa óptima para la sustitución de las actuales membranas de colágeno sin aditivos utilizadas para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

- 10 Sobre la realización preferente anteriormente descrita se llevaron a cabo ensayos de 'Bioburden' (ensayo para determinar la población microbiana de una muestra), ensayos de citotoxicidad y ensayos de esterilidad, los cuales evidencian que el dispositivo de la invención es un producto sin carga biológica, con calidad sanitaria, estéril y sin toxicidad celular. Es decir, un producto no tóxico apto para el uso en el ámbito sanitario.

15

Se realiza el ensayo de citotoxicidad según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 (Citotoxicidad), siendo el resultado del mismo una viabilidad celular del 90,56%, lo que evidencia que el dispositivo no presenta efecto citotóxico para ninguno de sus componentes. Cabe destacar que el requisito que establece la citada norma UNE para considerar que no existe citotoxicidad es que la viabilidad celular sea mayor del 70%. Precisar que la viabilidad celular es un parámetro que permite evaluar si un cultivo presenta la funcionalidad adecuada para su uso en terapia regenerativa e ingeniería tisular, y se expresa como el porcentaje de células vivas y funcionales sobre el total de células presentes en un cultivo.

20

- 25 El ensayo de 'Bioburden' se realiza de acuerdo a la norma UNE-EN 13795:2011+A1:2013, mostrando una limpieza microbiana de 160 cfu/100 cm², valor claramente inferior al exigido por la citada norma, que establece un requisito de ≤ 300 cfu /100 cm², lo que evidencia la ausencia de carga biológica.

- 30 Finalmente, destacar que el dispositivo de la invención es esterilizable mediante radiación e-beam de acuerdo a la norma European Pharmacopeia 9,0 (Esterilidad). Así, los valores obtenidos tras practicar el ensayo de esterilidad de acuerdo a la citada norma muestran que no hay crecimiento de bacterias a 33 ± 2 °C en un medio de cultivo THIO (siglas de *Thioglycollate medium* o caldo de tioglicolato), así como que no hay crecimiento de mohos y

levaduras a 22 ± 2 °C en un medio de cultivo TSB (siglas de *Tryptone Soy Broth* o caldo de Triptona y Soja).

Adicionalmente, se practicaron histologías sobre la realización preferente de la invención en la que el núcleo poroso (7) está recubierto por un velo de nanofibras aditivado con HA por una cara (1) y un velo de nanofibras aditivado con BMP-7 por otra cara (2).

Para ello, se sembraron células hPDLSC sobre el velo aditivado con BMP-7 de la segunda cara (2) y células hDPSC sobre el velo aditivado con HA de la primera cara (1), sobre dos grupos de muestras diferentes durante tres días: un grupo de muestras cultivado en medio de proliferación y el otro grupo cultivado en un medio que induce la diferenciación celular. El medio de proliferación promueve el crecimiento y la división celular, de modo que el tamaño medio de las células permanezca constante en la población; mientras que el medio de diferenciación celular promueve que las células cambien su estructura (mediante modificaciones en su expresión génica) de manera que puedan realizar una función específica (adquiriendo la morfología, funciones de un tipo celular específico y diferente al resto de tipos celulares del organismo).

Así, en la figura 3 se muestran los resultados de las histologías, donde la figura 3.1 muestra las células hPDLSC en medio de proliferación, la figura 3.2 muestra las células hDPSC en medio de proliferación, la figura 3.3. muestra las células hPDLSC en medio de diferenciación, y la figura 3.4 muestra las células hDPSC en medio de diferenciación.

Tal y como se observa en las figuras 3.1 y 3.3, las células hPDLSC muestran una morfología elongada tanto en medio de proliferación (fig. 3.1) como en medio de diferenciación (fig. 3.3), hecho no observable en velos de nanofibras de PLG sin aditivos. Por tanto, queda evidenciado que la HA presente en el velo de nanofibras induce a la diferenciación de las células en osteoblastos, sin precisar para ello de un medio de diferenciación. Es decir, la HA promueve la diferenciación celular independientemente del medio en el que se disponga el velo de nanofibras.

Por otra parte, tal y como se observa en las figuras 3.2 y 3.4, la HA favorece la diferenciación de las células hDPSC, y por tanto, disminuye su proliferación. Este hecho está indicando que las células hDPSC están empezando a entrar en la vía de diferenciación

hacia osteoblastos, lo que ralentiza su velocidad de proliferación y modifica su tamaño. Al diferenciarse dejan de proliferar al mismo ritmo dada su elevada confluencia.

5 De manera adicional a los ensayos practicados sobre el dispositivo en su conjunto, los ensayos practicados sobre los distintos velos de nanofibras que cubren el núcleo poroso (7) confirman su biocompatibilidad, no toxicidad y carácter regenerador de las distintas zonas donde se aplican.

10 Se resumen a continuación los resultados de dichos ensayos para cada uno de los velos de nanofibras.

- Velo de nanofibras con HA (tratamiento de la zona del hueso alveolar (4))

15 El ensayo de citotoxicidad se practicó sobre el velo aditivado con fibras de HA descrito anteriormente, en condiciones de ensayo equiparables a su empleo in vivo, según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009.

20 Los resultados de este ensayo muestran que el velo de nanofibras aditivado con HA no resulta citotóxico, ya que se observó una viabilidad celular de $81,4\% \pm 9,2$ a las 24 horas, y una viabilidad celular del $95,3\% \pm 1,4$ a los tres días.

25 En cuanto a la adhesión y proliferación de células hDPSC sobre el velo de nanofibras con HA, se realizó una prueba inmunohistoquímica utilizando cromóforos de fluorescencia para poder visualizar el crecimiento celular mediante la toma de imágenes con un microscopio de contraste de fases. Para ello, las células se depositaron sobre el velo de nanofibras de DL-PLG con HA (o sobre vidrio en el caso de las muestras control), y se cultivaron durante una semana. Tras fijar las células se tiñeron con DAPI (siglas correspondientes al marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol) y faloidina conjugada a rodamina y se observaron con el microscopio de fluorescencia. Se tomaron imágenes en distintos tiempos del ensayo 30 en las que en cada una se muestra la fusión de la captura digital para observar la fluorescencia del DAPI (azul, correspondiente a los núcleos celulares) y la de la faloidina-rodamina (rojo, correspondiente a los filamentos de actina, componentes del citoplasma celular). Los resultados de estos ensayos muestran que el crecimiento y la morfología de las células fueron normales durante los periodos de cultivo empleados y no se

apreciaron alteraciones nucleares ni citoplasmáticas. Las células se adhirieron sobre los velos a las 4 horas de la siembra. A partir de las 24 h se apreció que adquirirían una morfología elongada, fibroblástica, por lo general más alargada que la de las células crecidas directamente sobre un soporte de vidrio.

5

Para determinar el número de células depositadas y crecidas sobre los velos, se tomaron en distintos tiempos imágenes solapadas que cubrieron la superficie de cada velo con el microscopio de fluorescencia. Posteriormente, mediante un software específico se determinó el número total de células hDPSC detectadas en cada muestra experimental, a partir del

10

cual se obtiene el valor promedio de células/cm² obtenido en cada tiempo.

En la figura 4 se muestra una representación gráfica de una función sigmoide que ilustra los resultados medios de este ensayo practicado sobre cuatro muestras analizadas, de forma que en el eje de abscisas se ha representado el tiempo en horas, mientras que en el eje de

15

ordenadas se ha representado la densidad de células hDPSC, expresada como células/cm².

Tal y como se observa en la figura 4, los resultados obtenidos en los velos de nanofibras con HA muestran que a la semana de cultivo de las células aumenta la proliferación celular, siendo la densidad celular alcanzada a la semana de cultivo de aproximadamente 25000

20

cel/cm².

- Velo de nanofibras con factor de crecimiento BMP-7 (tratamiento del cemento dental y el ligamento periodontal (5))

25

El ensayo de citotoxicidad se practicó sobre el velo aditivado con BMP-7 descrito anteriormente, en condiciones de ensayo equiparables a su empleo in vivo, según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, utilizando células hPDLSC.

30

Los resultados de este ensayo muestran que el velo de nanofibras aditivado con BMP-7 no resulta citotóxico, ya que se observó una viabilidad celular de 100,8% ± 11,0 a las 24 horas, y una viabilidad celular del 93,6% ± 4,7 a los tres días, valor que se elevó a 108,6% ± 5,0 a la semana. Se obtuvieron valores superiores al 100% de viabilidad debido a que se añadió un número mayor de células en el velo de nanofibras aditivado con BMP-7 que en la muestra control.

En cuanto a la adhesión y proliferación de células hPDLSC sobre el velo de nanofibras con BMP-7, se practicó una prueba inmunohistoquímica utilizando cromóforos de fluorescencia como la descrita para el velo de nanofibras con HA. Es decir, se depositaron las células sobre velos DL-PLG con BMP-7 (o sobre vidrio en el caso de las muestras control) y se cultivaron durante el tiempo indicado. Tras fijar las células se tiñeron con DAPI y faloidina conjugada a rodamina y se observaron con el microscopio de fluorescencia. Los resultados muestran que el crecimiento y la morfología de las células fueron normales durante los periodos de cultivo empleados y, con las técnicas utilizadas, no se apreciaron alteraciones nucleares ni citoplasmáticas. Así, a partir de las 24 h se aprecian adheridas tanto células pequeñas que mantienen una morfología redondeada, poligonal, como células que se extienden sobre la superficie y adquieren una morfología más fibroblástica. Esta diversidad en la morfología se debe a la presencia del BMP-7 en el velo de nanofibras, ya que las células que se cultivaron durante 24 h sobre vidrio mantuvieron un aspecto homogéneo, siendo la morfología de todas ellas redondeada, poligonal.

Para determinar el número de células depositadas y crecidas sobre los velos de nanofibras aditivados con BMP-7, se tomaron en distintos tiempos imágenes solapadas que cubrieron la superficie de cada velo con el microscopio de fluorescencia. Posteriormente, mediante un software específico se determinó el número total de células hPDLSC detectadas en cada muestra experimental, a partir del cual se obtiene el valor promedio de células/cm² obtenido en cada tiempo.

En la figura 5 se muestra una representación gráfica de una función sigmoide que ilustra los resultados medios de este ensayo practicado sobre cuatro muestras analizadas, de forma que en el eje de abscisas se ha representado el tiempo en horas, mientras que en el eje de ordenadas se ha representado la densidad de células hPDLSC, expresada como células/cm².

Los resultados obtenidos fueron los esperados para el crecimiento de las células sobre un soporte que no tiene efectos negativos sobre la proliferación celular. Los puntos experimentales se ajustan a una función sigmoide, que define el crecimiento de las células (fase de latencia, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria). Como se observa, la proliferación celular empezó a frenarse antes del último punto experimental analizado (día 7 de cultivo), como cabía esperar, ya que las células presentan inhibición por contacto y cada vez queda menos superficie libre del velo a la que puedan adherirse las nuevas células

generadas por división.

La densidad celular final sobre los velos de nanofibras con BMP-7, a tiempos de largos del cultivo de las células, que se puede estimar considerando la tendencia que marca la función sigmoide, es superior a la que muestran células hDPSC crecidas sobre estos velos, lo que concuerda con el menor tamaño de las células hPDLSC y por tanto una mayor densidad celular cuando el cultivo alcanza la confluencia. En el contexto de la presente invención, ha de entenderse confluencia como el porcentaje del área de la superficie del recipiente de cultivo celular que aparece cubierta por una capa de células cuando se observa al microscopio.

- Velo de nanofibras de gelatina aditivado con quitosano (tratamiento antibacteriano de la zona de la encía (6)).

Para comprobar el carácter antibacteriano del velo de nanofibras de gelatina aditivado con quitosano se realiza un ensayo de actividad antibacteriana siguiendo la norma: ISO 22196:2011 sobre 1 velo de nanofibras obtenido a partir de una solución con un 22% de gelatina y un 2% de quitosano de alto peso molecular, de acuerdo al ejemplo de realización preferente descrito anteriormente.

En dicho ensayo se realizan dos pruebas sobre el velo, una por cada tipo de microorganismo (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 8739). Se estudia la cantidad de microorganismos vivos, en ufc/cm² (unidades formadoras de colonias por cm²), tras 24 horas sobre la muestra de control sin aditivo antibacteriano, y se compara con el resultado obtenido al aplicar la misma cantidad de microorganismo y el mismo tiempo de actuación sobre las diferentes muestras a estudiar. Se realiza el mismo procedimiento con los dos tipos de microorganismos.

Con los datos obtenidos se calcula el valor de actividad antimicrobiana R. Este valor R es una unidad de medida logarítmica obtenida mediante la siguiente fórmula: $R = \log B/C$, siendo B = ufc/cm² tras 24 h de contacto en la muestra control y C = ufc/cm² tras 24 h de contacto con la muestra de velo de nanofibras de gelatina aditivado con quitosano.

Así, los valores de R obtenidos para las pruebas para cada microorganismo se reflejan en la siguiente tabla:

PARÁMETRO	MICROORGANISMO	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
R	2,43	3,63

Cabe precisar que se considera que la muestra presenta actividad antibacteriana a partir de un valor de $R \geq 2$, siendo el rango entre 0 y 5, por lo que, en vista de los resultados reflejados en la tabla anterior, queda evidenciado el carácter antibacteriano del velo de nanofibras aditivado con quitosano.

Por otra parte, el velo de nanofibras de gelatina aditivado con quitosano de alto peso molecular no resulta citotóxico para los dos tipos celulares ensayados (en condiciones de ensayo equiparables a su empleo in vivo): células hDPSC y células hPDLSC, ni favorece la adhesión y proliferación de células.

Para evidenciar esto, se practica un ensayo de citotoxicidad según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, utilizando líneas celulares de hPDLSC y hDPSC. Para ello, se empleó el velo de nanofibras de gelatina con quitosano de alto peso molecular depositado sobre otro velo de nanofibras de PLG o DL-PLG como soporte. Los resultados del ensayo mostraron una viabilidad celular del 75%, por lo que el velo no resulta citotóxico.

REIVINDICACIONES

1^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal **caracterizado porque** presenta un núcleo poroso (7) de un copolímero de DL-PLG o PLGA con, al menos, tres
 5 caras: donde una primera cara (1) está cubierta con un velo de nanofibras aditivado con hidroxiapatita para su contacto con el hueso alveolar (4), una segunda cara (2) está cubierta con un velo de nanofibras aditivado con factor de crecimiento BMP-7 para su colocación en contacto con los ligamentos periodontales (5) y la parte exterior del diente (8), y una tercera
 10 cara (3) está cubierta con un velo de nanofibras aditivado con quitosano para su colocación en contacto con la encía (6).

2^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 1^a, caracterizado por que los velos de nanofibras que cubren la primera cara (1), la segunda
 15 cara (2) y la tercera cara (3) del núcleo poroso (7) se obtienen por electrohilatura a partir de una solución polimérica de DL-PLG, PLGA y/o gelatina y, al menos, un disolvente.

3^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 2^a, caracterizado por que la solución polimérica del velo de nanofibras que cubre la primera
 20 cara (1) del núcleo poroso (7) presenta entre un 25% y un 35% en peso de DL-PLG y un máximo de un 10% en peso de hidroxiapatita, siendo los disolventes DMF (dimetilformamida) y CH₃CN (acetonitrilo).

4^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 2^a, caracterizado por que la solución polimérica del velo de nanofibras que cubre la segunda
 25 cara (2) del núcleo poroso (7) presenta entre un 25% y un 35% en peso de DL-PLG y un máximo de un 0,1% en peso de BMP-7, siendo los disolventes DMF (dimetilformamida) y CH₃CN (acetonitrilo).

5^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 2^a,
 30 caracterizado por que la solución polimérica del velo de nanofibras que cubre la tercera cara (3) del núcleo poroso (7) presenta entre un 15% y un 35% en peso de gelatina y un máximo del 0,1% en peso de BMP-7, siendo los disolventes ácido acético y agua, de forma que la solución polimérica está mezclada con una segunda solución en una proporción entre 3:7 y 9:1, de manera que la segunda solución presenta entre un 1% y un 5% de quitosano.

6^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 1^a o 5^a, caracterizado por que el quitosano es un quitosano de alto peso molecular.

5 7^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 1^a, caracterizado por que las nanofibras que integran los velos que cubren la primera cara (1), la segunda cara (2) y la tercera cara (3) del núcleo poroso (7) presentan un diámetro entre 300 nm y 900 nm.

10 8^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 1^a, caracterizado por que los velos de nanofibras que cubren la primera cara (1), la segunda cara (2) y la tercera cara (3) del núcleo poroso (7) presentan un gramaje de 20 g/m² a 40 g/m².

15 9^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 1^a, caracterizado por que el núcleo poroso (7) está obtenido por bioimpresión 3D.

10^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 1^a, caracterizado por que el núcleo poroso (7) presenta una densidad de relleno entre 10% y el
20 60%.

11^a.- Dispositivo para el tratamiento de la enfermedad periodontal, según reivindicación 1^a, caracterizado por que el núcleo poroso (7) está aditivado con sales de calcio, factores de crecimiento o células humanas.

25

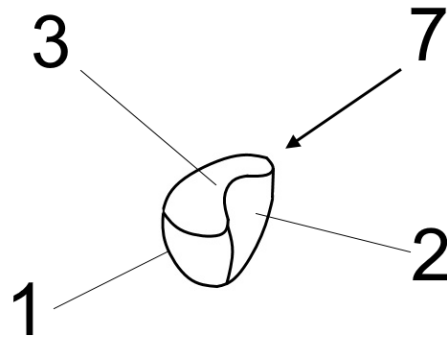


FIG. 1

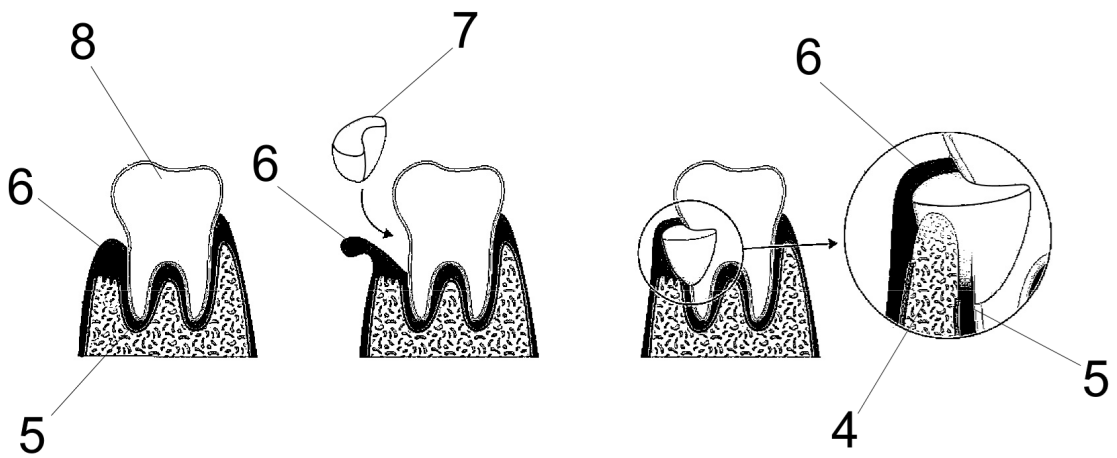


FIG. 2

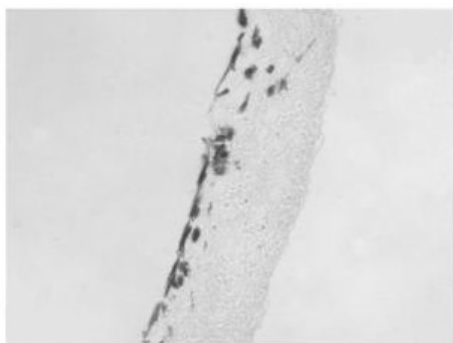


FIG. 3.1

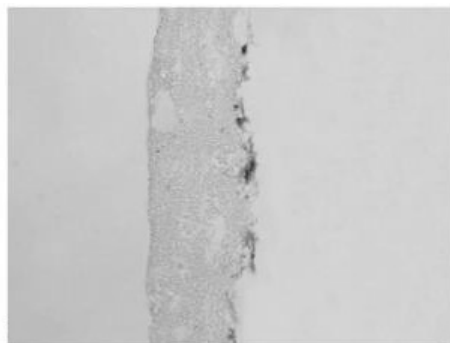


FIG. 3.2

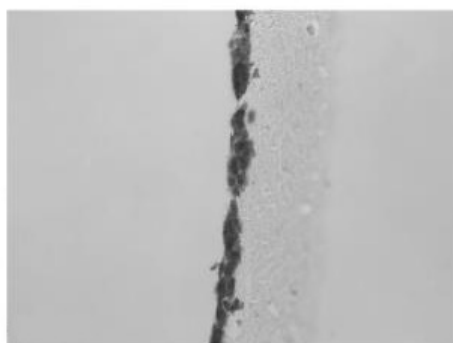


FIG. 3.3

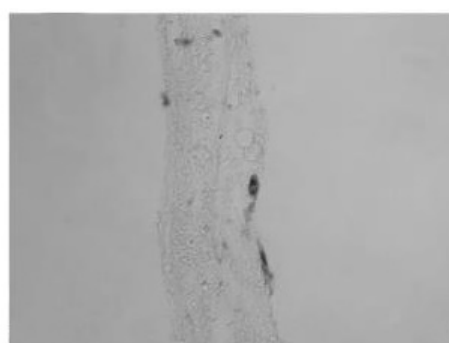


FIG. 3.4

FIG. 3

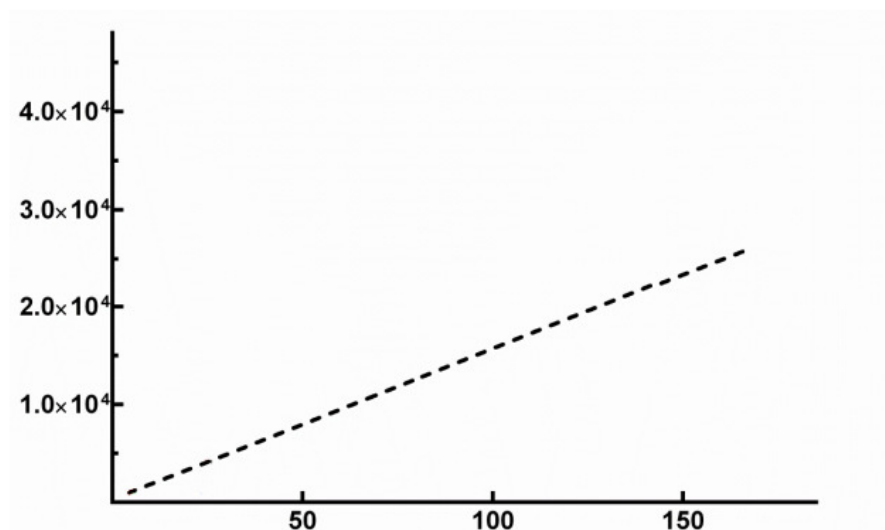


FIG. 4

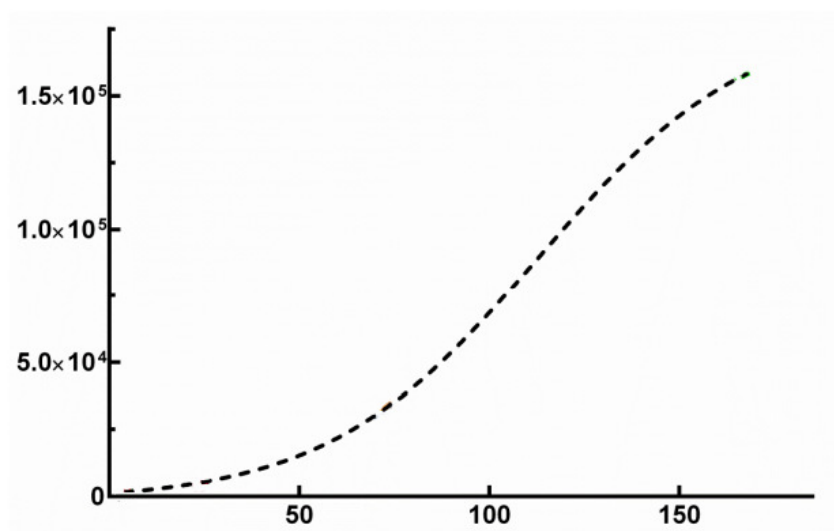


FIG. 5