



**Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencias Veterinarias
Trabajo de Fin de Máster**

**Tornillos ortopédicos macroporosos aplicados en la
liberación controlada de antibiótico: prevención de
infecciones post quirúrgicas utilizando el modelo ovino.**

Marina Godoy Gimeno

Directores: Lluís Luján Lerma

Manuel Arruebo Gordo

Julio de 2012

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Objetivos	7
4. Material y métodos	8
4.1. Experimentos <i>in vitro</i>: Estudio de la liberación de antibiótico por el tornillo de acero macroporoso tipo 360L	8
4.2. Experimento <i>in vivo</i>: Estudio de la eficacia del tornillo ortopédico como liberador de antibiótico frente a la infección experimental	10
4.2.1. Procedimiento quirúrgico e infección experimental local	11
4.2.2. Seguimiento de los animales	13
5. Resultados	13
5.1. Experimentos <i>in vitro</i>: Estudio de liberación del antibiótico por el tornillo de acero macroporoso	13
5.2. Experimento <i>in vivo</i>: Estudio de la eficacia del tornillo ortopédico como liberador de antibiótico frente a la infección experimental	15
5.2.1. Seguimiento de los animales	16
5.2.2. Necropsia	17
5.2.3. Histopatología	21
5.2.4. Microbiología	23
6. Discusión	23
7. Conclusiones	26
8. Bibliografía	27
9. Agradecimientos	29

1. Resumen

Uno de los grandes retos de la medicina moderna es liberar los medicamentos exclusivamente en los lugares donde deben actuar y en cantidades precisas. En este sentido, este proyecto de investigación utiliza tornillos ortopédicos macroporosos como depósitos liberadores de antibióticos para la prevención de infecciones post-quirúrgicas.

Tanto en traumatología como en cirugía ortopédica las infecciones, en especial las estafilocócicas, representan un grave problema en el periodo postquirúrgico, obligando en muchos casos a la retirada de la prótesis infectada y a la posterior reimplantación de una nueva. Todo ello implica riesgos para la salud del paciente y un elevado coste económico.

En este trabajo se estudia la utilidad de tornillos ortopédicos macroporosos con hueco central relleno de antibiótico que cumplen una función dual. Además de realizar una función primaria de estabilización del trauma óseo, producen una liberación local de antibiótico en concentración adecuada útil para la prevención de las complicaciones infecciosas post quirúrgicas ortopédicas y traumatológicas. Esta segunda función facilita la realización de la primera ya que se favorece una adecuada reparación y regeneración ósea en condiciones estériles.

Este trabajo está dividido en dos partes: *in vitro* e *in vivo*. En los experimentos *in vitro* se evaluó la cinética de liberación del antibiótico por el tornillo en un fluido biológico simulado. En el experimento *in vivo* se implantaron tornillos de acero macroporoso cargados de antibiótico en su interior en la tibia de cinco ovinos adultos. Los implantes ortopédicos fueron infectados experimentalmente con concentraciones iguales de *Staphylococcus aureus* tanto para los animales que se implantaron tornillos con antibiótico como para el control. Se hizo el seguimiento clínico y microbiológico durante el tiempo experimental y posteriormente se procedió a la evaluación *post mortem* de los animales (necropsia, exámenes histopatológico y microbiológico). En el experimento *in vitro* se logró demostrar el control de la farmacocinética del antibiótico a través de la estructura y diseño de este dispositivo ortopédico, alcanzándose una liberación sostenida por un periodo de siete días. En el experimento *in vivo* se comprobó la eficacia del tornillo como método profiláctico para infecciones post quirúrgicas ortopédicas locales en el modelo ovino, ya que los animales tratados exhibieron una adecuada cicatrización sin evidencias macroscópicas, microscópicas ni microbiológicas de infección, mientras que el animal control sufrió una infección masiva, lo que fue

comprobado mediante seguimiento clínico, por los análisis *post mortem* y microbiológicos.

2. Introducción

A pesar de los avances en la cirugía ortopédica y de la traumatología, tras la colocación de una prótesis suelen presentarse algunas complicaciones. El mayor problema después de la implantación son las infecciones bacterianas, siendo los agentes patógenos más frecuentemente aislados el *Staphylococcus aureus* y el *Staphylococcus epidermidis* (Crockarell, 1998).

Además, el *Staphylococcus aureus* es capaz de producir *slime*, componente que constituye la matriz de los biofilms bacterianos que se adhieren a la superficie de los implantes y protegen a las bacterias frente a los antibióticos y a los macrófagos (Costerton et al 1987; Gristina 1994), dando lugar a una infección difícil de erradicar en el hueso, las articulaciones y los tejidos circundantes (Gristina 1994; Gracia et al. 1998). Además, en la clínica se observa reiteradamente la aparición de resistencias bacterianas a los antibióticos ya existentes en el mercado y a los de nueva generación, fenómeno especialmente frecuente y grave en el medio hospitalario.

Actualmente, tras un implante, el antibiótico es aplicado por vía sistémica y por vía tópica. Sin embargo, por vía sistémica son necesarias cantidades muy elevadas que encarecen la terapia y que pueden producir efectos secundarios y, por vía tópica, no penetra el suficiente antibiótico para conseguir la concentración mínima inhibitoria y no se propicia la actividad farmacocinética adecuada. La liberación local de este antibiótico en la zona de la intervención podría minimizar estos efectos por la reducción de las concentraciones sanguíneas de este medicamento (Harwood, 2006; Senneville, 2006).

Hoy en día, en la práctica quirúrgica ortopédica y traumatológica, se dispone de tratamientos antibióticos locales como son las prótesis cementadas, donde el cemento óseo se prepara durante la intervención quirúrgica mezclándole antibiótico (generalmente gentamicina o tobramicina), directamente; difundiendo éste a través de los defectos o grietas que produce el cemento después de seco (Maia Viola et al. 2009). Esta difusión no es controlada y se produce de manera muy rápida. Asimismo, la farmacocinética y la farmacodinámica no son conocidas y son difíciles de reproducir, ya que los defectos del cemento no son repetitivos.

Se han desarrollado diversos sistemas experimentales con la intención de su posterior aplicación en la prevención de infecciones post quirúrgicas. Un ejemplo de dispositivo suministrador de fármacos experimental son las almohadillas de espuma recubiertas con un polímero de poliuretano con compuestos antimicrobianos (cerageninas). Se hizo un estudio con veinte ovejas (diez tratadas y diez controles) donde no se demostró la eficacia de este tipo de sistemas, ya que los animales tratados con antibiótico mostraron signos claros de infección después de transcurrido el tiempo experimental (Perry, 2010). Sin embargo, en otro experimento, utilizándose implantes de gatifloxacina en fémur de conejos para la prevención de osteomielitis, se demostró una buena eficacia del sistema para la prevención de la infección, aunque existían desventajas significativas debido a la necesidad de la retirada del implante después de terminado el tratamiento (El-Kamel, 2007).

En el presente proyecto de investigación se utilizarán dispositivos fijos de liberación de fármacos, los cuales tienen como función evitar la infección bacteriana mediante la liberación de concentraciones locales de antibiótico al menos por encima de la concentración mínima inhibitoria (*minimum inhibitory concentration*, MIC) pero por debajo del umbral toxicológico que pudiera causar efectos secundarios indeseados (Pérez, 2011). Dicho dispositivo consiste en un cilindro hueco con pared macroporosa de acero 316L. El tornillo es similar a los dispositivos de fijación comerciales y pese a tener una hoquedad interna, su resistencia mecánica no está comprometida (Pérez, 2011). El interior del tornillo se llenará con un antibiótico de elección, el Linezolid® liofilizado. El Linezolid® es un antibiótico sintético de acción sistémica y fue el primer antibiótico comercializado de las oxazolidinonas. Este antibiótico presenta acción contra cocos gram positivos y es utilizado en el tratamiento contra diversas cepas de bacterias resistentes y de hecho suele reservarse para el tratamiento de infecciones bacterianas graves donde los otros antibióticos han fracasado por haber generado resistencias (Szczypa et al, 2001). Es una sustancia que ha demostrado también excelentes resultados contra una gran variedad de *Staphylococcus aureus* resistentes (Cercenado et al, 2001). Además en experimentos *in vitro* realizados por nuestro grupo de investigación (Pérez, 2011), se obtuvieron resultados positivos y se observó gran sensibilidad de esta bacteria a dicho antibiótico.

En este trabajo se utilizarán métodos *in vitro* e *in vivo* para comprobar la eficacia del tornillo de acero macroporoso 316L como liberador de antibióticos.

La determinación del perfil de liberación del antibiótico *in vitro* es muy importante en un sistema de administración de moléculas terapéuticamente activas. Entender el proceso de liberación de un fármaco ayuda establecer el mecanismo de la misma y optimizar su cinética. Para la obtención de este perfil se hacen necesarias técnicas ampliamente utilizadas en estudios previos como es el caso de la Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis). (Kima, 2004; Shaobin, 2009). El espectrofotómetro se utiliza extensivamente en laboratorios de química y bioquímica para determinar bajas concentraciones de ciertas sustancias, como las trazas de metales en aleaciones o la concentración de un medicamento que puede haber llegado a ciertas partes del cuerpo. También es una técnica analítica empleada en trabajos que abarcan el suministro de moléculas terapéuticamente activas, determinando su liberación desde hidrogeles, biopolímeros y sílices mesoporosas (Arruebo, 2011; Shaobin, 2009). La técnica de Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. A través de la aplicación de Ley de Beer-Lambert, se puede relacionar los valores de absorbancia con la concentración en un rango amplio de concentraciones. La ley de Beer-Lambert relaciona la intensidad de luz entrante en un medio con la intensidad saliente después de que en dicho medio se produzca absorción (Skoog et al, 2001).

Sin embargo para estudiar la eficacia del implante como depósito de antibiótico se hacen necesarias las pruebas *in vivo* ya que las condiciones de inflamación local, dinámica de líquidos, biocompatibilidad y seguridad del material solo se pueden estudiar y pueden ser evaluadas en el modelo *in vivo* (Pearce et al, 2007).

Para este trabajo, se eligió el ovino como modelo experimental por estar bien establecido en estudios anteriores en el área de implantes ortopédicos (Claes et al, 1997; Augat et al, 2001; Pearce et al, 2007). Además el ovino posee características físicas idóneas que son fácilmente extrapolables para el hombre, como el tamaño del fémur (la cavidad intramedular mide 13mm de diámetro) y el peso corporal ambos valores próximos al de un humano adulto (Langlais et al, 2006). Dado que todo proceso experimental implica el sacrificio de los animales de la prueba, se decidió adoptar un sistema objetivo acerca del momento para realizar la eutanasia basado en el sistema de

grados para infecciones en implantes ortopédicos establecido por Checketts (2000), Tabla 1.

Tabla 1: Sistema de grados de infecciones en tornillos ortopédicos (Checketts, 2000)

Grados	Apariencia
1	Piel enrojecida; discreta secreción local
2	Piel enrojecida; moderada a acentuada secreción en el lugar del implante; dolor y sensibilidad en tejidos blandos
3	El mismo que el grado 2 pero no mejora con el tratamiento con antibióticos
4	Infección severa incluyendo diversos tornillos; perdida de tornillos
5	El mismo que el grado 4 pero además afectando huesos
6	La infección continua mismo con la retirada de los tornillos

Las aplicaciones prácticas del presente proyecto abarcan tanto al campo de la medicina humana como al de la veterinaria. En el campo de la medicina humana sus aplicaciones podrían ser de gran utilidad y tener una repercusión amplia en muchos campos, desde la mejora de la calidad de vida y la temprana recuperación de los pacientes hasta el ahorro en la utilización de recursos médicos. Por otro lado, en el campo de la cirugía ortopédica y traumatología veterinaria, y en especial en el campo de los pequeños animales y los équidos, se utilizan cada vez con mas asiduidad técnicas ortopédicas que aumentan la calidad de vida y la recuperación de los animales (Virgin et al, 2011; Jankovits et al, 2011). Dada la particular idiosincrasia de las actuaciones veterinarias, no siempre se logra alcanzar la asepsia total y además, la limpieza diaria post quirúrgica de la herida no suele ser desempeñada en un ambiente hospitalario. Por ello, la validación de un implante óseo liberador de antibiótico *in situ* como el propuesto por este proyecto sería de gran utilidad en la prevención de infecciones.

3. Objetivos

El objetivo de este proyecto de investigación es estudiar el efecto de la liberación directa del antibiótico allí donde la terapia es más necesaria, a través de un dispositivo implantable que mientras facilita la fijación y reparación de fractura o lesión libera al mismo tiempo el fármaco localmente evitando la aparición de infecciones secundarias.

En este trabajo se utilizarán tornillos ortopédicos, fabricados a partir de acero macroporoso, como depósito de antibiótico con el objetivo de controlar la farmacocinética del fármaco, intentando lograr concentraciones superiores a la MIC e, idealmente, con cinéticas de orden cero, es decir, lineales, alcanzando liberaciones sostenibles durante el tiempo, previniendo infecciones post quirúrgicas y permitiendo la regeneración ósea aséptica y la consolidación de la fractura.

4. Material y métodos

El proyecto está dividido en dos partes: experimentos *in vitro* e *in vivo*. La parte *in vitro* fue realizada en los laboratorios del Instituto Universitario de Nanociencia de Aragón (INA) y la parte *in vivo* fue ejecutada en las instalaciones y laboratorios del Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza (Unizar).

4.1 Experimentos *in vitro*: Estudio de la liberación de antibiótico por el tornillo de acero macroporoso tipo 360L.

En la parte *in vitro* se estudia y se describe la cinética de liberación del antibiótico desde el interior de los tornillos. Esta evaluación se ha realizado mediante cuantificación por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) y se determinó la liberación en fluido biológico simulado (*simulated biological fluid*, SBF).

Se utilizaron tornillos de acero macroporoso inoxidable 316L, que fueron adquiridos de MottCorporation® (Farmington, USA), y cuyas dimensiones son: 25,4 mm de longitud, diámetro exterior de 6,35 mm y 1,6 mm de espesor (Figura 1). Al mismo tiempo el tamaño nominal de filtración del acero de la pared era de 200 nm con porosidad volumétrica del 17%. En el interior de dichos tornillos fueron introducidos 95,8 mg de Linezolid® liofilizado. Se valoró la evolución de la liberación del antibiótico mediante la inmersión del tornillo así preparado en 100 ml de SBF, en un frasco, mantenido a 37 °C y en constante agitación, simulando el movimiento de la sangre. Las variaciones de concentración fueron medidas mediante espectroscopia (UV-Vis) en intervalos de tiempo pre determinados, a través de la aplicación de la Ley de Beer-Lambert utilizando un calibrado inicial previo. Las medidas de absorbancia se realizaron a corto intervalo de tiempo al principio de la liberación, por tratarse de un proceso inicialmente relativamente rápido, para posteriormente reducir su frecuencia en

las etapas más avanzadas de la liberación. Se llevaron a cabo diversas mediciones al día por un periodo total de seis días.



Figura 1: Tornillo de acero macroporoso inoxidable 316L. Un extremo está cerrado manteniendo el otro extremo abierto y una hoquedad interior.

El diseño del dispositivo en cuestión produce un proceso de liberación que se caracteriza por la difusión del fármaco desde el espacio interior y posterior permeación del fármaco a través de la pared porosa del dispositivo.

El SBF fue preparado siguiendo el procedimiento descrito por Horcada (2004) según el cual se necesitan las siguientes cantidades de cada compuesto para cada litro de solución, (Sigma-Aldrich, Alemania):

- 7,996 g de cloruro de sodio
- 0,350 g de hidrógeno carbonato de sodio
- 0,224 de cloruro de sodio
- 0,350 g de hidrógeno carbonato de sodio
- 0,224 g de cloruro de potasio
- 0,228 g de fosfato de potasio tri-hidratado
- 0,305 g de cloruro de magnesio hexa-hidratado
- 0,278 g de cloruro de calcio
- 0,071 g de sulfato de sodio
- 6,057 g de tris hidroximetilaminoetano

4.2. Experimento *in vivo*: Estudio de la eficacia del tornillo ortopédico como liberador de antibiótico frente a la infección experimental

Este proyecto fue sometido a la evaluación de la Comisión ética asesora para la experimentación animal de la Unizar y obtuvo un informe favorable para su realización (código de referencia PI14/12).

Para el experimento *in vivo* se utilizaron cinco ovinos de la raza Rasa Aragonesa, cuatro hembras y un macho castrado, obtenidos de una explotación cercana a Zaragoza. Los animales fueron alojados en los boxes de la sección de équidos del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria.

Se realizó un único experimento donde se colocaron implantes metálicos en el tercio medial de la cara interna de la tibia de los 5 animales (Figura 2). Las variables objeto de estudio fueron: i) implantes percutáneos fabricados con acero poroso con y sin el antibiótico Linezolid®, ii) infección experimental percutánea por *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 6538.

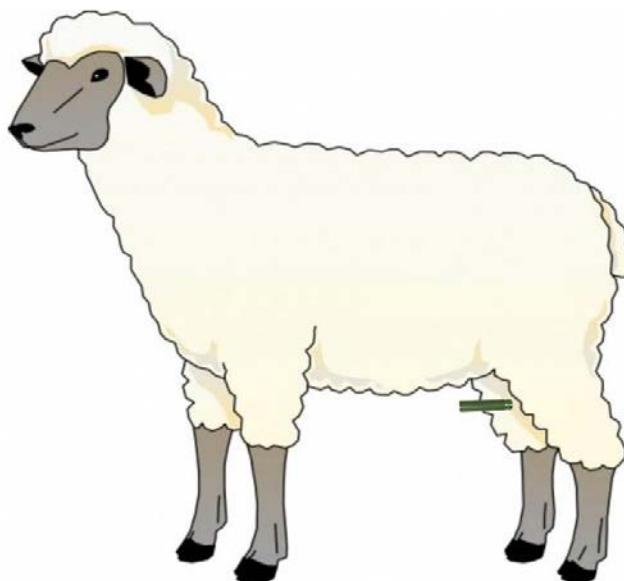


Figura 2: Esquema del implante metálico en el tercio medial de la cara interna de la tibia derecha en una oveja

Se formaron dos grupos de experimentación. El grupo A (n=4, animales identificados como A1, A2, A3 y A4), grupo en el que los animales recibieron un implante con antibiótico en su interior y fueron infectados experimentalmente (ver

metodología más adelante). Este grupo se creó para evaluar la eficacia del implante en su papel como depósito de antibiótico y como elemento preventivo frente a la infección y la formación del biofilm bacteriano en el implante ya que la cepa empleada es formadora de biofilm. Se eligió una cepa formadora de biofilm para enfrentarse a uno de los escenarios clínicos de infección más complejos.

El grupo B (n=1, animal identificado como B1) fue el grupo control. El animal recibió un implante sin antibiótico en su interior y fue infectado experimentalmente (ver metodología más adelante).

4.2.1 Procedimiento quirúrgico e infección experimental local

Los tornillos ortopédicos fueron esterilizados y rellenados posteriormente con 120 mg de Linezolid® liofilizado comercial en campana de flujo laminar (Figura 3).

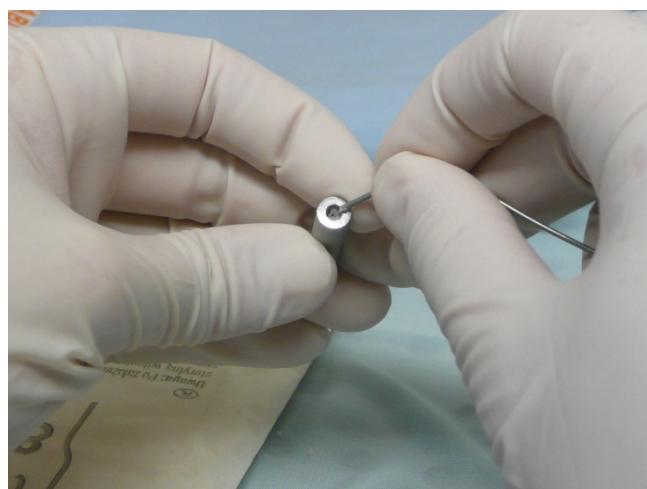


Figura 3: Tornillo en el momento de ser cargado con Linezolid® en condiciones estériles

Las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo en el quirófano del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza. Los procedimientos se efectuaron bajo anestesia general: en primer lugar se realizó inducción anestésica con combinación de xilacina (0,3mg/kg IM) y ketamina (15mg/kg IM) seguido de mantenimiento anestésico con isoflurano mediante intubación endotraqueal.

Los implantes se colocaron en la cara interna, tercio medial de la tibia derecha. Tras la incisión de la piel y subcutáneo y la elevación de perióstio se efectuó un orificio de 6 mm de diámetro y 1 cm de profundidad en la cortical con equipos motorizados de traumatología. En ambos grupos se permitió que el implante sobresaliera hacia el

exterior, por lo que no se suturaron todos los planos y no se pudo suturar la piel completamente.

Acto seguido, utilizando hisopos estériles, se tomaron muestras del tejido adyacente al tornillo con el objetivo de determinar la microbiota inicial (microbiota cero) de la región. Esta actuación se hizo inmediatamente antes de la infección experimental.

Una vez concluido el procedimiento quirúrgico, los implantes ortopédicos fueron infectados experimentalmente usando una dosis de $5,5 \cdot 10^8$ UFC/ml de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC6538, en un volumen de 100 μl /tornillo. Esta dosis se depositó directamente en la herida que rodeaba el implante metálico, tal como se observa en la Figura 2.



Figura 4: Dosis infectante (flecha) depositada alrededor del implante transcutáneo. Obsérvese como el volumen de la dosis cubre completamente la periferia del tornillo

Se realizó un examen radiológico para evaluación de la localización de los implantes y se obtuvo muestra de sangre en EDTA para hemograma completo de los animales.

La zona quirúrgica fue convenientemente protegida con un vendaje de tipo medio Robert-Jones de la extremidad. Salvo en el acto intencionado de infectar los implantes de ambos los grupos, el resto de los actos quirúrgicos se llevaron a cabo respetando estrictas medidas de asepsia.

4.2.2. Seguimiento de los animales.

Los animales se sometieron a chequeos diarios para observar la evolución de la herida y detectar y controlar cualquier alteración inflamatoria local o sistémica. Se administró antibiótico sistémico inyectable (Penicilina 1000UI/kg SID) durante 5 días mimetizando las condiciones usuales a las que se someten todos los pacientes ortopédicos tras cirugía.

Se estableció que el animal sería eutanasiado si presentara estadio grado II de infección local (ver Tabla 1), es decir, si presentara piel enrojecida, moderada a acentuada secreción en el lugar del implante, junto con dolor y sensibilidad en tejidos blandos (Checketts 2000). El animal también se sacrificaría si presentara síntomas de grado I (piel enrojecida y discreta secreción local) combinados con uno de los siguientes síntomas: anorexia, hipodipsia, letargia, cojeras, dolor y sensibilidad en el lugar del implante.

Se llevó a cabo el seguimiento de los animales con examen físico general, con especial atención a la temperatura corpórea del animal, evolución de la herida quirúrgica, evolución radiológica del implante y análisis sanguíneos.

Dos animales (A1 y A2) se sacrificaron mediante sobredosis barbitúrica en el séptimo día post infección (dpi) y los tres restantes (animales A3 y A4 y el animal control B1) fueron sacrificados en el noveno dpi. Se llevó a cabo un detallado examen macroscópico de la herida quirúrgica y se tomaron muestras tisulares para estudios histopatológicos con especial atención a los tejidos adyacentes al tornillo (piel, tejido subcutáneo, periostio y hueso).

Para estudios microbiológicos, se realizó toma de muestras del tejido adyacente al tornillo por medio de hisopos. Se hicieron cultivos directos de los hisopos en placas de agar sangre y Macconkey 3 tanto en atmósferas aeróbica como anaeróbica. Se realizó así mismo enriquecimiento de las muestras en medio TSB (*Tryptone soya broth*) a 37°C durante 24 horas tras lo que se resembró en placas de agar sangre. El cultivo se llevó a cabo en un laboratorio externo especializado en microbiología.

5. Resultados

5.1. Experimento *in vitro*: Estudio de liberación del antibiótico por el tornillo de acero macroporoso

Se construyó una curva de calibración del Linezolid® a partir de soluciones de concentración conocida del fármaco en el SBF y se obtuvo la absorbancia correspondiente a las distintas concentraciones (Figura 5).

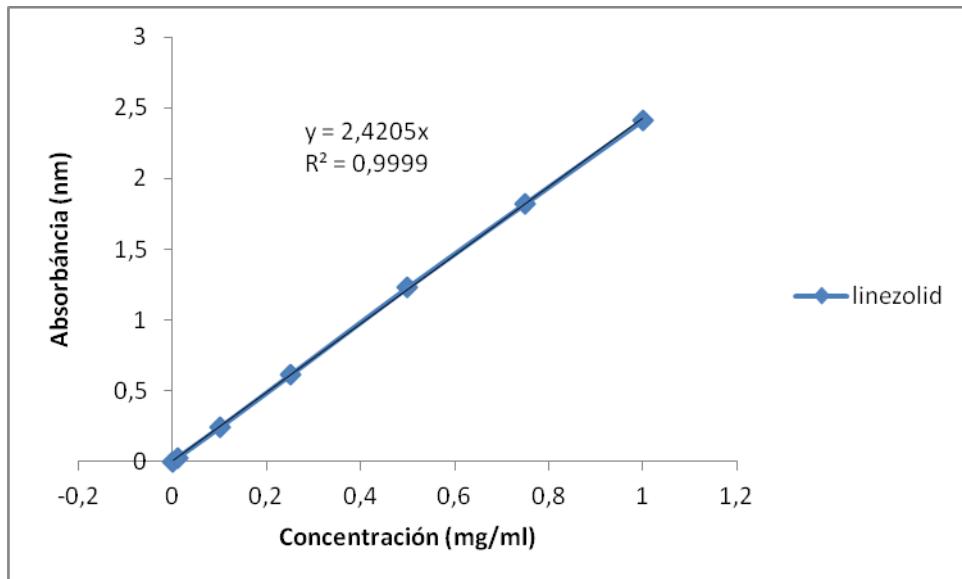


Figura 5: Curva de calibración del antibiótico Linezolid®

A partir de la ecuación de la recta obtenida fue posible relacionar los valores de absorbancia con la concentración del antibiótico en el SBF y la cantidad en mg liberada por el tornillo. En la Tabla 2, se detalla la concentración de antibiótico liberado durante la primera semana de estudio.

Tabla 2: Cinética de liberación de la cantidad de Linezolid® liberada por día

Tiempo de liberación del fármaco (días)	Cantidad liberada (mg)
1	18,10331
2	34,85124
3	54,47521
4	71,20248
5	83,95455
6	85,57438

Se relacionó la concentración del antibiótico liberado en mg/ml con el porcentaje de fármaco liberado por el dispositivo respecto de la cantidad cargada inicial. Se construyó una curva de este porcentaje frente al tiempo de liberación (Figura 6).

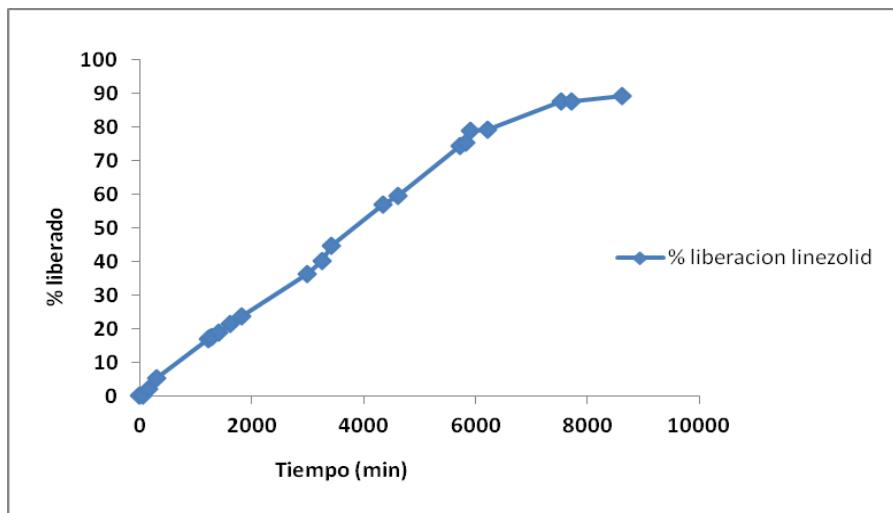


Figura 6: Cinética de liberación del Linezolid® por el tornillo de acero macroporoso en medio SBF

5.2 Experimento *in vivo*: Estudio de la eficacia del tornillo ortopédico como liberador de antibiótico frente a la infección experimental

Los análisis sanguíneos y los exámenes radiológicos realizados posteriormente a la cirugía e infección experimental local no presentaron alteraciones dignas de mención. Se comprobó que en los cinco animales, los tornillos estaban localizados en la región adecuada, es decir, ocupaban el periostio, hueso compacto y cavidad medular pero que respetaban los límites de la cara contralateral del hueso (Figura 7).

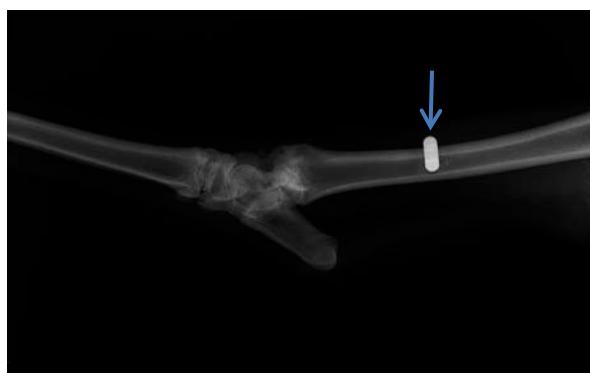


Figura 7: Radiografía lateral de la tibia derecha del animal A4. Se observa la correcta inserción del tornillo de características marcadamente radiopacas (flecha)

5.2.1. Seguimiento de los animales

Ninguno de los animales del grupo A (con antibiótico) presentó fiebre o alteraciones en los parámetros del examen físico (frecuencia cardíaca, respiratoria y

coloración de mucosas) durante todo el tiempo que duró el experimento (siete o nueve días).

El animal del grupo B (sin antibiótico) presentó fiebre ligera de $T = 39,8^{\circ}\text{C}$ en el cuarto, quinto y sexto días experimentales. No presentó otros parámetros alterados.

Tanto los animales del grupo A como el animal del grupo B no presentaron alteraciones en la analítica sanguínea durante el tiempo experimental.

Por lo que respecta a la evolución de la herida quirúrgica, todos los animales del grupo A presentaron cicatrización por primera intención normal, observándose perfecta hemostasia, ausencia de infección macroscópica de la herida y acercamiento máximo de los bordes quirúrgicos al tornillo. En los primeros días experimentales, en todos los animales, se pudo detectar discreto a moderado exudado seroso y discreto aumento de la temperatura local, sin embargo en el quinto día experimental ya se había formado adecuadamente la costra alrededor del tornillo y cerca de los puntos quirúrgicos (Figura 8). En todo el seguimiento no hubo alteración del olor de las heridas ni se observaron alteraciones radiológicas para los animales de este grupo A (sin antibiótico)

El animal del grupo B exhibió, por el contrario, aumento de temperatura local en la región de la herida quirúrgica durante toda la duración del experimento. Este aumento fue evaluado a través de palpación de la herida. El tejido alrededor del tornillo y cercano a los puntos quirúrgicos presentaba fenómenos vasculares intensos, que se traducían en un color rojizo, y mostraba exudado de sero-purulento a purulento especialmente después del cuarto día experimental. El tejido adyacente al tornillo no se adhirió a la superficie del acero (Figura 9). La herida quirúrgica tenía mal olor a partir del cuarto día experimental. No se observaron alteraciones radiológicas durante el tiempo experimental.



Figura 8: Herida quirúrgica del animal A3, 5dpi. Obsérvese la cicatrización por primera intención y la ausencia de alteraciones inflamatorias



Figura 9: Herida quirúrgica del animal B1, 5dpi. Se observa exudado sero-purulento, pequeños focos hemorrágicos y la falta de adherencia del tejido adyacente al tornillo (flecha)

5.2.2. Necropsia

Se procedió la necropsia de los animales A1 y A2 en el 7 dpi y los A3, A4, B1 y C en el 9 dpi.

Los animales sacrificados en el 7 dpi no tenían secreciones o señales de infección en la herida quirúrgica. Los tornillos estaban bien encajados y parcialmente adheridos al subcutáneo, periostio y hueso compacto (Figura 10). Ninguno exhibía

todavía el proceso completo de cicatrización en la piel alrededor del tornillo, y se observaba formación parcial de la costra serosa (Figura 11).



Figura 10: Imagen macroscópica del tejido subcutáneo de la herida quirúrgica del animal A1. Se observa la correcta inserción del tornillo en el hueso, sin reacción ósea o de los tejidos adyacentes



Figura 11: Imagen macroscópica superficial de la herida quirúrgica del animal A2, 7 dpi. No hay señales de infección y hay formación parcial de la costra serosa

Los otros tres animales sacrificados en el noveno día presentaron distintas lesiones macroscópicas, de acuerdo con su grupo experimental.

Los animales A3 y A4 exhibieron adecuada cicatrización en todo el tejido alrededor del tornillo y cerca de los puntos quirúrgicos, con formación de costra sero-celular parcialmente remodelada. Los tornillos estaban bien encajados y adheridos a todas las capas (piel, subcutáneo, periostio y hueso compacto). No había señales de infección tales como secreciones o mal olor de la herida (Figura 12).

El animal B1 tenía gran cantidad de secreción purulenta especialmente en la región alrededor del tornillo. El tejido circundante al tornillo estaba marcadamente friable y de color oscuro, imagen que era compatible con necrosis tisular. No había adherencia de este tejido al tornillo. El tejido conjuntivo, la musculatura subcutánea y el periostio exhibieron diversos focos hemorrágicos, multifocales a coalescentes, marcado reblandecimiento tisular compatible también con necrosis y oscurecimiento de la región cercana al tornillo (Figuras 13 y 14).



Figura 12: Herida quirúrgica del animal A3, 9dpi. Se observa adecuada cicatrización del tejido alrededor del tornillo y cerca de los puntos quirúrgicos, con formación de costra sero-celular parcialmente remodelada



Figura 13: Imagen macroscópica de la herida quirúrgica del animal B1. Se observa gran cantidad de secreción purulenta especialmente en la región alrededor del tornillo. No hay adherencia entre la piel y el tornillo y hay desgarro de los puntos quirúrgicos y de focos de la piel cercana al tornillo



Figura 14: Imagen macroscópica de la herida quirúrgica del animal B1. El tejido conjuntivo, la musculatura subcutánea y el periostio exhiben severa hemorragia y oscurecimiento de la región cercana al tornillo, lesión compatible con necrosis

Ningún animal presentó otras lesiones macroscópicas dignas de mención en la necropsia

5.2.3. Histopatología

El análisis microscópico de los todos animales del grupo A reveló lesiones histopatológicas muy similares, compatibles con un proceso cicatricial normal, que se describen de manera global a continuación:

El tejido conjuntivo subcutáneo superficial y profundo de la región contigua al tornillo implantado mostró marcada fibroplasia, estando las fibras de tejido colágeno y los vasos sanguíneos dispuestos paralelamente. El componente celular predominante fueron los fibroblastos, que mostraban núcleos ovalados hipercromáticos y un citoplasma fusiforme eosinofílico con bordes poco definidos. Se observaron pequeñas cantidades de linfocitos y plasmocitos distribuidos multifocalmente. La neovascularización, de tipo multifocal, fue muy evidente. Se observaron focos de calcificación en la región limítrofe al implante. La epidermis presentó discreta acantosis regular difusa y se observaron áreas donde se habían formado costras de pequeño tamaño. (Figura 15).

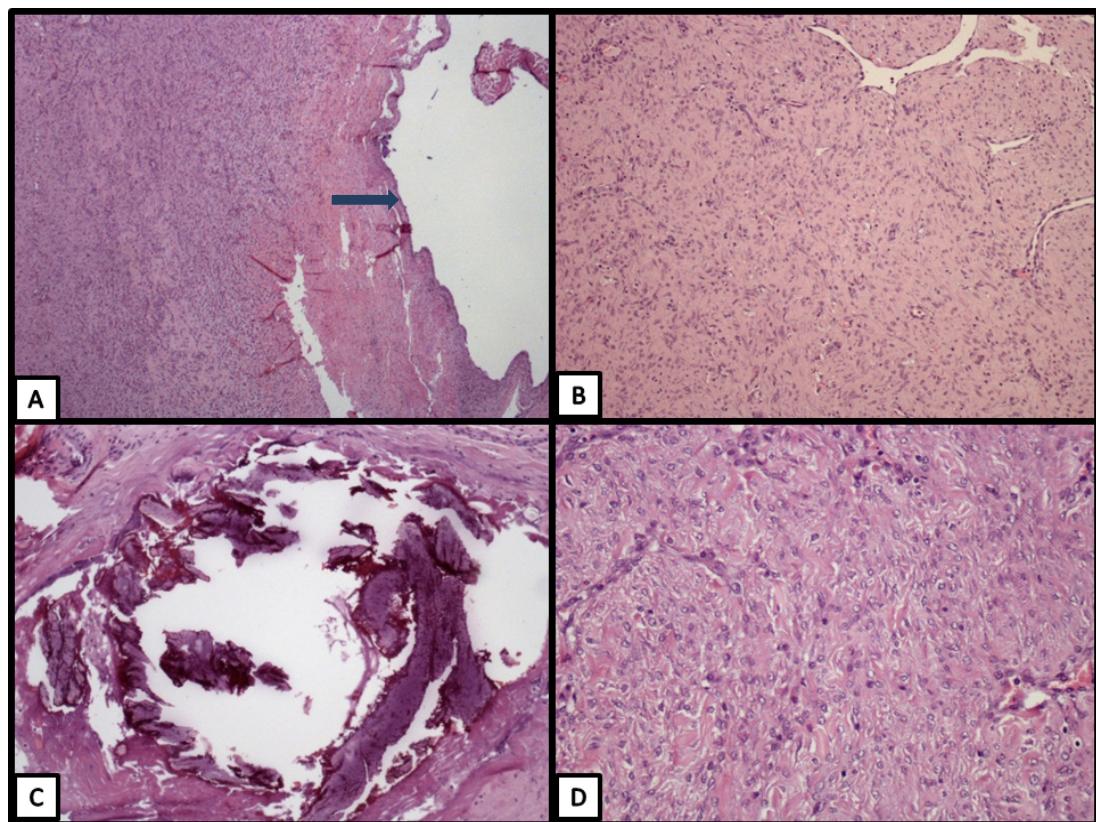


Figura 15: Región tisular anexa al tornillo implantado en los animales del grupo A. (A) Animal A2 – Fibroplasia severa pero de características histológicas normales (flecha) H&E 4x; (B) Animal A3 – Fibras de tejido colágeno y vasos sanguíneos dispuestos paralelamente, característico de un proceso cicatricial normal H&E 10x; (C) Animal A1 – Foco de calcificación en la región cercana al implante H&E 20x; (D) Animal A3 – Gran cantidad de fibroblastos dispuestos en bandas y grupos ordenados, características de un proceso cicatricial normal H&E 20x

El examen histopatológico del animal del B1 reveló un proceso cicatricial profundamente alterado en sus características normales, acompañado de inflamación severa aguda. Se observó formación de tejido colágeno cicatricial poco organizado, estando las fibras dispuestas multidireccionalmente y entremezcladas con material eosinofílico amorfo y con gran cantidad de células inflamatorias, principalmente neutrófilos (tanto íntegros como degenerados) junto con macrófagos, y en menor cantidad, linfocitos y plasmocitos. Se observaron múltiples focos de hemorragias y necrosis. (Figura 15). La región contigua al implante exhibió gran cantidad de material eosinofílico amorfo y diversos grupos de bacterias cocoides marcadamente basofílicas delimitadas por una pseudocápsula. Estas colonias bacterias fueron positivas a la coloración histoquímica de Gram (Figura 16).

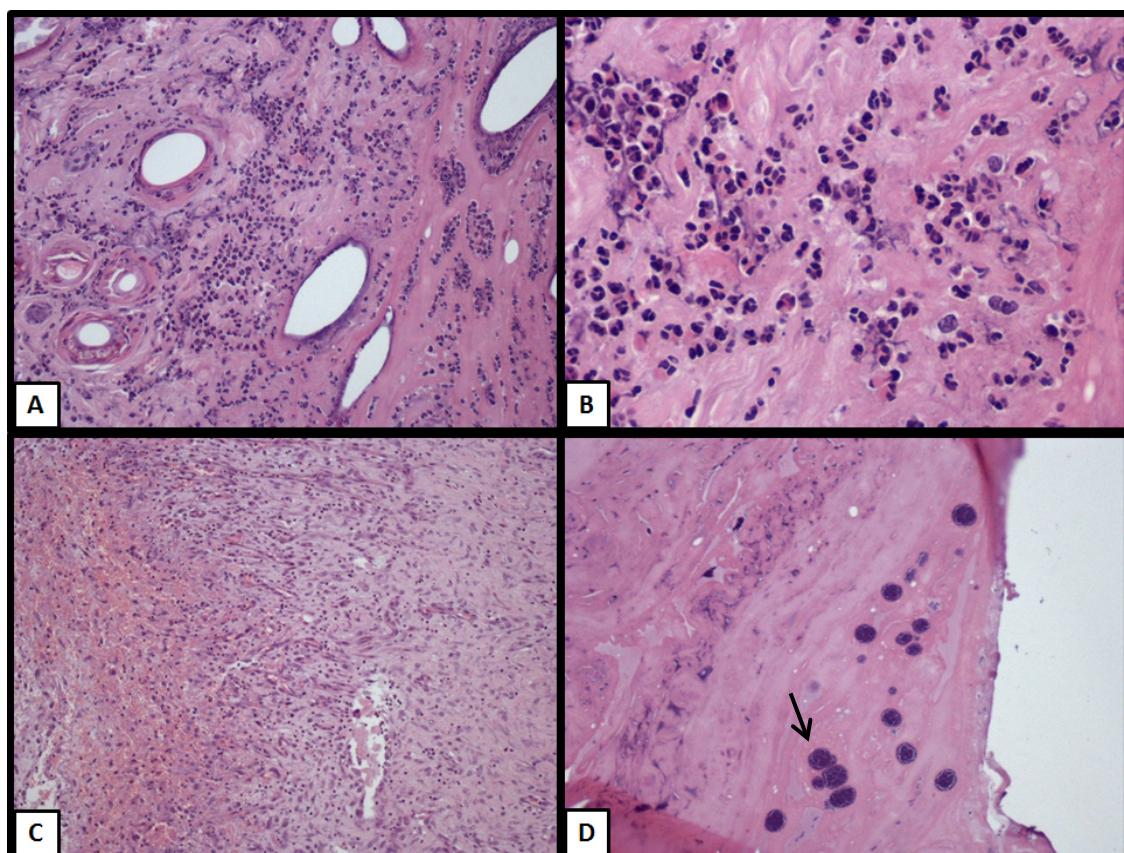


Figura 15: Región tisular anexa al tornillo implantado en el animal B1. **(A)** Tejido colágeno poco organizado entremezclado con material eosinofílico amorfo y gran cantidad de células inflamatorias H&E 10x; **(B)** Detalle del infiltrado inflamatorio. Se observa la predominancia neutróflica H&E 40x; **(C)** Áreas de hemorragias y necrosis, imagen de un proceso cicatricial alterado H&E 10x; **(D)** Gran cantidad de material eosinofílico amorfo (necrótico) y diversos agrupados de bacterias cocoides observables como puntos de color azul intenso (flecha) H&E 20x

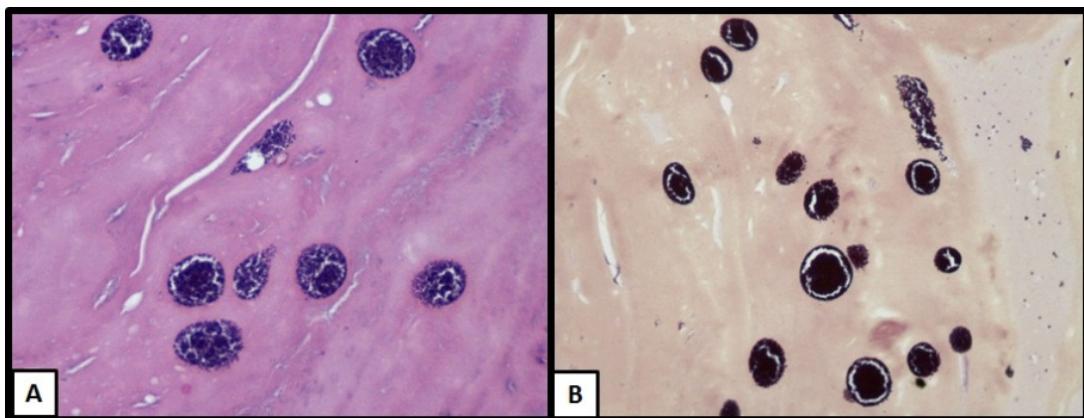


Figura 16: (A) Agrupados de bacterias coccoides basofílicas delimitadas por una pseudocapsula H&E 40x; (B) Estas colonias bacterianas son gram positivas (marcación en negro) Gram 40x

5.2.4. Microbiología

Los resultados de los exámenes microbiológicos tanto de la microbiota cero como del día de sacrificio están detallados en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados microbiológicos de muestras de la herida quirúrgica antes de la infección (microbiota cero) y en día del sacrificio

Animal	Microbiota Cero	Día del Sacrificio	
		7 dpi	9 dpi
A1	Sin crecimiento	Sin crecimiento	-
A2	Sin crecimiento	Sin crecimiento	-
A3	<i>Staphylococcus aureus</i> * / <i>Staphylococcus pyogenes</i> *	-	Sin crecimiento
A4	Sin crecimiento	-	Sin crecimiento
B1	Sin crecimiento	-	<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i> # / <i>Alcaligenes</i> ¥

* Se observan solo unas pocas colonias

Cultivo masivo

¥ Se observa un número elevado de colonias

6. Discusión

Los resultados del experimento *in vitro* indicaron que el implante ortopédico libera casi 70% del antibiótico en los primeros cuatro días en el medio SBF. Sin embargo es importante resaltar que el dispositivo permite una liberación continuada durante una semana en el medio SBF. Extrapolándose de manera hipotética este resultado para la aplicación del tornillo *in vivo*, este periodo de tiempo es precisamente el periodo crítico donde se infectan los implantes metálicos en las cirugías ortopédicas (Edwards, 2008), siendo el periodo diana para la aplicación de métodos preventivos, ya

que después de instalada la infección, la erradicación de la misma es difícil principalmente cuando el agente implicado es productor de biofilm (Perry, 1992).

La liberación *in vitro* del Linezolid® fue mantenida por una semana, lo que representa un periodo adecuado de tratamiento local profiláctico (Trampuz, 2006). La administración local de este fármaco permite además la asociación con antibioterapias preventivas sistémicas pero que, en este caso, es posible administrarlas a dosis menores, con escasas posibilidades de efectos secundarios indeseados.

Por otra parte, la estructura de acero 316L macroporoso de la pared del tornillo permitió una liberación relativamente sostenida en el tiempo. Probablemente eso es debido a que el antibiótico liofilizado contenido en su interior tiene que en primer lugar ser mojado y disuelto por los fluidos corporales y posteriormente permear a través de la pared del dispositivo, impidiendo una liberación de gran cantidad del fármaco en un corto espacio de tiempo. Además este suministro de liberación local y específica garantiza que el fármaco sea liberado en el lugar requerido.

Además, el diseño de este tornillo, al ser una estructura cilíndrica hueca, permite su utilización con otros materiales en su interior, que podrían optimizar el control de la liberación del antibiótico. De esta forma se podrían combinar materiales mesoporosos o biodegradables conteniendo el antibiótico. Estos materiales están siendo estudiados por diversos grupos de investigación como liberadores de moléculas terapéuticamente activas (Arruebo et al, 2011; Shaobin et al, 2009; Sahoo et al, 2003).

Sin embargo los experimentos *in vitro* son insuficientes para comprobar la eficiencia del implante en diversos aspectos. Era necesario comprobar las bondades de la asociación de estos materiales en un modelo animal.

En el modelo ovino, el dispositivo ortopédico demostró su actividad como barrera a la infección experimental producida por el *Staphylococcus aureus* ATCC6538 ya que los hallazgos macroscópicos y microscópicos de los animales del grupo A, que poseían el antibiótico en el interior del tornillo, fueron compatibles con una cicatrización normal de tejidos blandos, sin señal de infección bacteriana. Sin embargo el animal B1 presentó proceso inflamatorio moderado a severo evidente en la herida quirúrgica durante todo el periodo experimental. Las lesiones macroscópicas y microscópicas en este animal son características de infección bacteriana debido a la secreción purulenta, la necrosis y las hemorragias observadas en el estudio macroscópico y el infiltrado inflamatorio neutrofílico severo asociado a presencia de colonias bacterianas en el examen histopatológico.

Cabe destacar que uno de los animales del grupo A, el A3, demostró tener una contaminación bacteriana trans quirúrgica natural, como indican los resultados de la microbiota cero (crecimiento de *Staphylococcus aureus* / *Staphylococcus pyogenes*), además de la infección experimental postquirúrgica. Es destacable que el dispositivo logró controlar ambos desafíos microbiológicos, tanto pre como postquirúrgicos.

En el animal control (B1), sacrificado a los 9 dpi, se observó un crecimiento masivo bacteriano en esa fecha. Sin embargo, el resultado microbiológico indicó el crecimiento de dos bacterias distintas a la utilizada en la infección experimental (*Staphylococcus coagulasa negativa* / *Alcaligenes*). Dado que la microbiota cero fue realizada justo después de la colocación del implante y en el momento anterior a la infección experimental, es posible afirmar que el animal control no sufrió una contaminación trans quirúrgica y que su primer desafío microbiológico fue la propia infección experimental. Se proponen algunas hipótesis para este suceso. La cepa experimental de *S. aureus* podría haber proliferado inicialmente, produciendo lesión tisular y originando un proceso inflamatorio en la región donde se implantó el tornillo. Este proceso inflamatorio permitió la invasión y proliferación de otras bacterias que se encontraban en el ambiente hospitalario. Estas bacterias se tornaron predominantes en el microambiente, por competencia, sustituyendo a la infección instaurada por la cepa experimental. Se han descrito diversas formas de competencia entre bacterias, por ejemplo mediante producción de sustancias, incluso con actividad antibiótica, que inhiben el crecimiento de las demás, como es el caso del *Streptococcus pneumoniae*, que produce agua oxigenada inhibiendo el crecimiento de otras bacterias (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, y *Staphylococcus aureus*) del tracto respiratorio superior en el hombre (Park, 2008). Otra posibilidad sería que la cepa experimental de *Staphylococcus aureus* hubiese tenido una multiplicación muy rápida inicialmente, agotando los substratos necesarios y cambiando su ambiente de proliferación ideal. De esta forma otras bacterias del ambiente hospitalario, con sustrato y microambiente ideales distintos proliferaron a continuación. Un ejemplo de como interfieren los substratos disponibles en la multiplicación bacteriana es la disponibilidad de hierro en el microambiente, que puede determinar el crecimiento de un tipo bacteriano en detrimento de otro (Hibbing, 2010).

De cualquier manera, los presentes experimentos logran demostrar la efectividad del dispositivo ortopédico como liberador de antibiótico, alcanzando controlar y al mismo tiempo que el antibiótico liberado localmente evitase la aparición de infecciones

en el modelo ovino. Se plantea llevar a cabo en un futuro próximo un mayor número de experimentos para corroborar dichas hipótesis llevando a cabo cultivos bacterianos a lo largo de todos los experimentos para cuantificar la proliferación bacteriana a lo largo del tiempo tras la infección y para determinar la presencia de otros microorganismos.

7. Conclusiones

- 1) La combinación de antibiótico idóneo y un material adecuado para su liberación (tornillo macroporoso) ha demostrado su efectividad en el control de la infección bacteriana por *Staphylococcus aureus*, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 2) El acero macroporoso logra controlar la farmacocinética del antibiótico tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 3) El acero macroporoso evita la aparición de infecciones *in vivo*, al menos durante 9 días post infección.
- 4) Son necesarios más estudios que profundicen en este modelo para perfeccionarlo y poder aplicarlo a casos reales, tanto humanos como veterinarios.

8. Bibliografía

- Arruebo, M. Drug delivery from structure porous inorganic materials. 2011. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology; 4:1:16-30.
- Augat P, Merk J, Wolf S, Claes L. 2001. Mechanical stimulation by external application of cyclic tensile strains does not effectively enhance bone healing. Journal of Orthopaedic Trauma; 15:54-60.
- Cercenado E, Garrote FG, Bouza E. 2001. In vitro activity of linezolid against multiply resistant gram positive clinical isolates. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 47:77-81.
- Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. 1997. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. Journal of Orthopaedic Research; 15:577-84.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual Review of Microbiology; 41:435-464.
- Checketts RG, MacEachern AG, Otterburn M. 2000. Pin track infection and the principles of pin site care. In: De Bastiani GA, Apley G, Goldberg A. Orthofix External Fixation in Trauma and Orthopaedics. London: Springer.
- Crockarell JR, Hanssen AD, Osmon DR, Morrey BF. 1998. Treatment of infection with débridement and retention of the components following hip arthroplasty. Journal of Bone & Joint Surgery; 80A:910-922.
- Edwards C, Counsell C, Boulton C, Moran G. 2008. Early infection after hip fracture surgery, risk factors, costs and outcome. Journal of Bone & Joint Surgery; 90B:770-777.
- El-Kamel HA, Baddour MM. 2007. Gatifloxacin Biodegradable Implant for Treatment of Experimental Osteomyelitis: In Vitro and In Vivo Evaluation. Drug Delivery; 14:1-8.
- Gracia E, Laclériga A, Monzón M, Leiva J, Oteiza C, Amorena B J. 1998. Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. Journal of Surgical Research; 79:146-153.
- Gristina AG. 1994. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. Clinical Orthopaedics and Related Research; 298:106-18.

- Harwood PJ, Talbot C, Dimoutsos M, Sunderland G, Shaw D, Wilcox MH, Giannoudis PV. 2006. Early experience with linezolid for infections in orthopaedics. *Injury*; 37:818-826.
- Hibbing EM, Fuqua C, Parsek RM, Peterson SB. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*; 8:15-25.
- Kima K, Luuc KY, Changa C, Fangb D. 2004. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *The Journal of Controlled Release*; 98:47-56.
- Langlais F, Belot N, RoparsM , Thomazeau H, Lambotte JC, Cathelineau G. 2006. Antibiotic cements in articular prostheses: current orthopaedic concepts. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 28:84-89.
- Maia Viola DC, Cardozo Filho NZ, Nunes RT, Godoy FAC, Petrilli MT, Korukian M, Jesus-Garcia R. 2009. O uso de espaçadores com antibiótico no tratamento das infecções em endopróteses de joelho. *Acta Ortopédica Brasileira*; 17:3:144-148.
- Park B, Nizet V, Liu YG. 2008. Role of *Staphylococcus aureus* catalase in niche competition against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*; 190:2275-2278.
- Pearce AL, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. 2007. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European cells and materials*; 13:1-10.
- Perez LM, Laluez P, Monzón M, Puertolas JA, Arruebo M, Santamaría J. 2011. Hollow porous implants filled with mesoporous silica particles as a two-stage antibiotic-eluting device. *The International Journal of Pharmaceutics*; 409:1-8.
- Perry EL, Beck JP, Williams DL, Bloebaum RD. 2010. Assessing peri-implant tissue infection prevention in a percutaneous model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*; 92:397-408.
- Senneville E, Legout L, Valette M, Yazdanpanah Y, Beltrand E, Caillaux M, Migaud H, Mouton Y. 2006. Effectiveness and tolerability of prolonged linezolid treatment for chronic osteomyelitis: a retrospective study. *Clinical Therapeutics*; 28:1155-1163.

- Shaobin, W. 2009. Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and mesoporous material*; 117:1-9.
- Skoog DA, Leary JJ, Holler FJ. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Ed. McGraw-Hill, Madrid, España; 353-367.
- Szczypa K, Betlejewska K, Nowak K, Hryniwicz K. 2001. *In vitro* activity of linezolid against gram positive cocci isolated in Poland. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 48:932-935.
- Trampuz A, Zimmerli W. 2006. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture fixation devices. *Injury*; 37:59-66.

9. Agradecimientos:

A Pedro, Theo y Mika: mi familia, mis amores.

A mis padres por apoyarme en todo y ser un pilar en todo el trayecto de mi vida.

A Lluís Luján para quien tengo sólo palabras de agradecimiento y que compartió conocimientos y experiencias de tipo profesional y personal que fueron de gran valor. Muchas de estas páginas estarían vacías si no hubiera sido por su dedicación a ayudarme a concluir esta meta.

A Marta Pérez por ser una gran amiga y un gran apoyo, que supo guiarme muchas veces.

A Manuel Arruebo, Jesús Santamaría y los becarios del INA por sus importantes aportes y participaciones activas en el desarrollo de este trabajo.

A Paco Vázquez y todo el equipo del hospital de équidos por toda la ayuda en el proyecto y por la disponibilidad y generosidad de todos.

A Nerea Insausti por su colaboración y amistad.

A Charo Puyó y Santiago Becerra por toda la colaboración prestada.