

Curso 2003/04  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/11  
I.S.B.N.: 84-7756-599-6

HERIBERTO ÓSCAR ÁLVAREZ ALCOVER

Tratamiento *in situ* de la infección ósea:  
gentamicina *versus* ciprofloxacino

Directores

ESTHER SÁNCHEZ SÁNCHEZ  
CARMEN MARÍA ÉVORA GARCÍA



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS  
Serie Tesis Doctorales

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro de un proyecto de investigación titulado “Nuevas Formulaciones para el Tratamiento *in situ* de infecciones óseas” (Ref. SAF98-0167).

*A mis padres, Heriberto y Margarita, y hermanos, Juan Carlos y Elba.*

*A mis hijos, Oscar, que me enseña los caminos de la superación diaria, Puri, me aporta su fortaleza de carácter, y el pequeñín Víctor, nos da el punto de alegría.*

*Y por encima de todo a mi generosa esposa, Puri Vilar, su sacrificio me permite cumplir mis sueños.*

En el momento de finalizar este trabajo quiero expresar mi mas sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado en mayor o menor medida, en la realización de esta tesis y que han colaborado, en sus diferentes facetas, a que fuera posible que yo realizara este proyecto.

A mis directoras de tesis:

La Dra. Carmen M<sup>a</sup> Evora que me ha permitido formar parte de su gran equipo investigador, además de indicarme, corregirme y “empujarme” a la realización y finalización de esta tesis.

La Dra. Esther Sánchez, “alma mater” de este trabajo, que aunque le hice perder la paciencia en numerosas ocasiones, me llevó hasta el final.

A la Dra. Concepción Castro, compañera de fatigas y quirófanos y parte importante de la realización de esta tesis.

A mi compañero de fatigas traumatológicas en Hospiten Rambla, que me introdujo en este maravilloso grupo de investigación, Dr. Manuel Baro.

A la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Soriano, por su colaboración en el trabajo de laboratorio y en la recopilación de datos.

A la Dra. Laila Moujir, del Dpto. de Microbiología, por su magnifica aportación en la parte microbiológica de esta tesis.

A la Dra. Araceli Delgado, por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Dña. Margarita de la Rosa, por ayudarme en el papeleo burocrático.

Al Dr. Antonio Perera, anatomopatólogo, por su inestimable aportación para el estudio histológico.

A la Dra. Luisa Elena Delgado, radióloga, por sus observaciones y diagnóstico en el estudio radiológico.

A los Dres. Pedro Nuñez y Diego Lozano, del Dpto. de Química Inorgánica, por su ayuda con los difractogramas.

A la Dra. M<sup>a</sup> Rosa Arnau y al personal del Estabulario de la Facultad de Medicina, especialmente a D. Antonio Amador Pérez, por facilitarnos sus instalaciones y el cuidado de nuestros conejos.

A Dña. M<sup>a</sup> Luisa Díez Fuentes, especialista de Análisis Clínicos del Laboratorio Central del HUC y al personal que colaboró en la realización de los hemogramas.

Al Dr. Enrique Martínez por su ayuda en la búsqueda de un método adecuado para la determinación de la proteína C-reactiva en conejos.

A la Dirección y Gerencia de Hospiten Rambla por permitirme utilizar sus instalaciones.

Al servicio de Radiología de Hospiten Rambla, y en especial a los técnicos de Rayos: Nazaret, Graci, Maria, Begoña, Noelia y Patricia, que siempre estuvieron dispuestas a la realización de las radiografías.

Por último, a las dos mujeres más importantes en mi vida, mi madre, mi referencia por su constante ejemplo de trabajo y mi mejor mentor, y mi esposa, cuya generosidad y sacrificio me ha permitido realizar cada una de mis metas, ayudándome incluso en la realización de esta tesis.

## **INDICE**

### **INTRODUCCIÓN**

Infecciones óseas .....	1
1. Definición .....	1
2. Fisiopatología .....	1
3. Clasificaciones y Etiopatogenia .....	4
3.1. Clasificación según el tiempo de evolución .....	4
3.2. Clasificaciones según la patogenia y la localización de la infección .....	4
4. Etiología de las Osteomielitis .....	7
5. Diagnóstico: sospecha clínica y exámenes complementarios .....	8
5.1. Clínica y laboratorio .....	8
5.2. Diagnóstico por la imagen .....	9
6. Infecciones en prótesis articulares .....	13
7. Tratamiento .....	17
7.1 Antibioterapia .....	17
7.2. Tratamiento Quirúrgico .....	20
8. Biomateriales conteniendo antibióticos .....	25
8.1. Materiales No Biodegradables conteniendo antibióticos .....	27
8.2. Materiales Biodegradables conteniendo antibióticos .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	45
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Materiales .....	47
Métodos .....	48
1. Preparación de los implantes .....	48
1.1. Implantes de gentamicina .....	48
1.2. Implantes de ciprofloxacino .....	49

---

2. Estudios <i>in vitro</i> .....	49
2.1. Métodos analíticos .....	49
2.2. Determinación del contenido .....	51
2.3. Ensayos de cesión .....	52
2.4. Esterilización de los implantes .....	53
3. Estudios <i>in vivo</i> .....	59
3.1. Animales de experimentación .....	59
3.2. Protocolos de experimentación <i>in vivo</i> .....	59
3.3. Monitorización de parámetros biológicos y signos clínicos de infección .....	69
3.4. Valoración de los antibióticos .....	72
3.5. Análisis radiológico .....	73
3.6. Análisis histopatológico .....	73
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
Estudios <i>in vitro</i> .....	75
1. Gentamicina .....	75
1.1. Elaboración de implantes de gentamicina .....	75
1.2. Esterilización de los implantes de gentamicina .....	76
2. Ciprofloxacino .....	85
2.1. Elaboración de los implantes de ciprofloxacino .....	85
2.2. Esterilización de los implantes de ciprofloxacino .....	85
3. Discusión de los resultados de esterilización .....	96
Estudios <i>in vivo</i> .....	100
1. Protocolo de muestreo .....	100
2. Inducción, valoración y control de la infección ósea .....	104
2.1. Inoculación de <i>S. aureus</i> en el fémur de conejos .....	104
2.2. Parámetros biológicos y signos clínicos de infección .....	105
3. Tratamiento de la infección ósea .....	115

3.1. Cesión de ciprofloxacino <i>in vivo</i> .....	115
3.2. Valoración de la eficacia del tratamiento .....	119
4. Discusión de los resultados del estudio <i>in vivo</i> .....	151
<b>CONCLUSIONES</b> .....	157
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	159
<b>APÉNDICE I</b> .....	173
<b>APÉNDICE II</b> .....	197

## **INTRODUCCIÓN**

## **INFECCIONES ÓSEAS**

### **1. Definición**

Hacia mediados del siglo XIX Nelaton<sup>1</sup> introdujo el término osteomielitis (OM) al establecer una diferencia entre la inflamación de hueso cortical (osteítis) y la inflamación de la médula ósea (osteomielitis). Aunque la osteomielitis a menudo se origina en la porción medular de los huesos tubulares, en general se considera que el término significa infección tanto de la porción cortical como de la medular del hueso.

La osteomielitis es una infección caracterizada por la destrucción progresiva inflamatoria del hueso, con necrosis y formación de hueso nuevo en oposición e involucra los diferentes componentes óseos: periostio, cavidad medular y hueso cortical. El diagnóstico y tratamiento tempranos usualmente llevan a la resolución completa de la infección; no obstante, un retraso en el diagnóstico o una terapéutica inadecuada pueden ocasionar el desarrollo de una infección crónica, la que persiste por años, acompañándose de pérdida de la estructura normal del hueso y consecuentemente con alteraciones en la función. La osteomielitis crónica es una infección debilitante con un impacto substancial sobre la calidad de vida de los individuos afectados, ya que conlleva repercusiones de tipo físico, social, laboral y económico.

### **2. Fisiopatología**

La vascularización ósea explica la importancia de la osteomielitis hematógena en el hueso en crecimiento. La distribución vascular descrita por Trueta<sup>2,3</sup> presenta las diferentes manifestaciones de la osteomielitis según la edad. Antes de 1 año, los capilares perforan la placa de crecimiento y la infección se propaga fácilmente a la articulación. Entre 1 y 16 años no hay

comunicación vascular entre la epífisis y la metáfisis, de modo que en principio aquella esta protegida de la infección, salvo en las articulaciones de la cadera y del hombro, donde la metáfisis es intracapsular. En el adulto, una vez ha desaparecido el cartílago de crecimiento, se encuentran anastomosis entre los vasos metafisarios y epifisarios, lo que posibilita el compromiso articular. La OM puede provocar trombosis vasculares locales, que a su vez causan necrosis óseas que constituyen zonas de secuestro. A lo largo del tiempo, estos fenómenos anatomopatológicos pueden manifestarse con mayor o menor intensidad, lo que configura las diferentes formas anatomoclínicas de la OM: en la fase aguda predomina el proceso necrótico; en las formas crónicas, a la par de los fenómenos de necrosis, hay fenómenos de reconstrucción, y se crean abscesos centrales. La reacción del periostio depende de su propia vascularización, y por lo tanto es mucho más intensa en el niño que en el adulto<sup>4</sup>.

La infección que se produce en las *fracturas abiertas* obedece a varios mecanismos fisiopatológicos, según que la contaminación se produzca durante el traumatismo, durante la operación o después de ésta. Para evitar las complicaciones que supone una infección ósea, la mayoría de los traumatólogos consideran a toda fractura abierta como “una osteomielitis en potencia”, y por lo tanto, deben tomarse las medidas oportunas para evitarla.

De igual modo, en *cirugía ortopédica* se considera que la infección aguda y subaguda probablemente se deba a una contaminación preoperatoria en la que prevalecen los fenómenos de biocontaminación aérea. La infección tardía se debería a una contaminación por vía hematógena, que también puede intervenir en la infección aguda cuando existe una fuente al practicar la intervención quirúrgica. En las infecciones postoperatorias se ha considerado posible la participación de otros factores como un edema causante de estasis venosa, un hematoma en el sito operatorio asociado a restos necróticos, o un aumento del calor en la polimerización del cemento de metilmetacrilato.

En relación a la incidencia de infecciones osteoarticulares adquiridas en la comunidad se puede decir de forma resumida que: 1) el ambiente, tanto social como geográfico, es de gran importancia para determinar las tasas de aparición de casos clínicos; 2) los hombres son más susceptibles a este tipo de infecciones que las mujeres; 3) los niños son altamente susceptibles para desarrollar infecciones osteoarticulares; 4) el incremento en la edad y la existencia de enfermedades que alteran la función del sistema inmune condicionan un incremento en la susceptibilidad a estas infecciones y 5) aunque la presentación clínica de la osteomielitis aguda y de la artritis infecciosa aguda es similar, su epidemiología es lo suficientemente diferente como para sugerir que la biología del huésped y la interacción de éste con los microorganismos causales son también diferentes.

En el momento actual, la mayoría de las infecciones del sistema musculoesquelético son adquiridas en el hospital, durante la realización de algún procedimiento quirúrgico o bien adquiridas de manera intrahospitalaria durante el período perioperatorio.

Una estimación conservadora de la incidencia de infecciones en pacientes sometidos al reemplazo total de una articulación o intervenidos para la fijación interna de una fractura, indica que ésta es cercana a 200 casos por 10.000 operados; incidencia 10 veces superior a la osteomielitis hematógena y 100 veces mayor a la incidencia de tuberculosis ósea o articular. Para reducir la incidencia de las infecciones osteoarticulares de origen nosocomial, se ha puesto énfasis en reducir la carga bacteriana en los tejidos durante el procedimiento quirúrgico, esto mediante la utilización de antibióticos profilácticos, el empleo de mejores técnicas de asepsia preoperatoria, la mejoría en el ambiente de los quirófanos y el perfeccionamiento de la técnica quirúrgica y el material a implantar<sup>5</sup>.

### 3. Clasificaciones y Etiopatogenia

#### 3.1. Clasificación según el tiempo de evolución

La **Osteomielitis Aguda (OMA)** es un proceso infeccioso que afecta al hueso (la cavidad medular, el cortex y/o el periostio), de inicio reciente, sin destrucción ósea, que no ha recibido tratamiento y en el que predomina la sintomatología (fiebre, incluso estado séptico, dolor, impotencia funcional y signos inflamatorios locales). Se le supone una incidencia de 1:5000 individuos por debajo de los 13 años de edad y tiene una distribución bifásica: un pico de incidencia antes de los 20 años y un segundo pico después de los 50 años, que no parece haber variado con las nuevas prácticas de riesgo (adicción a drogas por vía parenteral). Es dos veces más frecuente en varones. En el 5-10% de casos evoluciona a la cronicidad.

La **Osteomielitis Crónica (OMC)** se refiere a procesos cuya sintomatología tiene una duración superior a 1-3 meses, que cursa con necrosis ósea y secuestros, con clínica larvada (puede predominar tan solo el dolor local y apenas presentarse síntomas sistémicos) y con un tratamiento inicial fallido. Se incluyen las OM asociadas a material extraño<sup>6</sup>.

#### 3.2. Clasificaciones según la patogenia y la localización de la infección

La clasificación mas utilizada es la de *Waldvogel et al.*<sup>7</sup>, que divide la OMA en tres categorías, según sea su causa:

1. **OM Hematógena**: es propia de niños y adolescentes y se localiza especialmente en las metáfisis de los huesos largos, precedida de pequeños traumas causantes de zonas hipovascularizadas donde, tras una bacteriemia transitoria cuyo punto de partida es en general cutáneo (forúnculo, herida infectada o panadizo) o bien una otitis,

pueden asentarse los microorganismos. Cuando se presenta en el adulto, la localización es predominantemente vertebral, y si es de huesos largos, se localiza principalmente en la diáfisis. Factores predisponentes son: infección urinaria (sobre todo en ancianos), diabetes, hemodiálisis, adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), infección de catéteres y endocarditis.

2. **OM focalizada de contigüidad sin compromiso vascular:** es propia de la edad adulta y su etiología suele ser polimicrobiana; pueden evolucionar a la cronicidad. Su origen puede ser:
  - a) secundario a foco contiguo: celulitis, úlceras varicosas, panadizos, osteítis púbicas por cirugía ginecológica, o
  - b) por inoculación directa o primarias: infección postoperatoria, punciones directas, fracturas abiertas, infección de implantes en la fijación interna de fracturas e infección de prótesis articulares.
3. **OM focalizada de contigüidad con compromiso vascular:** asociada a insuficiencia vascular y neuropática. Se presenta en adultos mayores de 50 años; los antecedentes de diabetes mellitus y la insuficiencia vascular son frecuentes; afectan a huesos del pie tras mínimos traumas y la etiología es a menudo polimicrobiana.

*La clasificación de Cierny et al.*<sup>8</sup> tiene en cuenta el tipo de afección o definición anatómica de la extensión del proceso y una definición fisiológica de la situación de base del huésped o paciente en el aspecto sistémico y local.

La clasificación anatómica contempla cuatro estadios:

- **Estadio 1 u Osteomielitis medular:** la infección se sitúa en el interior de la estructura tubular ósea, ricamente vascularizada, no existe

afectación de hueso cortical, responde bien al tratamiento médico y/o métodos quirúrgicos descompresivos (Ej. OMA hematológica).

- **Estadio 2 u OM superficial:** caracterizada por la afectación en superficie de un hueso cortical, no en todo su grosor (Ej. OMC subyacente a una úlcera de decúbito).
- **Estadio 3 u OM localizada:** en ella todo el grosor de la cortical participa del proceso infeccioso, como un sequestro cortical, y su exéresis no comporta un compromiso de la estabilidad ósea (Ej. orificio de anclaje de un elemento de fijación externa).
- **Estadio 4 u OM difusa:** todo el perímetro cortical de un hueso diafisario está afectado, es decir que la afección ósea es difusa y por lo tanto, su resección implica inestabilidad ósea (Ej. pseudoartrosis séptica).

Estas cuatro formas anatómicas pueden combinarse con tres situaciones fisiológicas sistémicas o locales del huésped:

- **Huésped tipo A:** paciente normal, sin compromiso inmunitario sistémico o local. Es un paciente sano, con buena cobertura de tejidos vascularizados a nivel de la lesión osteítica ( $A_{S,L}$ ).
- **Huésped tipo B:** cuando existe un compromiso sistémico que altera su inmunidad ( $B_S$ ) o un compromiso local ( $B_L$ ), pudiendo combinarse las dos circunstancias ( $B_{S,L}$ ). El paciente tipo B debe revertirse en tipo A antes de instaurar el tratamiento quirúrgico. Los factores que afectan la inmunidad, el metabolismo y la vascularización local son :
  - a) Factores sistémicos: malnutrición, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, diabetes, hipoxia crónica, enfermedades inmunes, neoplasia, edades extremas, deficiencias inmunitarias o inmunodeprimidos y tabaquismo.
  - b) Factores locales: linfedema crónico, estasis venosa, alteración de los grandes vasos, arteritis, fibrosis postradioterapia,

enfermedad de los pequeños vasos y pérdida total local de sensibilidad.

- **Huésped tipo C:** paciente que cuando, siendo A o B, la morbilidad del tratamiento probablemente sea superior a la originada por la propia enfermedad; en este caso los pacientes no son candidatos a la cirugía, sino a un tratamiento paliativo por vía oral con antibióticos, a un simple control médico o a una amputación.

#### 4. Etiología de las Osteomielitis

El *Staphylococcus aureus* sigue siendo el germen patógeno más frecuente en todas las formas clínicas de osteomielitis, aunque su prevalencia ha disminuido en los últimos años. *S. epidermidis* suele asociarse a infección de biomateriales e implantes metálicos. Los gérmenes Gram-negativos tienen en la actualidad un creciente protagonismo y se aíslan con frecuencia en neonatos, en osteomielitis postraumáticas y posquirúrgicas de origen nosocomial, en infecciones vertebrales y en la anemia de células falciformes (*Salmonella* sp), así como en pacientes con enfermedad de base como cirrosis, diabetes e insuficiencia renal crónica. *P. aeruginosa* es común en las formas posquirúrgicas, en el pie diabético, en heridas por punción de los pies, y en los adictos por vía parenteral. *P. multocida* se ha aislado en infecciones tras mordeduras de animales. Los estreptococos y *H. influenzae* se observan en la infancia. *M. tuberculosis* y *Brucella* sp son frecuentes en nuestro medio, en especial cuando el hueso afectado es la columna y las sacroilíacas. Los hongos raras veces causan infecciones óseas, excepto en zonas endémicas de micosis sistémicas (histoplasmosis, coccidiomicosis). La presencia de *C. albicans* debe sospecharse en pacientes con enfermedad de base, en los cuales el cultivo es negativo y no responden a un tratamiento convencional. Excepcionalmente, los parásitos (*Echinococcus granulosus*) pueden ser el

agente etiológico. En las osteomielitis esternales, además de los microorganismos convencionales, ocasionalmente se aíslan micobacterias atípicas, micoplasmas y ureaplasmas. Alrededor del 20 % son infecciones polimicrobianas; debe sospecharse esta situación en las infecciones crónicas recidivantes manipuladas quirúrgicamente, en las secundarias a fracturas abiertas de las extremidades inferiores, en las que afectan a los huesos de la cara y/o el pie por contigüidad, en especial en el pie diabético. La importancia de los anaerobios se ha destacado recientemente y obliga a cultivar todas las muestras en medios adecuados para su aislamiento, en especial ante infecciones polimicrobianas, asociadas a úlceras por decúbito, isquemia vascular, neuropatía periférica, mordeduras, en las osteomielitis de cráneo o cara y en pacientes en los que las heridas se han manipulado repetitivamente. En las osteomielitis mandibulares debe descartarse la actinomicosis<sup>9</sup>.

## **5. Diagnóstico: sospecha clínica y exámenes complementarios**

### **5.1. Clínica y laboratorio**

La sospecha diagnóstica se desprende del cuadro clínico y de los datos analíticos mas relevantes: fiebre, que no tiene por qué ser elevada, dolor local, signos inflamatorios, impotencia funcional (si se asocia artritis séptica o en aflojamientos sépticos protésicos), leucocitosis (ausente en la OMC), anemia, velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR) elevadas (el descenso de la PCR en el curso del tratamiento es un signo de buen pronóstico, que se produce de forma mas precoz que la VSG que se mantiene con valores elevados mucho mas prolongados). En las OM posquirúrgicas se presentan signos locales tales como dolor o modificaciones de la herida operatoria; pueden evolucionar hasta la formación de un absceso

a nivel del segmento óseo operado, con disyunción de los bordes de la cicatriz, o bien hacia una tumefacción visible con modificaciones de la piel y eritema en los bordes de la herida. El desarrollo de OM puede verse favorecido por la necrosis cutánea que deja expuesto el material de osteosíntesis o la prótesis articular empleada en la operación.

La confirmación etiológica es imprescindible en la OM. El hemocultivo es positivo en el 40-50% de las OMA hematógenas del niño y en el 25% de las vertebrales, mientras que en las crónicas prácticamente siempre es negativo. En los casos con hemocultivo negativo debe establecerse el diagnóstico etiológico mediante aspiración del pus del hueso o partes blandas obtenido por punción o por biopsia ósea; la rentabilidad del cultivo percutáneo es del 70%, por lo que a menudo se requiere más de una punción para establecer la etiología. En determinadas situaciones, además de usar los medios de cultivo convencionales, se deben hacer cultivos en medios especiales para micobacterias, hongos y *Brucella*. Los cultivos obtenidos a partir del exudado de una úlcera o de un trayecto fistuloso son poco valorables, ya que la correlación con los obtenidos mediante biopsia ósea es pobre.

## **5.2. Diagnóstico por la imagen**

### **5.2.1. Radiografía**

Los signos radiográficos siempre aparecen más tarde que los clínicos. En el estudio radiográfico deben valorarse el hueso y las partes blandas. El absceso intramedular originado tras una diseminación hematógena no es visible en su inicio. Durante la primera semana, cuando el pus y el edema se extiendan hacia el exterior, podrá apreciarse una pérdida de continuidad en la cortical, obliteración y desplazamiento de los planos musculares profundos, hinchazón muscular y edema subcutáneo. Las imágenes óseas que la

radiología puede aportar no se perciben hasta la segunda o tercera semana, cuando la pérdida de masa ósea ya supera un 30%. También se observa la respuesta del periostio y de la médula, produciendo un depósito de hueso nuevo (involucro). La presencia de un área con densidad aumentada indicaría hueso muerto, reactivo o ambos. En niños, los cambios en tejidos blandos y la neoformación perióstica son más llamativos. En los más pequeños, la ausencia parcial de osificación de las epífisis hace más difícil identificar la destrucción ósea. Al encontrar reacción perióstica y destrucción cortical siempre hay que descartar una neoplasia. Mientras que en esta entidad hay gran desproporción entre ambos factores, en la infección la formación perióstica es proporcional a la destrucción cortical.

En la osteomielitis subaguda, han evolucionado tanto el proceso destructivo como el reparador. En el absceso de Brodie es característico un halo de densidad aumentada, debido a que la formación perióstica rodea el centro tenue donde se encuentra la infección. En la osteomielitis crónica hay una gran regeneración ósea y deformidades muy llamativas. Los signos característicos del estado crónico son el secuestro y el involucro.

En la vecindad de una prótesis debemos sospechar una osteomielitis incipiente si hay una progresiva reabsorción en su entorno. Si bien es una buena técnica diagnóstica para el seguimiento de la enfermedad establecida, su utilidad es limitada en la fase aguda.

En los casos de radiologías simples normales o de difícil interpretación por la existencia de fracturas múltiples, alteraciones de la consolidación ósea, intervenciones múltiples, estadios tempranos del proceso, tratamientos antiinflamatorios y antibióticos previos que enmascaren la evolución natural de la enfermedad, debemos recurrir a otras pruebas de imagen<sup>10</sup>.

### 5.2.2. Ecografía

En los últimos años se tiende a la incorporación de los ultrasonidos en la detección de la osteomielitis, con los que se puede comprobar la presencia de colecciones anormales de líquidos, alteraciones en los tejidos blandos o irregularidad de la cortical ósea. La acumulación de pus en el área subperióstica, en niños y adolescentes, produciría zonas hipoeoicas y anecoicas, con elevación y espesamiento del periostio, dando aspecto de *sándwich*.

Esta técnica es útil igualmente en casos de OM con material metálico de osteosíntesis o prótesis, al permitir la punción-biopsia guiada por Eco sin interferencias del material, como en la tomografía axial computarizada (TAC), para la obtención de especímenes para estudio microbiológico<sup>11</sup>.

### 5.2.3. Gammagrafía ósea

Tiene un 10% de falsos negativos cuando la clínica es de menos de 48 horas. No proporciona detalles anatómicos, pero es de gran utilidad y con apenas efectos secundarios. Cuando se realiza con  $^{99m}\text{Tc}$  es poco específica pero permite la detección temprana del proceso y diferencia la OM de la celulitis (sensibilidad del 95%). Si se realiza con  $^{67}\text{Ga}$ , aunque puede dar falsos positivos por fracturas, tumores y tras practicar cirugía, apoya el diagnóstico de infección cuando la captación es de mayor intensidad que la obtenida mediante  $^{99m}\text{Tc}$ . La gammagrafía con leucocitos autólogos marcados con  $^{111}\text{In}$  o con  $^{99m}\text{Tc}$ -hexametilpropileno-amina-oxina ( $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO) tiene una gran especificidad (supera al 95%) y una sensibilidad mayor del 80%. Si una gammagrafía con leucocitos marcados resulta negativa es muy poco probable que se trate de una infección, en cambio cuando resulta positiva no

siempre se puede establecer la diferencia entre un proceso inflamatorio o una infección.

#### **5.2.4. Tomografía axial computarizada**

La TAC es más sensible que la radiología, permite la detección de lesiones en fases más precoces, delimita mejor la extensión de la infección (en especial en las partes blandas), la destrucción cortical, la proliferación perióstica, la presencia de gas y, en especial, la formación de sequestros. Se utiliza también como guía para la realización de biopsia ósea en lugares inaccesibles (columna).

#### **5.2.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)**

La RMN es tan sensible como la gammagrafía y su especificidad es muy elevada; además, es el mejor procedimiento para delimitar la extensión anatómica de la infección, pudiendo detectar fístulas, abscesos y las celulitis infecciosas, sobre todo en las osteomielitis vertebrales, donde constituye la técnica de elección. Sin embargo, como sucede con la TAC, no siempre distingue entre osteomielitis y tumor o fractura en fase de consolidación, y en el pie diabético tampoco distingue la infección de la osteopatía neuropática; por otro lado, en presencia de cuerpos metálicos (prótesis de cadera), las imágenes quedan artefactadas, al igual que con la TAC, por lo que es difícil establecer el diagnóstico de osteomielitis.

## 6. Infecciones en prótesis articulares

La implantación de prótesis articulares en rodillas, caderas y hombros constituye una práctica habitual en todos los hospitales. La infección de prótesis articulares tiene lugar fundamentalmente, en el acto quirúrgico y por gérmenes de la flora cutánea del propio paciente<sup>12</sup>. Por lo tanto, las medidas preventivas, tanto desde el punto de vista técnico (quirúrgico y ambiental) como de la profilaxis antibiótica, hacen que las tasas de infección sean realmente bajas (entre el 2 y 3%)<sup>13</sup>. Las infecciones de prótesis articulares representa una de las complicaciones mas temidas y catastróficas en este tipo de cirugía, ya que no permiten un reimplante en corto espacio de tiempo, producen grandes defectos esqueléticos, disminuyen la calidad de vida del paciente e incrementan los costes sanitarios en 6 veces<sup>14</sup>.

Los factores de riesgo de infección pueden ser locales (la prótesis de rodilla es más susceptible de infección, tasas del 2,5% respecto al 1% en caderas) o debidos a las características del paciente (artritis reumatoide, diabetes mellitus, corticoterapia crónica, obesidad, malnutrición y edad avanzada)<sup>15</sup>.

Las infecciones de los implantes ortopédicos no se curan simplemente con antibióticos. Se han desarrollado diversas hipótesis relacionadas entre si para explicar este fenómeno<sup>16</sup>:

- **Los antibióticos no llegan a los implantes:** al no estar vascularizados, los antibióticos y elementos inmunes sólo llegan por difusión desde los tejidos próximos. Este principio también es aplicable al hueso con OMC, puesto que está necrótico y carece de vascularización.
- **Los biomateriales disminuyen la eficacia del sistema inmune:** el polimetilmetacrilato inhibe la activación del complemento y la fagocitosis, infectándose más fácilmente que los metales

ortopédicos<sup>17</sup>. Éstos se infectan según su citotoxicidad, siendo el riesgo, de mayor a menor, con las aleaciones de acero inoxidable, cromo-cobalto, y titanio.

- **Adhesión y colonización bacteriana de la superficie de los implantes:** sobre la superficie de un biomaterial compiten por adherirse las bacterias (que pueden llevar a la colonización e infección del sustrato al que se adhieren) y las células del huésped (integración tisular: osteointegración), en lo que se conoce como “*la carrera por la superficie*”<sup>18</sup>. En muchos casos, los microorganismos secretan en su superficie materiales viscosos y pegajosos, que suelen ser polisacáridos, y en algunos casos proteínas. Esta capa se denomina cápsula (slime), capa mucosa o más ampliamente, glicocálix, que se extiende alrededor de la célula. La composición varía en los diferentes microorganismos y puede ser gruesa o fina, rígida o flexible. El glicocálix desempeña varias funciones en las bacterias, entre ellas la de permitir la adherencia o fijación de algunos microorganismos patógenos a sus hospedadores, la resistencia a la acción de las células fagocitarias del sistema inmunitario y a la penetración de los antibióticos (los antibióticos y elementos del sistema inmune atraviesan esta capa con gran dificultad, cronificándose la infección). Por tanto, el glicocálix es un factor fundamental tanto en la infección de biomateriales y tejidos comprometidos, como en la elevada susceptibilidad a la infección de los implantes ortopédicos, y en la resistencia de dichas infecciones a las defensas del huésped y a la terapéutica antibacteriana<sup>19</sup>.
- **Los materiales** menos biocompatibles (menor adherencia de células del huésped) o de superficie más porosa se infectan más fácilmente.

- **Bacterias intracelulares:** los estafilococos y otros patógenos fagocitados son capaces de evitar su lisis, viviendo en situación vegetativa en el interior de los fagosomas de los macrófagos, e incluso de los osteoblastos<sup>20</sup>, protegidos de la mayoría de los antibióticos y de las sustancias del sistema inmunitario. Estas bacterias intracelulares son las responsables del mantenimiento de la infección y de las recidivas y reactivaciones periódicas. Para combatirlas habrán de utilizarse combinaciones de antibióticos de alta penetración y actividad intracelular (rifampicina, cotrimoxazol, ofloxacino, ciprofloxacino, clindamicina, macrólidos) y la retirada de la prótesis infectada como medida erradicadora de la infección.

Tsukayama et al.<sup>21</sup> clasifican la infección asociada a prótesis articular según el tiempo de evolución desde la intervención, en:

- *Tipo 1 o infección precoz:* cuando aparece en el primer mes postoperatorio. Se produce durante la cirugía.
- *Tipo 2 o infección tardía crónica:* entre el mes y el año postoperatorio. Es subclínica en la mayor parte de los pacientes. Como en el estadio 1, se considera de adquisición nosocomial, pero tarda en manifestarse por el pequeño inoculo o la baja virulencia del microorganismo que la causa.
- *Tipo 3 o hematógena aguda:* la infección se presenta más allá del año de la intervención y en la mayoría de las ocasiones es secundaria a diseminación hematógena a partir de otro foco (urinario, bucodental, cutáneo, etc.) que llega a una intervención previamente sana.
- *Tipo 4:* corresponde a cultivos positivos en pacientes a los que se les recambia la prótesis sin sospecha de infección.

Clínicamente, las manifestaciones dependen del estadio de la infección siendo más intensas en el tipo 1. Se presenta con dolor articular a la marcha

que no cede con el reposo (95%), fiebre (43%), derrame sinovial (38%) y drenaje purulento por la herida o fistula (32%). Los parámetros hemáticos como la VSG, PCR y leucocitosis suelen estar elevados. La PCR tiene el mayor valor predictivo positivo. La VSG y la PCR incrementan sus valores con la simple intervención; la VSG puede permanecer así durante meses, pero la PCR regresa a la normalidad en unas 3 semanas, debiendo sospecharse la infección si no es así; igualmente durante el tratamiento, su descenso es índice terapéutico favorable<sup>22</sup>. El diagnóstico precoz es primordial para iniciar cuanto antes el tratamiento y evitar retirar la prótesis. Dado que la clínica es indiferente en ocasiones a un aflojamiento aséptico, se hace necesario realizar pruebas complementarias.

La radiología simple muestra alteraciones a los 3-6 meses de iniciarse el proceso, por lo tanto, solo son útiles en las formas crónicas: radioluscencias mayores a 2 mm en la interfase cemento-hueso (línea de descementación) o hueso-prótesis, cambios en la posición de los componentes de la prótesis, reacción perióstica, osteólisis periprotésica y defectos óseos cavitarios y/o segmentario. En la Artrografía se pueden observar comunicaciones anómalas en la cavidad articular y defectos en la interfase cemento o prótesis con el hueso. La Ecografía es útil en la localización de abscesos y como guía para su aspiración percutánea con aguja.

La gammagrafía con <sup>99m</sup>Tc y <sup>67</sup>Ga es poco específica, siendo mucho más sensible el estudio con leucocitos marcados, cuya negatividad excluye a la infección.

Debe intentarse aislar el microorganismo por obtención del líquido articular o por cultivo de tejido óseo. El estudio se completa con los datos anatomopatológicos de muestras perioperatorias con la observación de polimorfonucleares (PMN) (recuentos superiores a 10 por campo) en algunas de las 5 muestras de tejido periprotésico obtenidos<sup>23</sup>.

## 7. Tratamiento

A pesar de los importantes avances logrados en el conocimiento y manejo de la osteomielitis, aún nos enfrentamos a un proceso con problemas de tratamiento y elevada morbilidad, en particular en su forma crónica. Las tasas de curación obtenidas son inferiores a las de otras infecciones y no se logra esterilizar el hueso en más del 70% de las ocasiones. El éxito terapéutico se relaciona con la precocidad en el diagnóstico, el tipo evolutivo (aguda o crónica), el agente causal, las características del foco de infección, la presencia de material de implante y el acierto en las medidas tomadas. El tratamiento de la osteomielitis comprende el uso de antimicrobianos, cirugía y rehabilitación física, psíquica y social<sup>24</sup>.

### 7.1 Antibioterapia

En el hueso normal, no existe ninguna barrera anatómica o funcional que impida la penetración de los antibióticos. Incluso, se ha visto una estrecha relación entre la concentración sérica y la ósea, de tal manera que los hallazgos en el suero en la fase de meseta pueden predecir la cantidad de antibiótico en el hueso. Sin embargo, en la osteomielitis hay que considerar las peculiaridades del foco de infección como acidez, isquemia y bajo potencial "redox", que pueden hacer fracasar la acción beneficiosa del antibiótico. Tampoco ha de olvidarse que estamos ante una infección por bacterias que pueden adherirse al material, mediante la formación del glicocálix, protegiéndose así de la acción de los antibióticos y mecanismos de defensa naturales. Estas peculiaridades, junto a la supervivencia intracelular y la capacidad de mostrar resistencias fenotípicas de algunos agentes causales como el *S. aureus*, explican el fracaso de los antimicrobianos, la persistencia

de la infección y la necesidad de altas dosis y tratamientos combinados y prolongados<sup>25</sup>.

El antibiótico seleccionado debe ser activo frente al microorganismo causal, alcanzar concentraciones superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) en el foco de infección, mantenerlas en los intervalos entre dosis y permanecer estable en el medio. Además, por la larga duración del tratamiento y las dosis elevadas que se emplean hay que tener en mente la tolerancia y la vía de administración del propio antimicrobiano, con disponibilidad de formas orales y bajo coste. El seguimiento de estas normas puede ser suficiente para alcanzar la curación de las formas agudas, pero no así en las crónicas que generalmente precisan cirugía.

Respecto al tratamiento antimicrobiano, es conocido que en la osteomielitis aguda requiere una actuación empírica inmediata, previa recogida de muestras adecuadas, mientras que en la crónica es preferible aguardar a conocer el diagnóstico etiológico. Las pautas y duración de la antibioterapia no están bien establecidas, pues no hay ensayos clínicos concluyentes, aunque se acepta la necesidad de dosis altas durante periodos prolongados (al menos seis semanas). Los cambios en la etiología de la osteomielitis, el desarrollo de resistencias y la aparición de nuevos antibióticos, sobre todo orales con excelente biodisponibilidad, hacen necesario la revisión periódica de la idoneidad del tratamiento.

En la actualidad, existe un gran número de antibióticos para el tratamiento de la osteomielitis. En las infecciones por *S. aureus* productores de penicilinas (90% de los aislados) los betalactámicos han confirmado su eficacia. Son útiles las penicilinas isoxazólicas o asociadas a inhibidores de betalactamasas y las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación. Otras alternativas son los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina), cotrimoxazol, clindamicina (con actividad antiadherente), fosfomicina, ácido fusídico, rifampicina y las fluorquinolonas. En infecciones por estafilococos resistentes a la metilina

recurremos a glucopéptidos, cotrimoxazol o a combinaciones de fluorquinolonas y rifampicina. La terapia secuencial endovenosa/oral es posible realizarla en la mayoría de las ocasiones, excepto con los glucopéptidos, aunque la presentación intramuscular de teicoplanina y su dosis única diaria han permitido mantener tratamientos ambulatorios prolongados con escasos efectos adversos. La progresiva insensibilidad de los estafilococos a los antibióticos está llevando a la búsqueda de nuevas moléculas activas como quinolonas (moxifloxacino, gatifloxacino, gemifloxacino), sinergistinas (dalfopristina, quinupristina) y oxazolidinonas (linezolid), entre otras. En el caso de las bacterias Gram-negativas aerobias o facultativas y en las formas polimicrobianas, son muy útiles las cefalosporinas de 3ª (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) o 4ª generación (cefepima), las fluorquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino y pefloxacino), las penicilinas asociadas a inhibidores de betalactamasas (amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam), los carbapenémicos (imipenem/cilastatina y meropenem) y aztreonam (activo sólo frente a bacilos Gram-negativos). Piperacilina/tazobactam, ceftazidima y cefepima tienen actividad sobre *P. aeruginosa* por lo que estarían indicadas en los ADVP, inmunodeprimidos y en las infecciones localizadas en los pies de los diabéticos. Los carbapenémicos también tendrían esta indicación pero el alto coste y su corta vida media limitan su uso.

**Las fluorquinolonas**, sin duda alguna, han supuesto la revolución más importante en el tratamiento de la osteomielitis en los últimos años. Sus excelentes características farmacocinéticas (alta biodisponibilidad por vía oral, prolongada vida media que incluso permite una dosis diaria, con excelente penetración ósea e intracelular) han posibilitado hacer tratamientos ambulatorios, total o parcialmente, con buenas tasas de curación y pocos efectos adversos, solos o combinados. Sin embargo, las nada despreciables tasas de resistencia surgidas con algunos microorganismos obligan a la

cautela en su uso<sup>26</sup>. Además su uso en niños se ve limitado por la posibilidad de lesionar al cartílago articular inmaduro y de la placa fisaria generando alteraciones de crecimiento, y en adultos tendinopatías (tendinitis y ruptura del tendón de Aquiles)<sup>27</sup>, corroborado por estudios experimentales<sup>28</sup>.

## 7.2. Tratamiento Quirúrgico

La mayoría de las OMA hematógenas curan con antibióticos, sin precisar cirugía, la cual sí estaría indicada en las siguientes situaciones: ausencia de diagnóstico etiológico, mala respuesta al tratamiento médico a las 48-72 horas, presencia de absceso intraóseo o subperióstico y/o artritis y en las OM por contigüidad. Las osteomielitis que se asientan sobre implantes metálicos (clavos, placas, artroplastias articulares, etc.) requerirán casi siempre, la extracción del cuerpo extraño para curar la infección<sup>9</sup>. Si ha precisado un desbridamiento amplio, la cavidad se rellenará con los métodos que posteriormente se describen.

La OMC difícilmente cura con tratamiento antibiótico y precisa cirugía. El tratamiento quirúrgico va encaminado a eliminar los tejidos desvitalizados, obliterar los espacios muertos y lograr la estabilidad funcional. Una vez indicado, es importante saber el momento adecuado de efectuarlo y el tipo de intervención más correcta. La rehabilitación física es necesaria con el fin de potenciar la funcionalidad de la parte afectada. Lo mismo ocurre con el apoyo psicológico que persigue la prevención o curación del componente ansioso-depresivo generado por: 1) la larga hospitalización y el desarraigo familiar, profesional y social que conlleva, 2) la prolongada inmovilización con complejos sistemas de fijación y 3) el pronóstico incierto de la lesión. Por todo ello, el futuro pasa por el diseño de sistemas que impidan la creación o sean capaces de eliminar la adherencia bacteriana y la síntesis del biofilm, permitiendo hacer llegar el antibiótico a su lugar de destino con los mínimos

efectos secundarios y mayor biodisponibilidad y que a su vez, induzcan la neoformación ósea, en los defectos creados por la infección o por el tratamiento quirúrgico que ha precisado; con el fin de minimizar los daños colaterales que implica esta patología, por el bienestar de nuestros enfermos y para mejorar su calidad de vida<sup>29</sup>.

Las premisas del tratamiento quirúrgico, enunciadas por Norden<sup>30</sup>, son:

1. Correcto y completo diagnóstico microbiológico.
2. Corrección y modificación de los mecanismos de defensas del huésped, locales y generales.
3. Definición anatómica de la extensión de la enfermedad local, tanto en el hueso como en las partes blandas.
4. Tratamiento antibiótico correcto.
5. Exéresis quirúrgica del tejido necrótico o pobremente vascularizado.
6. Obliteración del espacio muerto.
7. Restablecer la estabilidad funcional esquelética.
8. Rehabilitación.

Nos centraremos en el punto 5º (resección o desbridamiento quirúrgico del foco séptico) y, sobre todo, el 6º (relleno de las cavidades y defectos óseos sépticos), parte de los objetivos de este trabajo.

### **7.2.1. Resección del foco séptico óseo o articular (Resección Focal)**

El tratamiento quirúrgico debe procurar la exéresis de los trayectos fistulosos, del tejido de granulación reactivos y de las zonas de hueso desvitalizado e infectado. Se trata de una exéresis minuciosa de todo este material patológico que Judet definió como *resección "carcinológica" del foco de osteítis*: eliminar el máximo posible de material infectado-avascular para que la antibioterapia instaurada sea capaz de eliminar el resto de

microorganismos localizados en áreas de tejido bien vascularizadas. En casos en que la resección focal se exponga al riesgo de una fractura, debe reforzarse el hueso afectado mediante yesos u ortesis o preferentemente con fijadores externos.

### **7.2.2. Relleno de la cavidad o defecto óseo segmentario**

El tratamiento del defecto originado tras el desbridamiento, tiene el objetivo de eliminar el espacio muerto que supone la cavidad residual que de permanecer, favorecerá la persistencia de los microorganismos y la formación de un nuevo foco de osteítis u osteoartritis. Diversos factores condicionan tal objetivo: el gran tamaño de la cavidad, la deficiente vascularización de sus paredes, la virulencia de los gérmenes, su capacidad de adherencia a los cuerpos extraños, la tendencia al acantonamiento de los mismos en el hueso y la posibilidad de debilitamiento del hueso debido al proceso de osteítis y a su resección, con riesgo de fractura.

En la actualidad hay diferentes tipos de oclusión de cavidades osteoarticulares sépticas, que han ido evolucionando en la historia y que pasaremos a describir<sup>31</sup>:

- 1) Puesta a plano y herida abierta para granulación secundaria por segunda intención:** resección del foco séptico, dejándose la herida abierta para que a partir de las paredes bien vascularizadas de la cavidad, surja un tejido de granulación que vaya rellenando desde la periferia al centro y desde la profundidad a la superficie la cavidad residual, evitándose la formación de un espacio muerto. Aunque seguro, es un método lento. Colchero<sup>32</sup> intenta acelerar este proceso mediante escarificaciones repetidas con escoplo de la superficie ósea.
- 2) Irrigación-aspiración continua:** oclusión del espacio muerto creado después de la resección del foco séptico, por parte del tejido de

granulación reparador, que se forma en su interior concéntricamente a un tubo de irrigación-aspiración, que crea un flujo de suero dentro de la cavidad arrastrando detritus, coágulos y microorganismos, y creando un medio salino isotónico que favorece el nacimiento del tejido de granulación. Su problema es el riesgo de sobreinfección, por microorganismos diferentes al inicial (nosocomiales), al colonizarse el tubo de irrigación y penetrar en la cavidad<sup>33</sup>.

- 3) **Plastias musculares:** el músculo proporciona un tejido vivo y vascularizado que, a las semanas posteriores a su implante, se adhiere a las paredes de la cavidad ósea previamente cruentas, proporcionando componentes del mecanismo de defensa del organismo y facilitando la llegada de antibióticos al interior de la cavidad<sup>34</sup>.
- 4) **Coaptación de la cavidad:** en las cavidades sépticas osteoarticulares de la cadera, tras la artroplastia de resección tipo Girdlestone, se acopla el borde superior del trocánter mayor debajo del techo acetabular y se mantiene con suturas transóseas, disminuyendo el espacio articular residual<sup>35</sup>.
- 5) **Injerto óseo:** consiste en rellenar el defecto con injertos óseos, que pueden ser:
  - a) **hueso esponjoso autólogo:** tiene un gran potencial osteogénico, al aportar osteoblastos y una matriz ósea de colágeno mineralizada que es osteoinductora, y también capacidad de defensa en un terreno infeccioso. Se pueden usar los injertos de esponjosa iliaca a cielo cerrado (método de Matti) o a cielo abierto en dos tiempos (método de Papineau). Indicado en defectos cavitarios o segmentarios menores de 3 a 5 cm. Recientemente, Chan<sup>36</sup> describe excelentes resultados incluyendo antibióticos en injertos óseos autólogos, en el tratamiento de pequeños defectos infectados en tibia, sin alterar la naturaleza del injerto.

- b) **Injerto de esponjosa homóloga (Banco de Hueso):** induce una reacción osteogénica pobre y lenta y es inadecuado en un foco contaminado ya que las reacciones inmunológicas de rechazo favorecen la contaminación del hueso transplantado con recidiva de la OM.
- c) **Injerto intertibioperoneo:** a través de un abordaje libre de infección (posterolateral en la tibia) se procede a encastrar un fragmento de hueso corticoesponjoso entre tibia y peroné cruceando la solución de continuidad tibial. Está indicado en defectos de 3 a 5 cm en la tibia<sup>37</sup>.
- d) **Injerto óseo vascularizado (cresta iliaca o peroné):** indicado para grandes defectos, mayores de 5 cm. Precisa de un equipo con amplia experiencia en la microcirugía de anastomosis vasculares<sup>38</sup>.
- 6) **Transporte óseo:** se basa en el concepto de la “osteogénesis a distracción” desarrollado por Ilizarov<sup>39</sup>. En ella, tras la resección segmentaria amplia del hueso afecto, se procede a la colocación de un fijador externo y una corticotomía/osteotomía en uno o en ambos de los extremos metafisarios del hueso restante y posteriormente, transcurridos unos 7-10 días, se inicia la distracción del segmento transportado a razón de 1 mm/día, apreciándose en la zona distraída un regenerado óseo debido a la osteogénesis a distracción, que provoca la aparición de un hueso nuevo abundantemente vascularizado, que permite la llegada del sistema inmunitario que ayudará a resolver el problema infeccioso. Está indicado para grandes defectos o resecciones óseas, mayores de 5-7 cm, siendo una técnica que exige del cirujano una gran experiencia en la cirugía reconstructiva ósea y en el manejo de fijadores externos. Requiere un periodo prolongado de tratamiento, tanto en la fase de distracción hasta conseguir el anclaje al fragmento sano (1 mm/día) como de la maduración del regenerado óseo (dos o tres veces más que el de la

distracción). A su vez, no está exenta de complicaciones: infección superficial y de los clavos del fijador, atrofas musculares, rigideces articulares, desviación de los fragmentos, retardo de consolidación o no consolidación (que precisa injerto óseo), trastornos vasculonerviosos, etc., que complican aún más su manejo<sup>40</sup>.

**7) Biomateriales:** son materiales empleados para el relleno de cavidades, y en algunos casos inducen cierta regeneración ósea, permitiendo la reposición del tejido perdido por la resección quirúrgica. Se han estudiado también como sistemas de liberación de antibióticos en el lugar de la infección. La cinética de cesión del antibiótico puede ser más o menos prolongada dependiendo de los componentes y del método de elaboración empleado.

A estos materiales le dedicaremos mayor atención, puesto que forman parte del objetivo de este trabajo.

## **8. Biomateriales conteniendo antibióticos**

Un Biomaterial se define, según la Conferencia de consenso de la Sociedad Europea de Biomateriales de 1991, como un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo<sup>41</sup>.

Se clasifican:

### 1. Según su composición química:

- a) Metales
- b) Polímeros
- c) Cerámicas
- d) Materiales compuestos (*composites*)

## 2. Según su respuesta biológica tras ser implantado:

- a) *Biotolerables* (polimetilmetacrilato-PMMA-, acero inoxidable-SS-, aleaciones de Cromo-Cobalto –Cr-Co-): son encapsulados mediante una capa de tejido fibroso conjuntivo.
- b) *Bioinertes* (alúmina, circonia, titanio): la superficie del material, recubierta por una capa de óxido estable, presenta contacto directo con el hueso, y no se produce inhibición de la osteogénesis.
- c) *Bioactivos* (cerámicas de fosfato de calcio, cerámicas de óxidos de silicio o biovidrios): enlace químico directo con el hueso circundante.
- d) *Biodegradables o no Biodegradables*: si el material se descompone mediado por un sistema biológico.

Nos centraremos en aquellos sistemas capaces de actuar como vehículos para la liberación local de antibióticos en la infección ósea<sup>42</sup>, por lo que en primer lugar, citaremos los criterios que según Rushton<sup>43</sup>, debe cumplir un agente antimicrobiano para ser formulado en un sistema de cesión local:

- 1) Ser activo frente a los patógenos más frecuentes en la OMC.
- 2) Alcanzar y mantener concentraciones locales que excedan la CMI (generalmente 10 veces) frente al patógeno causante de la infección, evitando concentraciones elevadas en sangre.
- 3) No producir efectos adversos.
- 4) Ser estable a la temperatura corporal y suficientemente soluble en agua para asegurar su difusión a través del vehículo.

Las bacterias que más frecuentemente se aíslan en pacientes con OMC son estafilococos y bacterias Gram-negativas, particularmente *Enterobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*. Por tanto, en base a los criterios previamente señalados y a los hallazgos bacteriológicos, los agentes

antimicrobianos más empleados en la elaboración de sistemas de cesión local son los aminoglucósidos y con menor frecuencia algunos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas. La liberación del antimicrobiano desde dichos sistemas está controlada por la disolución del fármaco en la matriz y su difusión a través de los poros del material. Así, en el caso de antibióticos muy solubles como los  $\beta$ -lactámicos, la cantidad cedida depende de la superficie del sistema y de la carga inicial del antibiótico en la formulación; en el caso de fármacos relativamente insolubles como las quinolonas, la cesión depende de su solubilidad en la matriz y de la porosidad de ésta<sup>44,45</sup>.

### 8.1. Materiales No Biodegradables conteniendo antibióticos

El uso en cirugía ortopédica de un material inerte conteniendo antibiótico comienza en la década de los años 70, cuando Bucholz utiliza un cemento acrílico, el PMMA, con gentamicina<sup>31</sup>. Wahlig et al.<sup>46,47</sup>, demostraron que la gentamicina se libera progresivamente desde el cemento al tejido circundante. Los resultados farmacocinéticos de Wahlig et al.<sup>46</sup> y Walenkamp et al.<sup>48</sup>, pusieron de manifiesto una liberación lenta y sostenida de este antibiótico desde el cemento, dando lugar a altas concentraciones de gentamicina local y bajos niveles en sangre, sin efectos ototóxicos ni nefrotóxicos.

A mediados de los años 70, Klemm<sup>49</sup> inició la utilización de perlas de PMMA con gentamicina ensambladas mediante un hilo metálico, constituyendo los “Rosarios de Gentamicina” (*Septopal*®). La elección como antibiótico de la gentamicina se basó en su estabilidad térmica, lo que le permite soportar la temperatura de polimerización del cemento (aproximadamente 100°C) sin perder su actividad, y su acción bactericida frente a gérmenes Gram-positivos y Gram-negativos.

Los rosarios de PMMA-gentamicina actúan a través de un doble mecanismo a nivel del foco séptico: oclusión y acción antimicrobiana. La oclusión es inicialmente un efecto mecánico por el espacio que ocupan las cadenas, que posteriormente se va relleno de un tejido de granulación rico en vasos sanguíneos que luego se fibrosará. El efecto antimicrobiano lo realiza en zonas de hueso esclerótico donde la vascularización es pobre y por lo tanto, la administración sistémica daría lugar a niveles subterapéuticos; sin embargo, con la administración local se alcanzan niveles de antibiótico muy por encima de la CMI frente al germen causante de la infección, mientras que la concentración en suero y orina es menor<sup>50</sup>. El 40-70% de la dosis de gentamicina es liberada en dos semanas, y una vez cedida toda la dosis, deben ser extraídas (a partir de la 4ª semana), ya que al no degradarse, pueden quedar ocluyendo cavidades articulares o medulares que impiden intervenciones de reconstrucción<sup>51</sup>. Este es el principal inconveniente de los sistemas de PMMA; además, de acuerdo a los resultados publicados, los mayores éxitos terapéuticos se alcanzan cuando se refuerzan con la administración sistémica complementaria de antibióticos<sup>52,53,54</sup>. Otra forma de utilizar el PMMA con antibiótico son los “Espaciadores”. Estos espaciadores se pueden utilizar como bloques de cemento con antibiótico, cuando son usados en pérdidas óseas segmentarias interpuestos en los extremos óseos, o como moldes de prótesis de cemento-antibiótico que se utilizan en las prótesis infectadas, tras su retirada, en la cirugía en dos tiempos. Estos espaciadores permiten la liberación local del antibiótico y mantener el espacio, la estabilidad y la movilidad articular que luego permita la implantación de una prótesis definitiva; en los defectos segmentarios permiten ocupar este espacio y evitar la invaginación de las partes blandas o la reconstrucción de las mismas con colgajos musculares para luego, tras su retirada, pasar a la reconstrucción ósea. Los antibióticos más utilizados en

estos sistemas son la gentamicina, clindamicina, tobramicina y vancomicina<sup>55,56</sup>.

## **8.2. Materiales Biodegradables conteniendo antibióticos**

La utilización de materiales biodegradables evita una segunda operación para la extracción del sistema, con beneficio para el paciente y menor coste económico del proceso clínico. Por otro lado, debido a la capacidad de algunas bacterias (*S. epidermis* y *S. aureus*) de producir el biofilm y adherirse a los cuerpos extraños, como el cemento acrílico, se han detectado microorganismos en la superficie de las perlas de PMMA, desarrollando en algunos casos, resistencia a la gentamicina<sup>57</sup>. Este hecho sin embargo, no ocurre con materiales biodegradables.

### **8.2.1. Esponjas de colágeno-gentamicina**

Consisten en unas láminas de colágeno, de las utilizadas en cirugía como elemento hemostático, asociadas a gentamicina. La experiencia clínica con estas esponjas de colágeno-gentamicina, como técnica de oclusión de cavidades óseas sépticas es escasa, incluso como tratamiento de infecciones de heridas<sup>58</sup> o partes blandas<sup>59</sup>. En los trabajos publicados los resultados son equiparables a los rosarios de PMMA-gentamicina<sup>60</sup>.

En cuanto al proceso histológico de sustitución del biomaterial, estudios experimentales en conejos han demostrado que la completa reabsorción de las esponjas se realiza por parte de un tejido fibrovascular proveniente de los tejidos circundantes en un periodo de 2 a 4 semanas<sup>61</sup>.

## **8.2.2. Sales de Calcio**

### **8.2.2.1. Sulfato Cálculo**

La utilización del sulfato cálcico (yeso de Paris) para rellenar cavidades óseas se remonta al siglo XIX, cuando Dreesman en Alemania relleno cavidades óseas tumorales e infecciosas mediante yeso de Paris asociado a solución fenol. Peltier<sup>62</sup> en EEUU, inicio su uso en forma de comprimidos en cavidades tumorales y realizo estudios experimentales que permitieron comprobar que la implantación de sulfato cálcico en el hueso no produce reacción a cuerpo extraño, actúa como osteoconductor, y su absorción es completa en el lugar de implantación.

#### **8.2.2.1.1. Sulfato Cálculo como vehículo de antibióticos**

La eficacia clínica del sulfato cálcico como vehículo de antibióticos, ha sido probada por Sherry et al.<sup>63</sup>, en el 2001, cuando aplican perlas de sulfato cálcico (Oateoset®) impregnadas con un antimicrobiano (polytoxinol), por vía percutánea, en el tratamiento de una OMC por SAMR, en la tibia de un varón adulto, consiguiendo a los 3 meses, resolver sus síntomas, cicatrizar la herida, el descenso de los niveles de VSG y PCR y la resolución radiográfica del proceso con incorporación de los implantes. Mckee et al.<sup>64</sup>, en el 2002, estudiaron, en una serie de 25 pacientes afectados de OM de huesos largos, el efecto del tratamiento con pastillas de yeso con tobramicina, obteniendo un 92% de eficacia (erradicación de la infección y consolidación del defecto óseo) con un seguimiento medio de los pacientes de 2 años y medio. Así mismo, Turner et al.<sup>65</sup>, un año antes (2001), obtienen buenos resultados al realizar estudios experimentales (en perros) y clínicos, utilizando perlas de sulfato cálcico, injerto óseo expandido (combinación de sulfato cálcico con

matriz ósea desmineralizada) y perlas de sulfato cálcico con tobramicina, en diferentes situaciones clínicas. Del mismo grupo de trabajo, Gitelis y Brebach<sup>66</sup>, en el año 2002, obtuvieron excelentes resultados clínicos y radiológicos con el uso de implantes de sulfato cálcico (perlas de 7 mm) mezclado con vancomicina (en los casos de OM producida por SAMR) y otras con tobramicina (por otras bacterias).

#### **8.2.2.2. Fosfatos de calcio**

Las cerámicas de fosfatos de calcio presentan unas propiedades químicas y cristalinas muy similares al componente mineral del hueso. Son biocompatibles y bioactivas, puesto que son capaces de unirse al tejido óseo sin interposición de tejido fibroso. Su bioactividad es de osteoconducción (presenta una estructura que permite el crecimiento de mamelones vasculares con células osteoprogenitoras), pero no son osteoinductoras, es decir no estimulan la diferenciación de células pluripotenciales a osteoprogenitoras. Sus características mecánicas hacen que estos biomateriales estén indicados para el relleno de cavidades óseas y para puentes de artrodesis, pero no tienen ninguna utilidad como sustitutos de huesos diafisarios o en presencia de cargas de tracción, torsión o cizallamiento<sup>67</sup>.

##### **8.2.2.2.1. Fosfatos de calcio como vehículos de antibióticos**

Korkusuz et al.<sup>68</sup>, en 1993, realizan un estudio induciendo OM por *S. aureus* meticilin sensible (SAMS) en tibia de ratas, donde introducen intramedularmente una aguja de acero inoxidable a modo de implante metálico, colocando a las 7 semanas de la inoculación bacteriana, un implante de hidroxapatita (HAP) con gentamicina. Los resultados muestran

una respuesta terapéutica eficaz, tanto desde el punto de vista radiológico, como histopatológico y antiinfeccioso, sin necesidad de retirar el implante metálico, si lo comparan con las otras terapias empleadas en el estudio: gentamicina intraperitoneal, desbridamiento quirúrgico y desbridamiento en combinación con PMMA-gentamicina; además la combinación gentamicina-HAP produce concentraciones 20 veces más altas en el hueso que la gentamicina intraperitoneal y 2,5 veces más elevada que el PMMA-gentamicina, además de una cesión más prolongada.

Solberg et al.<sup>69</sup>, en 1999, aplicando el modelo experimental de Korkusuz, en ratas y con las mismas combinaciones de tratamiento (grupo A: desbridamiento quirúrgico, B: desbridamiento y gentamicina intraperitoneal, C: desbridamiento y HAP-gentamicina y D: desbridamiento y perlas PMMA-gentamicina), pero aplicando la HAP-gentamicina en forma de cemento o "pasta" para rellenar cavidades, encontraron resultados similares en la eliminación de la infección entre los tratamientos con HAP-gentamicina y PMMA-gentamicina, pero con la ventaja de no realizar la segunda intervención para la extracción de las perlas de PMMA-gentamicina.

Itokazu et al.<sup>70</sup>, en 1997, desarrollan un implante poroso de HAP con arbekacina, probándolo en la tibia de ratas con OM por *S.aureus*, tras desbridamiento de la cavidad medular. Los resultados mostraron la eliminación de la infección.

Lambotte et al.<sup>71</sup>, en 1998, valoran la eficacia de esferas de fosfato tricálcico (FTC) con gentamicina en una OM provocada en la metafisis superior de la tibia de conejos, siguiendo el modelo experimental de Norden<sup>72</sup> (consiste en la inoculación de un agente esclerosante, que provoca una osteítis, más la suspensión de *S. aureus*), obteniendo la liberación total del antibiótico antes del tercer día, aunque permanecen niveles en el compartimiento intraóseo durante diez días. Por otro lado, como el modelo experimental en conejos tenía el objetivo de valorar la actividad terapéutica

del antibiótico, pero no las propiedades mecánicas del biomaterial, es por lo que los autores proponen un cambio de escala a ovejas, en las que la enfermedad presenta características más próximas a las de humanos.

Más recientemente, Shirliff et al.<sup>73</sup>, en el año 2002, en un modelo experimental de OM por *S. aureus* meticilin resistente (SAMR), y siguiendo el modelo experimental de Mader<sup>74</sup> (inoculación percutánea en la metáfisis proximal de la tibia de conejos, de 0,1 ml de morruato sódico, como agente esclerosante, 0,1 ml de suspensión de *S. aureus* y 0,1 ml de suero salino, en forma secuencial), valoraron la eficacia de implantes de HAP impregnados con vancomicina. Tras comprobar, a las dos semanas de infectados, que los conejos reunían los criterios de infección clínicos y radiográficos, los dividieron en 8 grupos: G1: no tratados; G2: desbridamiento quirúrgico; G3: desbridamiento quirúrgico y vancomicina sistémica (por vía s.c.); G4: solo vancomicina sistémica; G5: HAP sin antibiótico implantado en el espacio creado por el desbridamiento; G6: implante de HAP sin antibiótico y vancomicina sistémica; G7: desbridamiento quirúrgico e implante de HAP con vancomicina y G8: desbridamiento e implante de perlas de PMMA impregnadas de vancomicina. Tras cuatro semanas de tratamiento, en los conejos con implantes de HAP-vancomicina se conseguía una eliminación bacteriana del 81,8% y de un 70% en los que tenían las perlas de PMMA-vancomicina. El resto de los tratamientos no alcanzaron el 50%. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos sistemas con antibióticos (HAP vs. PMMA), con el implante de HAP-vancomicina se logró la regeneración ósea y no precisó de una segunda intervención para su retirada. Por último, los autores concluyen que los implantes pueden ser más efectivos en forma de pequeñas bolas o perlas, porque permiten una mejor adaptación mecánica al defecto óseo y una mayor difusión del antibiótico.

Yamashita et al.<sup>75</sup>, en 1998, valoraron la eficacia clínica de estos implantes en pacientes con OMC, a los que implantaron bloques de HAP

impregnados en antibióticos, elegidos según la sensibilidad de la lesión osteomielítica (flomoxef para *S. aureus* ; vancomicina o imipenem para OM por SAMR, imipenem en el caso de *Pseudomonas*, etc.), en la cavidad producida tras el desbridamiento quirúrgico, comprobando la eficacia en el control de la infección y la incorporación del material cerámico en el hueso.

### 8.2.2.3. Biovidrios

Los biovidrios se unen al hueso al presentar una gran superficie externa de gel poroso de óxido de silicio. En esta superficie se desarrollan diversas reacciones que forman una capa de apatita hidroxycarbonatada, consiguiendo una mejor unión al hueso que con la HAP. El modelo clásico de biovidrio es el Bioglass (45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% CaO, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O), cuyo principal defecto son sus pobres propiedades mecánicas. Para mejorar la formación de hueso, facilitar la fabricación a bajas temperaturas y mejorar la biodegradación, se han desarrollado biovidrios en fase sol-gel hidrolizados a temperatura ambiente, cuyo prototipo es la *apatita wollastonita* (SiO<sub>2</sub> CaO), con igual capacidad osteoconductora, pero mayor resistencia mecánica.

Los estudios realizados en infecciones son escasos; citaremos a Kawanabe et al.<sup>76</sup> que, en 1998, tratan con implantes de cerámica cristalina de apatita-wollastonite y antibióticos (cefmetazol y sulfato de isepamicina), conejos infectados experimentalmente y posteriormente, a cuatro pacientes con artroplastias infectadas y una OM de tibia, obteniendo excelentes resultados en ambos casos.

### 8.2.3. Polímeros

Los polímeros más investigados para la regeneración ósea son los polialfahidroxiesteres y la polidioxanona. El primer grupo comprende el ácido poli L-láctico (L-PLA), el ácido poli D-L láctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), y sus copolímeros, el poli L-láctico-glicólico (L-PLGA) y el poli D-L láctico-glicólico (PLGA)<sup>77</sup>.

Los polímeros con peso molecular 30.000 y 60.000 son sólidos a temperatura ambiente, permitiendo su utilización como material de relleno en defectos óseos. El proceso de incorporación a nivel de un defecto óseo se produce desde la periferia hacia el centro acompañándose de una aposición ósea centrípeta.

El potencial osteogénico de los polímeros ha sido ampliamente demostrado. García Novalvos et al.<sup>78</sup>, en 1996, realizan un estudio de la respuesta ósea a biomateriales constituidos por diferentes proporciones de los ácidos láctico y glicólico, después de su implantación en ratas, mediante técnicas cromatográficas y morfológicas, pudiendo apreciar la continua degradación y la respuesta ósea frente al implante, así como los procesos de reabsorción de los compuestos y su sustitución por tejido óseo. Castillo et al.<sup>79</sup>, en el 2003, estudiando el efecto de L-PLA y D,L-PLA de 30 y 60 kDa comprueban, en el relleno de un defecto óseo en el cóndilo femoral de un conejo, que los gránulos de D,L-PLA de 30 kDa inducen una mayor neoformación ósea, produciéndose una mayor reabsorción del polímero.

#### 8.2.3.1. Los polímeros como vehículos de antibióticos

El PLA y sus copolímeros se han utilizado ampliamente para la elaboración de sistemas de cesión de gran variedad de antibióticos, para el tratamiento de infecciones óseas.

Calhoun y Mader<sup>80</sup>, en 1997, implantan perlas de PLA-PLGA con vancomicina en tibias de conejos infectados con *S. aureus*, siguiendo su modelo de OM experimental. A las 4 semanas de tratamiento, las concentraciones bacterianas en los animales tratados con el implante de antibiótico y desbridamiento fueron 100 veces menores que en los otros grupos (grupo sin tratamiento, solo con desbridamiento, implantes blancos y antibioterapia sistémica), manteniéndose niveles elevados de vancomicina en hueso durante este tiempo.

Jacob et al.<sup>81</sup>, en 1997, evaluaron la eficacia de polímeros con antibióticos en el tratamiento de un modelo experimental de fracturas abiertas. Procedían a crear una fractura en la tibia de conejos que inoculaban con *S. aureus* y esperaban dos horas, para simular el retraso en el tratamiento de la práctica clínica, tras lo cual procedían a la fijación de la fractura con material de osteosíntesis (placa AO), dividiendo a los animales en tres grupos según se les implantaran microesferas de PLGA con cefazolina, polvos de cefazolina aplicados en el foco y animales sin tratamiento. Apreciaron que el tratamiento con PLGA-cefazolina prevenía el desarrollo de la infección. En cambio, la evidencia clínica (pérdida de peso, supuración y fístula) y radiológica (no consolidación o desorganización del callo de fractura) de la infección se presentaba en el 50% de los conejos tratados con polvos de cefazolina y en el 71% del grupo no tratado, manteniéndose el cultivo positivo en el 75 y 100%, respectivamente.

Garvin et al.<sup>82</sup>, en 1994, realizan un estudio en un modelo animal de OM por *S. aureus* en tibias de perros, basado en el modelo de Fitzgerald<sup>83</sup>, que consiste en la inoculación intramedular de una suspensión de *S. aureus* y un cilindro estéril de PMMA a modo de cuerpo extraño. Para el tratamiento de esta infección los autores emplean implantes de PLGA con gentamicina y los comparan con PMMA-gentamicina y gentamicina parenteral, no apreciando

diferencias significativas en la eficacia entre ambos tipos de implantes, pero sí entre éstos y la gentamicina sistémica, que resultó menos efectiva.

Yagmurlu et al.<sup>84</sup>, en 1999, utilizan implantes, en forma de varilla, elaborados con polihidroxialcanoatos (polímeros de origen microbiológico), concretamente polihidroxibutirato-cohidroxivalerato (PHBV) conteniendo sulbactam-cefoperazona, para el tratamiento de una infección por *S. aureus* (método de Korkusuz) en tibia de conejos. A las 3 semanas de inoculación bacteriana y sin retirar la aguja de acero inoxidable, colocan el implante en el animal. Los signos infecciosos disminuyen ya a los 15 días, con remisión casi completa alrededor de los 30 días. Además, demuestran que el material es biocompatible e incluso señalan que es más adecuado que el PLGA.

En este mismo grupo, Gürsel et al.<sup>85</sup>, en el 2001, utilizan los mismos implantes de PHBV con sulbactam-cefoperazona o sulbactam-ampicilina para tratar una OM experimental en conejos, comprobando la rápida liberación del antibiótico en la primera semana, controlada por la disolución del fármaco.

Rutledge et al.<sup>86</sup>, en el 2003, valoran la implantación de varillas de policaprolactona (PCL) con tobramicina en el fémur de conejos con OM por *S. aureus* (método de Norden). A las 4 semanas de tratamiento, el recuento bacteriano fue menor en los grupos tratados con implantes de PCL-tobramicina o PMMA-tobramicina que en los grupos no tratados (implantes blancos o sólo irrigación), no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre los implantes con antibióticos. Los estudios histológicos permitieron además concluir que los implantes de PCL no producen toxicidad sistémica.

Lucke et al.<sup>87</sup>, en el 2003, evaluaron la eficacia profiláctica en cirugía ortopédica de las agujas de Kirschner de titanio recubiertas con PLA-gentamicina, frente a la OM por *S. aureus* en tibia de ratas. Los resultados mostraron un crecimiento bacteriano y signos radiológicos e histológicos de

infección significativamente menores que los observados en los grupos no tratados con antibiótico.

Uno de los grupos de antibióticos más ampliamente estudiados como posibles candidatos para el tratamiento de OM incorporados en matrices de polímeros biodegradables, son *las Fluorquinolonas*. Para Lew y Waldvogel<sup>88</sup>, las quinolonas son los antimicrobianos de elección en el tratamiento de la OMC, por su favorable penetración en lugares infectados pobremente vascularizados y en el hueso; además, actúan como bactericidas sobre todos los posibles patógenos de la OMC, incluyendo los SAMR en presencia de implantes ortopédicos, en combinación con rifampicina y vancomicina, están disponibles en preparaciones orales y parenterales y tienen escasas reacciones adversas.

Varios autores han estudiado la cesión de ciprofloxacino y otras quinolonas desde sistemas elaborados con estos polímeros biodegradables, tanto *in vitro*, como en animales de experimentación sanos<sup>89-92</sup>. Así, Kanellakopoulou et al.<sup>93</sup>, en 1999, elaboraron implantes de L-PLA y D,L-PLA de diferentes pesos moleculares, con ciprofloxacino o pefloxacino, para estudiar la cesión de estos antibióticos *in vitro* y la degradación de los polímeros. Las concentraciones alcanzadas en el medio de cesión fueron superiores a las CMI para los microorganismos más frecuentes en infecciones óseas; Con los implantes de D,L-PLA de mayor peso molecular obtuvieron una cesión del antibiótico y degradación del polímero más lenta, por lo que los autores indican que estos implantes pueden ser más convenientes para su ensayo *in vivo*, ya que cabe esperar que ambos procesos sean más rápidos.

En estudios experimentales llevados a cabo en animales infectados, destaca el realizado por Kanellakopoulou et al.<sup>94</sup>, en el 2000; basándose en el trabajo anterior, probaron la eficacia de los implantes de L-PLA de menor peso molecular (2 kDa) con pefloxacino frente a SAMR, en un modelo experimental de OM en conejos, utilizando el método de Norden modificado,

con la inclusión de una aguja a modo de cuerpo extraño, que se retira en el momento de la colocación del implante, a la 3ª semana. Valoran la eficacia del sistema a través de la reducción del número de colonias a lo largo del tiempo, criterios clínicos (fiebre, pérdida de peso) y radiológicos (reacción perióstica, erosión cortical y neoformación ósea), observando una disminución bacteriana muy importante a los 33 días, sin recidivas, con una liberación sostenida del pefloxacino y niveles 100 veces superiores a la CMI para SAMR.

El ofloxacino incluido en una matriz de PLGA (perlas) ha sido desarrollado como sistema de liberación y estudiado *in vivo* por el mismo grupo de trabajo. Nie et al.<sup>95</sup>, en 1998, aplican este sistema en una OM por *P. aeruginosa*, instilando la suspensión bacteriana directamente dentro de la cavidad medular a través de un orificio perforado en la porción distal del fémur de conejos. Realizan valoraciones radiológicas, histológicas, cultivo de tejido y determinación de concentraciones óseas de ofloxacino. El porcentaje de cultivos estériles fue de 33, 83, 75 y 91% para los grupos tratados con PLGA sin antibiótico, perlas de PLGA-ofloxacino, ofloxacino sistémico y perlas más ofloxacino sistémico, respectivamente. Los niveles de antibiótico en hueso fueron mayores en los grupos con implantes de PLGA-ofloxacino e implantes con antibiótico más tratamiento sistémico. Los autores concluyen que el PLGA es un excelente vehículo para alcanzar concentraciones elevadas de antibiótico en el lugar de infección. Por otro lado, Nicolau et al.<sup>96</sup>, en 1998, estudian el mismo tipo de implante en una OMA hematogena por *S. aureus*, utilizando el método de OMA experimental de Morrissy y Haynes<sup>97</sup>, que consiste en la inoculación endovenosa de *S. aureus*, tras la agresión inicial en el hueso (fractura en la placa fisaria tibial proximal del conejo), simulando una bacteriemia. Los autores modifican este método, realizando un agujero en la cortical del hueso, posteriormente colocan el implante (con y sin antibiótico) y al cabo de una hora, proceden a la inoculación endovenosa de

la bacteria. La evaluación de la infección la llevan a cabo mediante estudios bacteriológicos, radiológicos e histológicos y también determinan la concentración de ofloxacino en hueso. Los resultados mostraron que los cultivos positivos y los signos radiográficos e histológicos de infección, fueron significativamente superiores en el grupo con implante sin antibiótico y los niveles óseos del antibiótico fueron mayores que la CMI para el *S. aureus* al final del tratamiento (28 días), en el grupo con el implante de ofloxacino, demostrando así la efectividad de los implantes en la prevención del desarrollo de osteomielitis hematógena aguda.

#### **8.2.4. Mezcla de Polímeros y Sales de Calcio**

En este apartado hemos recogido las publicaciones más relevantes en lo que respecta a sistemas elaborados con mezclas de polímeros y fosfatos cálcicos para la cesión controlada de antibióticos, ya que son la base de los implantes utilizados en la realización de este trabajo.

Sasaki e Ishii<sup>98</sup>, en 1999, desarrollaron implantes formados por un bloque cilíndrico de fosfato cálcico, en cuyo interior hay otro cilindro compuesto por L-PLA de 100 kDa, fosfato cálcico y gentamicina, justificando la presencia del cilindro exterior de fosfato cálcico por las mejores propiedades osteoconductoras de este material con respecto al PLA o sus copolímeros. Posteriormente valoraron el comportamiento del implante en un modelo experimental de OM provocado en la metáfisis proximal tibial de conejos, basándose en el método descrito por Dekel y Francis<sup>99</sup>, que consiste en la inoculación percutánea en la tibia proximal del conejo, de un agente esclerosante (tetradecilsulfato sódico), 0,1 ml de suspensión de *S. aureus* y 0,1 ml de suero fisiológico. Después de producir la infección en los animales, a las dos semanas, éstos fueron divididos en 4 grupos: grupo sin implante, grupo con implante, grupo tratado con gentamicina intramuscular y grupo

control, realizándoles controles del peso, radiológicos, histológicos y determinación de anticuerpos IgG de *S. aureus* en suero; en el grupo con implante se obtuvo un título bajo de anticuerpos IgG, ganancia del peso corporal, una respuesta reparativa en las primeras 4-6 semanas, una progresiva invasión del implante por neoformación ósea y osteoblastos desde la 6ª semana. Con el tratamiento sistémico también se consiguieron buenos resultados clínicos y titulación de anticuerpos, pero además de las desventajas debidas a la vía de administración, no se observó el efecto osteogénico, por lo que los autores concluyen que los implantes son eficaces para prevenir el desarrollo de OM e inducir la formación ósea en un modelo experimental de OM.

En la tabla 1 se recoge un resumen de los modelos experimentales de osteomielitis descritos hasta ahora, si bien, solo se mencionan aquellos que han sido tratados con algún tipo de material biodegradable, como fosfatos cálcicos, polímeros o mezclas de ambos. En la tabla se especifica el método utilizado para provocar la infección, el animal y el hueso en el que se ha inducido la infección, así como, el sistema usado para su tratamiento.

Continuando con esta misma línea de investigación sobre la utilización de mezclas de polímeros y sales de calcio, para el tratamiento local de osteomielitis, hemos de citar los trabajos elaborados por nuestro equipo de investigación:

Soriano y Évora<sup>100</sup>, en el 2000, comparan la cinética de cesión *in vitro* de gentamicina desde implantes elaborados con mezclas de fosfatos cálcicos y PLA, recubiertos con polímeros (PLA y PLGA), frente a las perlas de PMMA. Los resultados pusieron de manifiesto la importancia del efecto de la degradación de los polímeros del recubrimiento, sobre la velocidad de cesión del antibiótico, consiguiendo cinéticas próximas a la óptima con implantes recubiertos con PLA de alto peso molecular. La cesión de gentamicina *in vitro* desde estos implantes recubiertos se prolongó más de 8 semanas, mientras

que en dos semanas, se cedió la dosis total de gentamicina desde las perlas de PMMA. Posteriormente, en el año 2001, Sánchez et al.<sup>101</sup> ensayan estos implantes *in vivo* comprobando que, aunque la cesión en el fémur de ratas es más rápida que *in vitro*, se mantiene la formulación recubierta como la más próxima a la ideal. Los niveles alcanzados en hueso son superiores a las CMI para *S. aureus* a lo largo de 4 semanas, comprobando también la capacidad osteoconductora del material empleado. Con el fin de caracterizar estos implantes y conocer el mecanismo por el cual la película de PLA controla la cesión de la gentamicina tanto *in vitro* como *in vivo*, Baro et al.<sup>102</sup>, en el 2002, elaboran nuevos implantes del tamaño adecuado para llevar a cabo el estudio en conejos. Los resultados pusieron de manifiesto que mientras *in vitro* la cesión del antibiótico no es completa, *in vivo* la totalidad de la dosis es liberada en ocho semanas. Estas diferencias en la velocidad de cesión son fundamentalmente debidas a la mayor degradación *in vivo* que sufre el PLA, tanto de la matriz como del recubrimiento, consecuencia del crecimiento celular que se observa en el implante.

Por último, Castro et al.<sup>45</sup>, en el 2003, desarrollan implantes compuestos de fosfatos cálcicos (HAP y TCP), PLA-30 y ciprofloxacino (CFX), en distintas proporciones. Los resultados *in vitro* muestran que la velocidad de cesión de CFX depende de la presión aplicada en la compresión, de la relación PLA/fosfatos y del contenido en antibiótico, siendo menor, a mayor presión, proporción de PLA y carga de CFX. Los autores concluyen que la solubilidad de CFX juega un papel dominante en el mecanismo de cesión del antibiótico y que el proceso de erosión-disgregación es necesario para la disolución/cesión completa del antibiótico. Se eligió la formulación con un 10% de CFX para el estudio en conejos; los resultados mostraron que los niveles de antibiótico a lo largo del fémur fueron superiores a la CMI frente a los microorganismos que más frecuentemente producen OM, durante 4 semanas, confirmando que la liberación de CFX *in vivo* también está limitada

por su solubilidad sin embargo, la neoformación ósea intraimplante es responsable del aumento de la velocidad de cesión *in vivo*. Los estudios histológicos y radiográficos mostraron las propiedades osteoconductoras del material.

Con el fin de abordar el estudio de la eficacia de estos implantes en la osteomielitis, se planteó el presente estudio.

Método de infección <sup>1</sup>	Animal y localización	Tratamiento/implante	Referencia
Inserción aguja SS intramedular+S.aureus.	Rata-tibia	implante HAP-GM	Korkusuz et al. (1993) [68]
Inoculación S.aureus + PMMA, en defecto metafisario	perro-tibia	cilindro PLGA-GM	Garvin et al. (1994) [82]
Inoculación S.aureus, intramedular	conejo-tibia	perla PLA-PLGA-VCM	Calhoun y Mader (1997) [80]
Inserción intramedular hilo de seda +S.aureus	rata-tibia	implante HAP-arbekacina	Itokazu et al. (1997) [70]
Fractura + inoculación S.aureus +osteosint.AO	conejo-tibia	microesferas PLGA-CFZ/ polvo CFZ	Jacob et al. (1997) [81]
Inoculación S.aureus + agente esclerosante	conejo-tibia	perlas FTC-GM	Lambotte et al. (1998) [71]
Inoculación I.V. SAMS post-implante = OMH	conejo-fémur	perlas PLGA+Ofloxacino (previo a infección)	Nicolau et al. (1998) [96]
Instilación P.aeruginosa, intramedular	conejo-fémur	perlas PLGA+Ofloxacino	Nie et al. (1998) [95]
Esclerosante+inoculación intramedular S.aureus	conejo-tibia	cilindro PCa, con un cilindro interior de L-PLA +PCa +GM	Sasaki e Ishii (1999) [98]
Aguja SS intramedular +S.aureus	rata-tibia	pasta HAP+GM	Solberg et al. (1999) [69]
Inoculación intramedular S.aureus + aguja SS	conejo-tibia	varillas PHBV-(SULB-CFP)	Yagmurlu et al.(1999) [84]
Inoculación intramedular SAMR + aguja SS	conejo-tibia	L-PLA-Pefloxacino	Kanellakopoulou et al. (2000) [94]
Inoculación intramedular S.aureus	conejo-tibia	varillas PHBV-(SULB-CFP) o de PHBV-(SULB-AMP)	Gürsel et al. (2001) [85]
Inoculación intramedular SAMR + esclerosante	conejo-tibia	Desbridamiento+ implante HAP-VCM	Shirtliff et al. (2002) [73]
Inoculación S.aureus + agente esclerosante	conejo-fémur	varillas PCL-TBM	Rutledge et al. (2003) [86]
Inoculación intramedular S.aureus	rata-tibia	aguja Kirschner de titanio recubierta con PLA-GM	Lucke et al. (2003) [87]

**Tabla 1.- Osteomielitis experimental y tratamientos utilizados.**

<sup>1</sup> **Abreviaturas:** SS: acero inoxidable; HAP: Hidroxiapatita; GM: gentamicina; PLGA: ácido poli D-L láctico-coglicólico; PLA: ácido poli D-L láctico; VCM: vancomicina; Osteosint.AO: osteosíntesis placa AO; CFZ: cefazolina; FTC: fosfato tricálcico; SAMS: S. aureus meticilin sensible; OMH: osteomielitis hematogena; PCa: Fosfato cálcico; PHBV: polihidroxibutirato-cohidroxivalerato; SULB: sulbactam; CFP: cefoperazona; SAMR: S. aureus meticilin resistente; AMP: ampicilina; PCL: policaprolactona; TBM: Tobramicina.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

Siguiendo con la línea de investigación desarrollada en los últimos años por nuestro grupo, el objetivo de este trabajo es la evaluación de un sistema biodegradable de cesión sostenida de gentamicina o ciprofloxacino para el tratamiento local de Osteomielitis por *Staphylococcus aureus*, provocada en el fémur de conejos.

Las etapas a cubrir son:

### Primero

- a. Elaboración de implantes compuestos por una mezcla de fosfatos cálcicos y PLA conteniendo un 10% de gentamicina.
- b. Efecto de la esterilización por radiación gamma sobre las características de los implantes.
- c. Evaluación de la eficacia de los implantes esterilizados en una osteomielitis por *S. aureus* en fémur de conejos.

### Segundo

- a. Efecto de la esterilización por radiación gamma sobre las características de los implantes con un 10% de ciprofloxacino previamente optimizados por Castro et al.<sup>45</sup>
- b. Evaluación de la eficacia de los implantes estériles en una osteomielitis por *S. aureus* en fémur de conejos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES**

- *Fármacos*

Sulfato de gentamicina (SG), donado por Laboratorios Normon S.A.

Clorhidrato de ciprofloxacino (CFX), donado por Laboratorios Bayer (Química Farmacéutica Bayer, S.A.).

- *Polímeros*

Poli(ácido D,L-láctico), Resomer® R203, con viscosidad intrínseca declarada de 0,3 dl/g (PLA-30) y poli(ácido D,L-láctico), Resomer® R207, viscosidad intrínseca declarada de 1,5 dl/g (PLA-200), fueron suministrados por Boehringer Ingelheim KG, Alemania.

- *Fosfatos*

Hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (HAP), suministrado por Osteosynth, España.

Fosfato tricálcico,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (FTC), suministrado por Panreac.

- *Reactivos y disolventes orgánicos*

Solución de *o*-naftaldialdehído, ácido trinitrobenceno sulfónico y sal sódica del ácido 1-heptanosulfónico, suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

- *Medios de cultivo*

Caldo nutritivo (Cultimed, Panreac)

Agar nutritivo (agar triptona y soja, TSA) (Scharlau)

Agar Mueller-Hinton (Mikrobiologie, Merck)

## **MÉTODOS**

### **1. Preparación de los implantes**

#### **1.1. Implantes de gentamicina**

Fueron elaborados a partir de la mezcla de una emulsión de SG y PLA-30 con una pasta acuosa de fosfatos<sup>100</sup>.

- a) Preparación de la emulsión. Se obtuvo homogeneizando en un sonicador, a una potencia de 42 w (output 4) (Sonicator® XL 2020) durante 5 minutos en un baño de hielo, una disolución acuosa de SG con una disolución de PLA-30 en diclorometano.
- b) Preparación de la pasta. Se elaboró con una mezcla de fosfatos (HAP y FTC) y un volumen de agua igual al peso de los fosfatos. Posteriormente, la emulsión se vierte sobre la pasta de fosfatos, se mezcla y se seca durante 2 horas a 60°C. A continuación, se granula con un tamiz de 1,6 mm de luz de malla y se deja secar durante la noche a 40°C. Las proporciones de los componentes del implante fueron: 18% de HAP, 52% de FTC, 18% de PLA y 12% de SG. La relación HAP:FTC fue de 25:75 y la de PLA:fosfatos, 20:80.
- c) Compresión. 1 g del granulado seco se comprimió usando una prensa hidráulica (Carver) con un punzón de 12 mm, a temperatura ambiente y a una presión de 520 MPa. Los implantes, de 12 x 4 mm fueron cortados en paralelepípedos de tamaño adecuado para su inserción en el fémur del animal de experimentación. Para conseguir una mayor homogeneidad en el tamaño, se utilizó como modelo un molde vacío de aproximadamente 12 x 6 x 4 mm.

- d) Recubrimiento. Los implantes se recubrieron sumergiéndolos en una disolución al 20% p/v de PLA-200 en diclorometano (Merck). Después, durante 48 horas permanecen a temperatura ambiente para evaporar el disolvente y endurecer la cubierta. El grosor de la misma se determinó por diferencia entre la medida del grosor del implante antes y después del recubrimiento, utilizando un micrómetro digital (Micrometrics, Mitutoyo, Japon).

## 1.2. Implantes de ciprofloxacino

Los implantes fueron preparados por compresión directa siguiendo el método descrito por Castro et al.<sup>45</sup>

- a) Preparación de la mezcla: se llevó a cabo mezclando los fosfatos, HAP (18%) y FTC (54%), previamente pulverizados, con PLA-30 (18%) y CFX (10%). La relación HAP:FTC se mantuvo en 25:75 y la del PLA: fosfatos, en 20:80.
- b) Elaboración de los implantes: fueron preparados por compresión de 500 mg de la mezcla, a 312 MPa, utilizando un punzón de 6 mm con una prensa hidráulica (Carver) a temperatura ambiente, durante cinco minutos.

## 2. Estudios *in vitro*

### 2.1. Métodos analíticos

#### 2.1.1. Determinación de SG

El método analítico utilizado para la determinación de gentamicina fue el descrito por Zhang et al.<sup>103</sup>, que se basa en la determinación del SG por espectrofotometría tras la derivatización con o-naftaldialdehído. El

procedimiento de análisis consiste en añadir a 1 ml de muestra, 1 ml de alcohol isopropílico (Panreac) y otro del reactivo *o*-naftaldialdehído, se agita y se deja en reposo 45 minutos a temperatura ambiente. La concentración se determina por espectrofotometría UV (Ultrospec® 3300 *pro*, Amersham Pharmacia Biotech) a 334 nm frente a un blanco sometido al mismo proceso que las muestras a analizar.

Para la determinación de SG *in vitro* se prepararon disoluciones patrones de SG en tampón fosfato pH 7,4 de concentraciones comprendidas entre 15 y 90 µg/ml, a partir de una disolución de SG en el mismo; El coeficiente de variación del método fue 1,41%. La relación lineal entre absorbancia y concentración se ajustó a la siguiente ecuación:

$$y = 0,0101x - 0,0091 \quad (R^2 = 0,9992) \quad (\text{ec.1})$$

### 2.1.2. Determinación de CFX

Para la determinación de CFX en los ensayos *in vitro* se empleó la espectrofotometría directa a 277 nm, utilizando HCl (Panreac) 0,1 N para la valoración del contenido de CFX en los implantes y tampón fosfato pH 7,4 para la cesión. Los coeficientes de variación del método fueron 2,09% y 1,34%, respectivamente y las relaciones lineales entre absorbancia y concentración se ajustaron a las siguientes ecuaciones:

$$y = 0,107x - 0,0503 \quad (R^2 = 0,998) \quad (\text{ec.2})$$

$$y = 0,075x + 0,0075 \quad (R^2 = 0,999) \quad (\text{ec.3})$$

## 2.2. Determinación del contenido

### 2.2.1. Determinación del contenido de SG en los implantes

El contenido de SG se valoró tomando 3 muestras de 100 mg de cada lote de granulado a las que se les añadió 15 ml de NaOH (Merck), 0,05 N, para extraer la gentamicina. Las muestras se mantuvieron en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron filtradas a través de filtros Gelman GHP Acrodisc de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, diluidas con tampón fosfato pH 7,4 y 1 ml de las mismas fue analizado por el método espectrofotométrico descrito en el apartado anterior. La eficacia de incorporación fue calculada como porcentaje de SG en el granulado con respecto a la cantidad inicial empleada en la elaboración del mismo.

El método de extracción fue previamente validado con 5 mezclas diferentes de los componentes y una cantidad conocida de SG, con una eficiencia del  $98,7 \pm 0,2\%$ .

### 2.2.2. Determinación del contenido de CFX en los implantes

El contenido de CFX se llevó a cabo por triplicado. Una vez pesados los implantes, se pulverizan y se mantienen agitándose en 100 ml de HCl 0,1N durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se filtran (Gelman GHP Acrodisc de 0,45  $\mu\text{m}$ ) y se valoran por el método espectrofotométrico descrito anteriormente. La eficacia de incorporación fue calculada como porcentaje de CFX en la mezcla con respecto a la cantidad inicial empleada.

El método de extracción fue previamente validado con 5 mezclas diferentes de los componentes y una cantidad conocida de CFX, con una eficiencia del  $99,8 \pm 0,02\%$ .

### **2.3. Ensayos de cesión**

Para la realización de estos ensayos, los implantes se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , en tampón fosfato pH 7,4 (0,066 M) isotónico conteniendo 0,02% de azida-sódica (Merck) como agente bacteriostático. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado para cada formulación.

#### *2.3.1. Ensayos de cesión de SG*

Los ensayos se realizaron con agitación basculante, a 90 rpm. A tiempos previamente establecidos, se tomaron alícuotas de 1 ml para determinar la gentamicina cedida, previa filtración, por el método espectrofotométrico anteriormente descrito. El volumen extraído fue repuesto con 1 ml de medio de cesión fresco, manteniendo siempre las condiciones sumidero.

#### *2.3.2. Ensayos de cesión de CFX*

Los ensayos se realizaron sin agitación y protegidos de la luz. A tiempos previamente establecidos se tomaba el volumen total de medio de cesión para determinar el CFX cedido, previa filtración, por el método espectrofotométrico anteriormente descrito. El medio extraído fue repuesto con un determinado volumen de medio de cesión fresco que permitiera mantener las condiciones sumidero durante todo el ensayo.

## 2.4. Esterilización de los implantes

Los implantes fueron esterilizados por radiación  $\gamma$ . La esterilización, tanto de los implantes como de sus componentes por separado, se llevó a cabo en la Unidad de Esterilización gamma de Aragogamma S.A. (Barcelona), siguiendo las recomendaciones de la USP<sup>104</sup>, a 25 kGy bajo una fuente de <sup>60</sup>Co y evitando el aumento de la temperatura de la muestra.

Con el fin de evaluar el posible efecto de la radiación  $\gamma$  sobre las características de los implantes, las muestras fueron caracterizadas antes y después de la esterilización en términos de actividad biológica, degradación, perfiles de cesión, estructura cristalina y características morfológicas.

### 2.4.1. Análisis de los antibióticos

#### 2.4.1.1. Actividad biológica de SG y CFX

Para evaluar la posible pérdida de actividad biológica de los antibióticos tras el proceso de esterilización, se procedió a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB), antes y después del proceso de irradiación.

La determinación se realizó por el método de macrodilución<sup>105</sup>. Tubos que contenían un volumen final de 2 ml, se inocularon con 0,1 ml de una suspensión de *S. aureus* (ATCC 6538), preparada previamente a partir de cultivos en caldo nutritivo, en agitación a 37°C durante 24 horas, diluidos previamente de manera que quedara una concentración celular de  $1-5 \times 10^5$  ufc/ml y concentraciones crecientes de CFX y SG disueltos en tampón citrato pH 4,0 y NaOH 0,05 N, respectivamente. Como control se utilizaron tubos en las mismas condiciones pero sin antibiótico.

Transcurrido el periodo de incubación, se tomaron alícuotas de aquellos tubos en los que no se detectó un crecimiento visible para efectuar un recuento de unidades viables en placas de agar nutritivo, con el fin de establecer la CMI (mínima concentración de antibiótico a la cual no hubo crecimiento) y CMB (mínima concentración de antibiótico que produjo la muerte del 99,9% de la población inicial).

#### *2.4.1.2. Evaluación de la estabilidad química y estructura cristalina*

El estudio del efecto de la radiación  $\gamma$  sobre los antibióticos se realizó utilizando las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y difracción de rayos X (DRX).

##### *2.4.1.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*

La pureza y posible degradación de SG y CFX antes y después de la radiación  $\gamma$  fue verificada mediante HPLC utilizando un equipo Waters (Waters, Milford, MA, USA) equipado con una bomba modelo 600E, un autoinyector Wisp 717 plus, un detector de longitud de onda variable modelo 490 y una columna de acero inoxidable Nova-pak C<sub>18</sub>. La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el programa Máxima 820, v. 3.30. Para preparar la fase móvil se utilizó agua desionizada, purificada por un sistema Millipore Milli-Q. Todos los disolventes y la fase móvil fueron filtrados con filtros de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y desgasificados.

#### *a) Determinación de SG por HPLC*

Para la valoración de SG por HPLC se utilizó una modificación del método de Mauduit et al.<sup>106</sup>, que consiste en mezclar 1 ml de solución acuosa al 0,5% p/v de ácido trinitrobenceno sulfónico con 100  $\mu$ l de la solución acuosa de SG y 1,25 ml de piridina (Merck). La mezcla, en un vial cerrado, se calienta a 70°C durante 30 min. Después de enfriarla en un baño de hielo durante 5 min, se añade 1 ml de ácido acético (Merck), para asegurar la estabilidad de la mezcla durante al menos 10 horas. Se prepararon disoluciones acuosas de SG de concentraciones comprendidas entre 100 y 1000  $\mu$ g/ml y el volumen inyectado fue de 50  $\mu$ l. Como fase móvil, se utilizó una mezcla de metanol (Merck), acetonitrilo (Merck) y tampón fosfato pH 7,5 (0,02 M) en proporciones 12/49/39 % v/v, respectivamente, con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente.

El complejo formado fue detectado midiendo la absorción a 350 nm y el tiempo de retención de los distintos picos osciló entre 3 y 14 min.

Para verificar la reproducibilidad del método se midió el área total de los picos correspondientes a los distintos isómeros de gentamicina. Bajo estas condiciones, el coeficiente de variación del método fue de 2,4%.

#### *b) Determinación de CFX por HPLC*

El método utilizado para determinar las concentraciones de CFX fue el propuesto por Tornainen et al.<sup>107</sup>. La fase móvil consiste en una mezcla de acetonitrilo/ácido fosfórico (Merck) (20 mM, pH 2,3) en proporciones 15/85% v/v, con sal sódica del ácido 1-heptanosulfónico (2,5 mM), a un flujo de 1,5 ml/min, volumen de inyección de 25  $\mu$ l y temperatura ambiente. La detección se realizó a 278 nm. Se prepararon disoluciones patrones de CFX en tampón

citrato de Sørensen, pH 4.0, de concentraciones comprendidas entre 2,5 y 30  $\mu\text{g/ml}$ . El coeficiente de variación del método fue 1,94%.

#### *2.4.1.2.2. Análisis de los antibióticos por difracción de rayos X (DRX)*

Muestras de SG y CFX fueron analizadas por DRX antes y después de la esterilización, con el fin de determinar cambios en la estructura cristalina de los antibióticos componentes del implante.

La DRX fue realizada a temperatura ambiente, con un difractómetro de polvo (Philips XPER'T) equipado con un monocromador secundario y usando la radiación  $K\alpha$  del Cu ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). El intervalo angular fue  $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$ , utilizando un tamaño de paso de  $0,02^\circ$  y un tiempo de tres segundos por paso.

### **2.4.2. Análisis de los componentes del implante**

#### *2.4.2.1. Degradación del polímero*

El efecto de la radiación  $\gamma$  sobre los polímeros constituyentes de los implantes fue evaluado mediante la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC).

Antes y después de la irradiación de los implantes, se analizaron los polímeros por GPC relativa a patrones de poliestireno monodispersos, de acuerdo con el método que se detalla a continuación<sup>100,102,45</sup>, determinando su peso molecular medio en peso ( $M_w$ ) y en número ( $M_n$ ), así como la polidispersividad ( $pd$ ), que proporciona una medida de la dispersión de la curva de distribución.

Las muestras fueron introducidas en tetrahidrofurano (THF) (Merck) para disolver el PLA-30 de los implantes de SG y de CFX y el PLA-200 de la cubierta de los implantes de SG. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La GPC se llevó a cabo utilizando un equipo Waters® compuesto por una bomba modelo 515 HPLC, un inyector manual (Rheodyne®), un detector de índice de refracción modelo 2414 y un horno calefactor. La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el programa Breeze GPC Waters.

Las condiciones cromatográficas fueron: tres columnas (Styragel® HR4, HR3 y HR1) colocadas en serie y temperatura de 31°C (detector y columnas); la fase móvil fue THF filtrado (filtros Millipore FH de 0,5 µm) y desgasificado; el flujo fue de 0,9 ml/min, el tiempo de análisis de 38 min y el volumen de inyección de 20 µl (patrones y muestras).

Para calibrar el sistema se emplearon patrones monodispersos de poliestireno, disueltos en THF, con pesos moleculares de: 2.800, 5.570, 10.300, 43.900, 102.000, 190.000, 355.000 y 710.000 (Tokio Soda Ltd.). La concentración de los patrones fue de 0,05% (p/v) y la de las muestras, de 0,5% (p/v).

#### *2.4.2.2. Alteraciones de la estructura cristalina*

Con el fin de determinar cambios en la estructura cristalina de los componentes del implante, se analizaron por DRX muestras pulverizadas del implante, antes y después de la esterilización.

La DRX fue realizada en las mismas condiciones que las utilizadas para los antibióticos.

### 2.4.3. Análisis morfológico. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para el análisis morfológico antes y después de la irradiación, tanto de la superficie como de los cortes transversales de los implantes, las muestras recubiertas con una película de oro-paladio, fueron examinadas al SEM (Jeol JSM-632) a 15 kV, en el caso de los implantes de CFX y a 10 kV, en los de SG.

### 2.4.4. Ensayos de cesión

Con el fin de evaluar posibles cambios en la cesión de SG y CFX a partir de los implantes, debidos al proceso de esterilización, se llevaron a cabo ensayos de cesión con los implantes irradiados. La metodología usada fue la misma que para los implantes no irradiados, tanto de SG como de CFX.

La comparación de los perfiles de cesión *in vitro* de las formulaciones estériles y no estériles, se realizó mediante el “factor de similitud”  $f_2$ , propuesto por Moore y Flanner<sup>108</sup>, calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left( 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - P_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{ec.4})$$

donde  $R_t$  y  $P_t$  son los porcentajes de antibiótico cedidos a partir de cada una de las dos formulaciones a tiempo  $t$  y  $n$  es el número de puntos muestreados.

El índice  $f_2$  proporciona una medida de la similitud de dos curvas. Puede tomar valores entre 0 y 100, de tal manera que un valor de 100 indicaría que los perfiles de cesión de las dos formulaciones son idénticos, mientras que a medida que dichos perfiles se alejan el uno del otro, el valor

de  $f_2$  tiende a cero. Así, el valor de  $f_2$  para dos curvas que presentan una diferencia promedio de un 10% es igual a  $50^{109}$ .

### **3. Estudios *in vivo***

Los ensayos *in vivo* descritos a continuación, fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de La Laguna.

#### **3.1. Animales de experimentación**

Los animales utilizados en los experimentos fueron conejos machos albinos de raza Neozelandesa, con pesos comprendidos entre 2,5 y 4 kg.

Los animales antes y después de someterlos a las intervenciones quirúrgicas que se detallan a continuación, fueron alojados en jaulas independientes con libre acceso a comida y agua y en condiciones de temperatura y humedad ambiental adecuadas, en el estabulario de la Universidad de La Laguna.

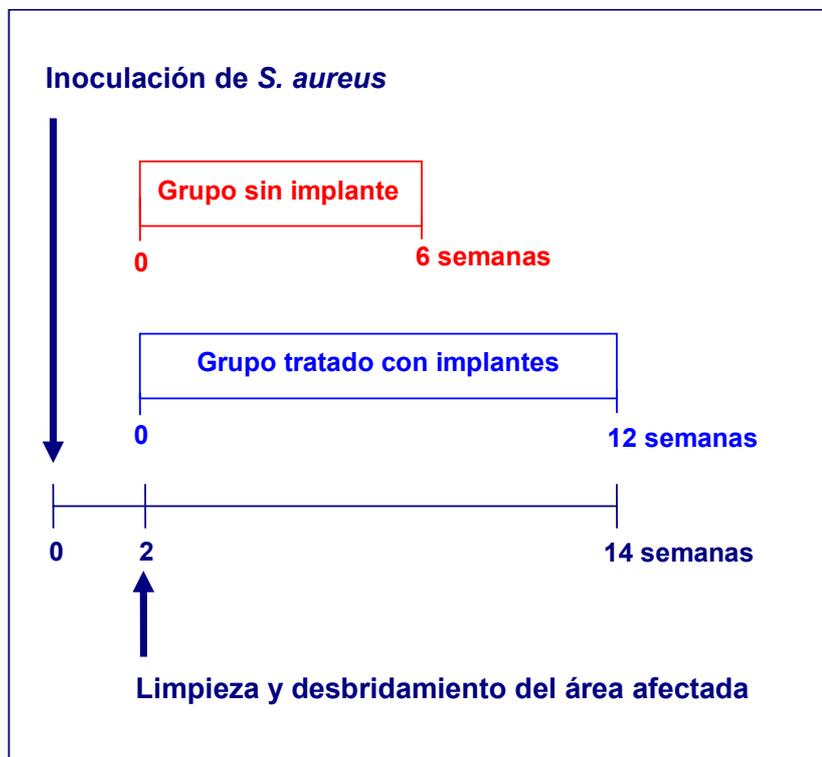
Todos los protocolos experimentales utilizados cumplen la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea, de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE), sobre cuidado y uso de animales para procedimientos experimentales. Asimismo, se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor y las molestias de los animales durante la experimentación.

#### **3.2. Protocolos de experimentación *in vivo***

Los ensayos consistieron en la inducción de una infección ósea por *Staphylococcus aureus*, en el fémur de los animales y, después de dos semanas, la limpieza del foco infeccioso y la colocación del implante a un grupo de animales. El periodo de dos semanas de espera para que se

desarrolle la infección, fue establecido de acuerdo con los resultados obtenidos por Mayberry-Carson et al.<sup>110</sup> y Sasaki e Ishii<sup>98</sup>. El esquema general se muestra en la figura 1. Los experimentos realizados en el grupo de animales tratados con el implante se prolongaron durante 12 semanas, mientras los correspondientes al grupo sin implante, solo se mantuvieron durante 6 semanas.

Todos los procesos microbiológicos se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas, en cabina de flujo laminar (Heraeus, Gemini). El instrumental quirúrgico fue siempre esterilizado en autoclave (Selecta).



**Figura 1.- Esquema de los ensayos in vivo**

### 3.2.1. Protocolo de infección

#### 3.2.1.1. Preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus*

Se preparó un cultivo de *S. aureus* (ATCC 6538) en caldo nutritivo, a partir de una placa de dicha bacteria. El cultivo fue mantenido a 37°C durante 24 h en agitación basculante. Posteriormente se diluyó en suero fisiológico para que quedara una concentración celular de  $10^8$  ufc/ml, que fue utilizada para inocular a los animales de experimentación.

#### 3.2.1.2. Proceso de inducción de la infección

Los animales de experimentación fueron intervenidos según la técnica quirúrgica descrita por Wei et al.<sup>111</sup>, Baro et al.<sup>102</sup> y Castro et al.<sup>45</sup>, modificada por nosotros para adaptarla al proceso de inoculación.

El animal fue anestesiado con una disolución de ketamina (Imalgene® 1000) (35 mg/kg) y xilacina (Rompún®) (5 mg/kg) por vía intramuscular. Seguidamente se procedía al rasurado y lavado de la rodilla de la pata trasera derecha, donde se va a inocular la bacteria.

En el área quirúrgica, la zona rasurada es desinfectada con povidona yodada (Betadine®) y aislada con campos quirúrgicos. Se realiza un abordaje de unos 2,5 centímetros, longitudinal, en la región parapatelar externa seccionando las estructuras periarticulares de la cara externa de la articulación de la rodilla, para poder así luxar la rótula hacia el lado interno, tras la artrotomía correspondiente. Esta maniobra se acompaña con un movimiento de flexo-extensión de la rodilla, que deja expuestos los cóndilos femorales. Se practica un orificio en la región intercondílea, anterior a la inserción femoral de los ligamentos cruzados, con una aguja 18G (1,2 x 40

mm) (Microlance®), que penetra en toda su longitud por la cavidad medular hasta el fémur proximal.

Una vez hecho el orificio, se introduce la aguja 23G (0,6 x 25 mm) (Microlance®) de una jeringa de insulina cargada con 100 µl de la suspensión de *S. aureus*, inoculando lentamente el fémur del animal, desde proximal a distal. Seguidamente se limpia la articulación con suero fisiológico, para retirar los posibles restos bacterianos que emerjan con la sangre, desde la cavidad medular (figura 2).



**Figura 2.-** Proceso de inducción de la infección con *S. aureus*.

Al final de la intervención, los conejos reciben una dosis de 0,5 ml de metamizol (Nolotil® o Neo melubrina®), i.m. como analgesia para el postoperatorio, repitiéndose la misma dosis al cabo de 8-12 h.

Se procede a la reducción de la rótula y se sutura la herida por planos, con material reabsorbible del 4/0 (Polysorb®) para el cierre de la cápsula y fascia y no reabsorbible del 2/0 (Monosof®) para la piel. Por último, se vuelve a limpiar la zona intervenida con Betadine® y se coloca a cada animal en su jaula independiente provista de comida y agua, en un ambiente tranquilo y silencioso.

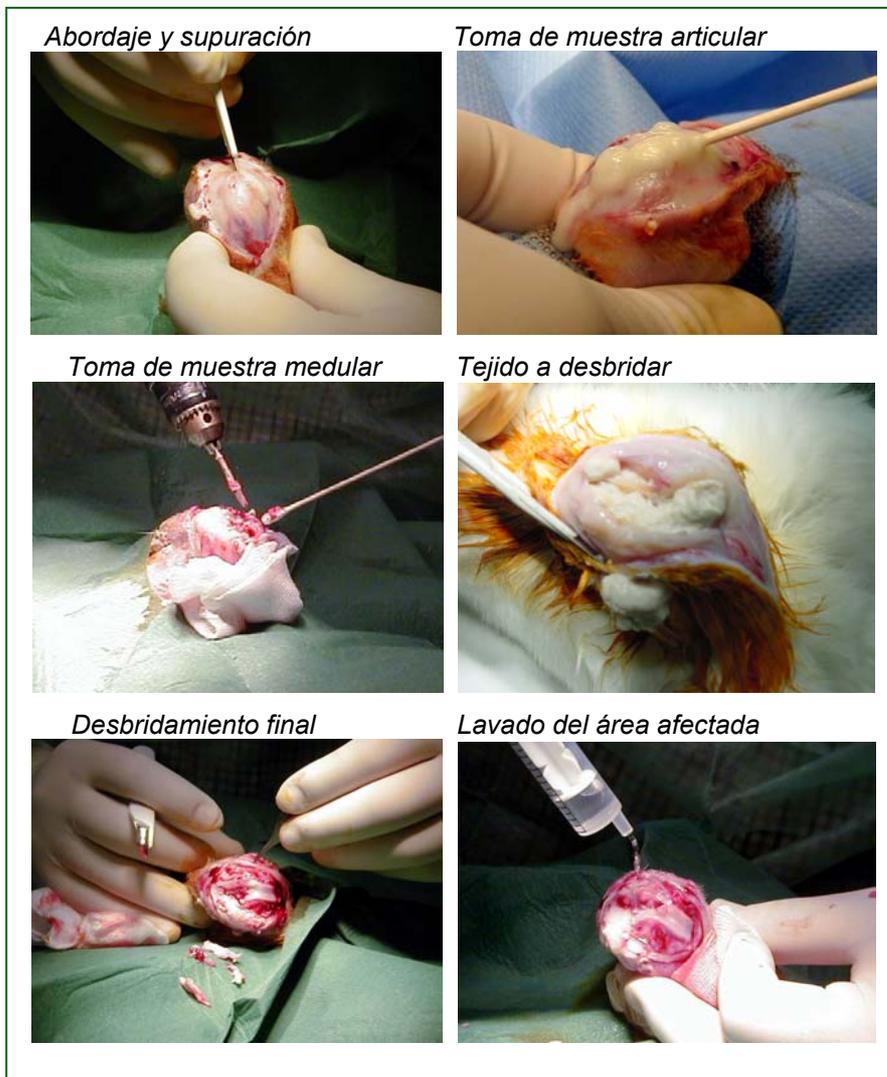
### **3.2.2. Protocolo de limpieza y de implantación en el animal infectado**

#### *3.2.2.1. Procedimiento de limpieza*

Transcurridas dos semanas de la inoculación del fémur, el animal anestesiado se coloca sobre un campo estéril en la mesa del quirófano y se procede a aislar el área a intervenir con un campo estéril fenestrado. Se le administra una dosis de buprenorfina (Buprex®) de 25 µg/kg (0,3 ml), por vía subcutánea, se desinfecta la piel con Betadine® y se realiza la incisión pararotuliana externa longitudinal, de unos 2,5-3 cm. Con un hisopo estéril se toma una muestra de pus del absceso existente alrededor de la zona.

Se profundiza hasta hacer una artrotomía externa y se procede a la luxación hacia el lado medial de la rótula, quedando expuestos los cóndilos femorales. En este momento, se toman muestras de pus que brotan de la medular del fémur por el orificio de inoculación, utilizando hisopo y jeringa. Se desinfecta toda la zona con Betadine® y gasas estériles y se procede al desbridamiento de los tejidos blandos infectados (bordes cutáneos, fístula, fascia, cápsula y sinovial afectadas). Posteriormente, se limpia la zona según

el siguiente orden: solución salina (Braun®), agua oxigenada (Cinfa), solución salina isotónica, Betadine® y solución salina isotónica. En la figura 3 se muestran algunas fases del procedimiento. Seguidamente se continúa la intervención para colocar el implante a los animales que van a ser tratados.



**Figura 3.-** Toma de muestras de pus, desbridamiento y limpieza del área afectada, a las 2 semanas de la inoculación con *S. aureus*.

Al grupo de animales que no van a recibir el tratamiento, se les somete al mismo procedimiento que a continuación se detalla, pero sin insertarles el implante de antibiótico.

### 3.2.2.2. Técnica de inserción del implante

Se realizó siguiendo la técnica quirúrgica de Baro et al.<sup>102</sup> y Castro et al.<sup>45</sup>, de manera que una vez realizada la maniobra que deja expuestos los cóndilos femorales, se practicó un orificio en la región intercondílea, coincidiendo con el orificio de inoculación, anterior a la inserción femoral de los ligamentos cruzados, con fresas de diámetro progresivo hasta 6 mm, idénticas a las empleadas en la cirugía percutánea del pie (Shanon 44 y Wedge Burrs), adaptadas a un motor eléctrico (Minicraft) que alcanza unas 1.200 rpm. El fresado se realizó con la mínima velocidad del motor para evitar la necrosis térmica de los tejidos. De esta manera, se accede a la zona metafisaria y posteriormente, avanzando en profundidad y respetando siempre las corticales, a la diáfisis femoral. Finalmente, el implante previamente pesado se introdujo en la cavidad creada cuidando de no dañarla e intentando que alcance la diáfisis (figura 4).

Para evitar las posibles calcificaciones periarticulares que alterarían los resultados radiológicos, se procede a la limpieza meticulosa de la viruta ósea, producto del fresado. Se continúa con la reducción de la rótula, para terminar con la sutura por planos. Las pérdidas hemáticas con este tipo de intervención son mínimas.

Una vez terminada la intervención, se limpia nuevamente la herida quirúrgica con povidona yodada y se coloca cada animal en su jaula, provista de comida y agua, en un ambiente tranquilo y silencioso.

Cada 8-12 horas, se administra a los conejos una dosis de 0,3 ml de buprenorfina durante las 36-72 primeras horas del periodo postoperatorio, se

aplica povidona yodada a la herida operatoria y se controla el estado general del animal.

Con el fin de confirmar la infección por *S. aureus*, y aunque sólo es un ensayo cualitativo, las muestras tomadas con hisopo y jeringa (estas últimas muestras fueron diluidas con solución salina) se siembran en placas de TSA y se incuban a 37° C durante 18-20 h.



Figura 4.- Técnica de la inserción del implante de CFX en el fémur de conejos.

### **3.2.3. Protocolo de toma de muestras del animal infectado**

Transcurrido el tiempo de estudio previsto para cada animal y una vez anestesiado, se le inyecta una dosis letal de pentotal sódico (Abbott), de 3 ml de una disolución de 50 mg/ml de tiopental en suero fisiológico por vía I.V., en la vena marginal de la oreja.

A continuación se desinfecta la herida o zona de intervención con Betadine® y se secciona la piel, fascia, cápsulas y músculos para abordar la zona y despejar el hueso.

Si hay presencia de pus en la articulación, se toma una muestra con hisopo para confirmar la infección y otra muestra con jeringa de insulina (0,5 ml), que se diluye en un volumen igual de solución salina estéril.

Se procede a la extracción del fémur, desarticulándolo de la rodilla y de la cadera y extrayéndolo con la mínima cantidad posible de tejido muscular por desperiostización, y se coloca sobre un campo estéril, cortándolo con una sierra fina longitudinalmente, de tal forma que quede como un libro abierto. En el caso de animales tratados, se extrae el implante con una espátula estéril y se introduce en la disolución adecuada para extraer el antibiótico.

El fémur abierto por la mitad, se corta transversalmente en dos, separando la zona distal (FD) de la proximal (FP), que se introducen en erlenmeyers de 250 ml, con 20 ml de solución salina estéril y se agitan durante unos minutos (figura 5). Por último, para asegurar la muerte del animal se procede a la sección del diafragma.

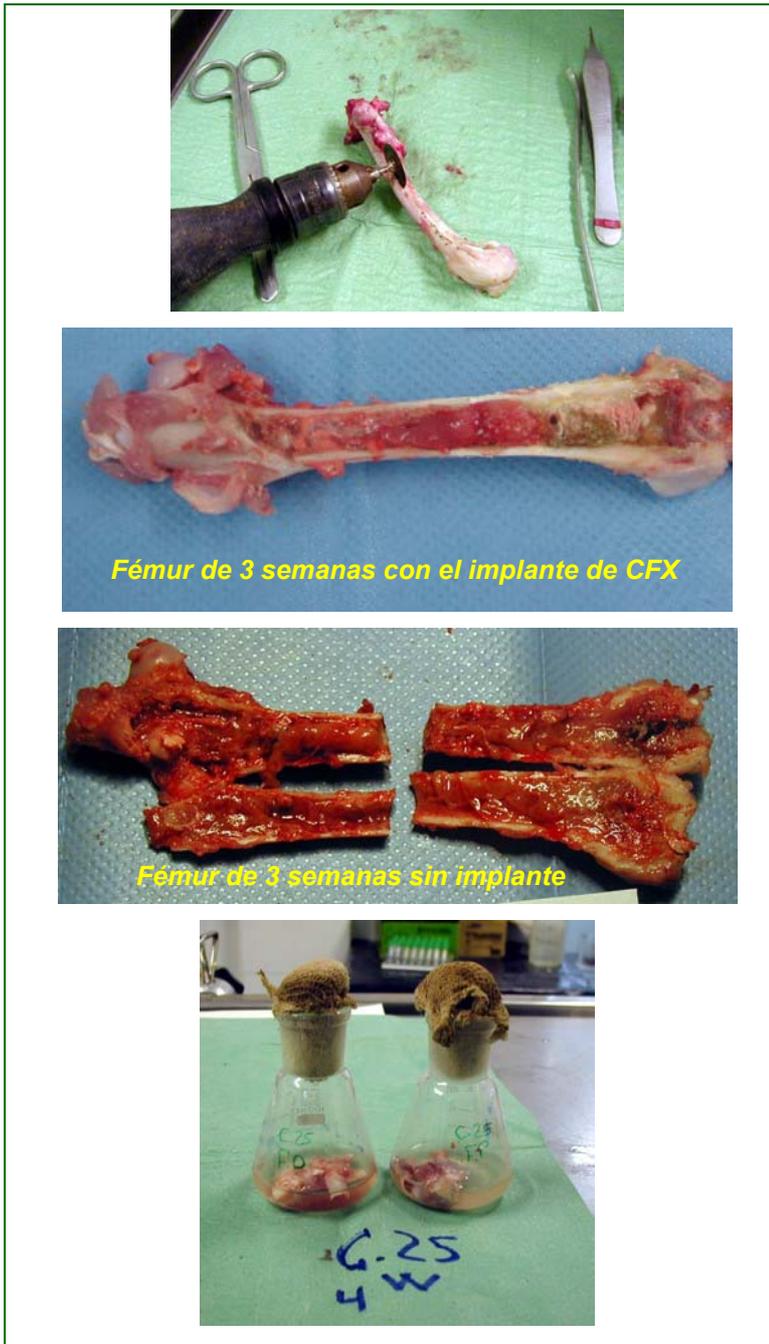


Figura 5.- Tratamiento de muestras.

### 3.2.4. Protocolo de tratamiento de muestras de animales infectados

Las muestras óseas de los animales infectados, obtenidas a distintos tiempos, fueron usadas para realizar el recuento de células viables de *S. aureus*, con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento con implantes de SG y CFX.

- Ensayo cualitativo

Las muestras de pus recogidas con hisopo se sembraron en placas de TSA y se incubaron a 37C° durante 18-20 h.

- Ensayo cuantitativo

Las muestras óseas y las de pus, recogidas con jeringa, se mantuvieron durante 5 min en un baño de ultrasonido y luego, en agitación basculante durante 1 h a temperatura ambiente.

Se determinó la concentración celular mediante diluciones seriadas en solución salina y recuento en placas de TSA.

Las comparaciones de los recuentos de colonias de *S. aureus*, en ufc/ml, del grupo tratado con el implante del antibiótico frente al grupo sin implante, se llevaron a cabo con la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney<sup>112</sup>. El análisis se realizó con el paquete estadístico StatXact 5.0.3 (Cytel Software Co., MA).

### 3.3. Monitorización de parámetros biológicos y signos clínicos de infección

A lo largo de los ensayos se recogieron datos de peso, temperatura, parámetros hematológicos y bioquímicos y signos clínicos de infección, con el

fin de valorar el proceso infeccioso y posteriormente, la curación o no del animal.

Para establecer los valores basales de los parámetros, éstos se midieron antes de infectar a los conejos. En el caso de la temperatura, su valor se tomó desde una semana antes de la infección, para valorar su variabilidad intra e interindividual.

Los parámetros y signos evaluados fueron:

a) Peso

Con el fin de determinar la pérdida o ganancia de peso durante los experimentos, se calculó su variación en cada conejo mediante las ecuaciones x e y, válidas para el periodo de desarrollo de la infección y para el periodo postratamiento, respectivamente:

$$\text{Variación de peso (\%)} = \frac{P_2 - P_i}{P_i} \times 100 \quad (\text{ec. 5})$$

donde:  $P_2$  es el peso del animal al cabo de dos semanas de infectado y  $P_i$ , el peso inicial.

$$\text{Variación de peso (\%)} = \frac{P_t - P_2}{P_2} \times 100 \quad (\text{ec. 6})$$

donde:  $P_t$  es el peso a tiempo t y  $P_2$ , el peso a las dos semanas de infectado.

b) Temperatura rectal

c) Parámetros hematológicos: hematíes, hematocrito (Hto), hemoglobina (Hg), leucocitos, neutrófilos (NE), linfocitos (LY) y plaquetas.

Las muestras de sangre se tomaron periódicamente mediante punción de la vena marginal de la oreja. Se recogían dos muestras, una para el hemograma (tubos heparinizados) y otra para la determinación de niveles séricos de proteína C-reactiva (PCR); el suero obtenido tras la centrifugación de la muestra de sangre, fue conservado a -20°C hasta el momento de su utilización para la valoración de PCR. Los hemogramas fueron realizados en el Servicio del Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias, utilizando un Coulter STKS (Beckman Coulter).

d) Parámetros bioquímicos: Proteína C-Reactiva (PCR)

La valoración de los niveles séricos de PCR se llevó a cabo utilizando un kit para PCR (RapiTex® CRP, Dade Behring) basado en un método de aglutinación con un reactivo de látex que proporciona resultados cualitativos y semi-cuantitativos. La valoración semicuantitativa se llevó a cabo mediante una serie de diluciones de la muestra de suero con solución isotónica de cloruro sódico, a la que posteriormente se le realiza la prueba añadiendo los reactivos incluidos en el kit de valoración. La sensibilidad de la prueba es de aproximadamente 6 mg/l en las condiciones indicadas por el fabricante. Una manifiesta aglutinación se observa en muestras cuya concentración de PCR es superior a los 6 mg/l, por lo que para obtener un valor más aproximado al existente en la muestra, se diluye ésta y se valora la muestra cuya dilución aún deja reconocer una aglutinación evidente. Las muestras sin aglutinación tienen concentraciones de PCR inferiores a 6 mg/l.

Los resultados por tanto, no ofrecen un valor determinado, sino un intervalo en el cual se encuentra el valor real de PCR en la muestra.

e) Signos clínicos indicadores de la infección: desarrollo de artritis, aspecto de la herida, presencia de fístula, supuración articular, sinovitis y grado de afectación articular. Estas observaciones clínicas se hicieron en la articulación

intervenida. El criterio elegido para valorar la gravedad de los síntomas fue: 0 = negativo o normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave.

Las comparaciones de las proporciones de los distintos signos en el grupo tratado con el implante del antibiótico, frente al grupo sin implantar, se llevaron a cabo con la prueba Kruskal-Wallis<sup>112</sup> y el análisis se realizó con el paquete estadístico StatXact 5.0.3 (Cytel Software Co., MA).

### 3.4. Valoración de los antibióticos

Los niveles de antibiótico remanentes en el implante fueron valorados microbiológicamente por quintuplicado, por el método de difusión en agar utilizando *Bacillus subtilis* (CECT 39)<sup>102,45</sup>.

El método microbiológico consistió en:

- Obtención del preinóculo: La preparación del preinóculo de *B. subtilis* se llevó a cabo en caldo nutritivo a 37°C durante 18 horas en agitación basculante.
- Preparación del cultivo bacteriano: Una vez obtenido el preinóculo y tras las diluciones correspondientes, se tomaron 250 µl de la suspensión bacteriana ( $10^6$  ufc/ml) y se mezclaron con 15 ml de agar Mueller-Hinton, obteniéndose una concentración final de  $10^4$  ufc/ml
- Valoración del antibiótico: Tras la solidificación del medio de cultivo, se colocaron los discos de 12,7 mm de diámetro (Schleider & Schuell) cargados con 100 µl de muestra y se incubaron a 37°C aproximadamente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la medida del halo de inhibición, cuantificando la concentración del antibiótico con respecto a una recta de calibrado.
- Control del método: Se llevó a cabo mediante la inclusión de una recta de calibrado en cada valoración. Para obtener las rectas de calibrado se

utilizaron disoluciones patrones del antibiótico en tampón citrato pH 4,0 para CFX y en NaOH 0,01 N, para SG. Los coeficientes de variación del método para CFX y SG fueron 1,58 y 2,6 %, respectivamente.

### 3.5. Análisis radiológico

Periódicamente se realizó el análisis radiológico en los animales vivos, en el Servicio de Radiología de Hospitén Rambla, S.L. (Tenerife).

Las imágenes se tomaron con un aparato Philips®, modelo OPTIMUS, con los siguientes datos: 44 kV, 3.6 mA/s y 15,4 msv. Disparo libre y foco fino. Se utilizaron placas Konica®, de 24x30 cm.

Las radiografías fueron evaluadas por un médico especialista en Radiodiagnóstico ajeno al estudio, valorando los siguientes parámetros:

- Presencia de infección
- Partes blandas
- Reacción perióstica
- Presencia de interfase implante-hueso
- Aspecto de la cortical
- Aspecto de la medular
- Aspecto del implante

### 3.6. Análisis histopatológico

A tiempos predeterminados y una vez extraído el fémur, se procedió a su estudio anatomopatológico por un médico especialista en Anatomía Patológica independiente al estudio. Las piezas óseas fueron conservadas en una disolución de formaldehído al 10% hasta el momento de su análisis. Las muestras fijadas, previamente decalcificadas en una disolución de ácido

fórmico al 10%, se embebieron en parafina líquida y se cortaron en secciones de 6  $\mu\text{m}$  para ser posteriormente, teñidas con hematoxilina y eosina y examinadas al microscopio óptico.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **ESTUDIOS IN VITRO**

Como se expone en el apartado de objetivos, la finalidad de este trabajo es la evaluación de la eficacia de una formulación de gentamicina y otra de ciprofloxacino frente a la infección ósea producida por *S. aureus*. Tanto el método de elaboración de los implantes, como su caracterización, fueron objeto de otras tesis doctorales previas<sup>113,114</sup>. Los implantes de gentamicina previamente estudiados, fueron elaborados con una carga de antibiótico de un 3,5% y de acuerdo con el rendimiento de incorporación, la dosis final incorporada fue de aproximadamente un 3%, alcanzándose niveles de gentamicina en hueso muy próximos a las CMI. Sin embargo, los implantes de ciprofloxacino se elaboraron con un 10% de antibiótico y los niveles óseos detectados fueron muy superiores a las CMI, por ello y teniendo en cuenta que la potencia antimicrobiana de ambos antibióticos frente al *S. aureus* es muy próxima, se consideró que la formulación con gentamicina debía contener una dosis similar a la de ciprofloxacino.

### **1. Gentamicina**

#### **1.1. Elaboración de implantes de gentamicina**

Los implantes de gentamicina se elaboraron tal y como se recoge en el apartado de material y métodos. El rendimiento del proceso de granulación fue del  $88,4 \pm 2,51\%$  ( $n = 4$ ) mientras que el contenido experimental y la eficacia de incorporación fueron de  $9,67 \pm 0,207\%$  y  $80,6 \pm 1,72\%$ , respectivamente, lo que supone una carga real de antibiótico muy próxima al 10%, coincidiendo con el contenido de los implantes de ciprofloxacino.

Las características de los implantes elaborados se muestran en la tabla 2.

Implantes recubiertos		Cubierta	
Peso (mg)	Dimensiones (mm)	Peso (mg)	Espesor (mm)
467,8 (± 42,7)	12,5 x 6,06 x 4,09 (± 0,232 x 0,348 x 0,241)	33,7 (± 5,64)	0,2 (± 0,086)

**Tabla 2.-** Peso y dimensiones de los implantes de SG y de la cubierta de PLA-200 ( $n = 20$ ).

## 1.2. Esterilización de los implantes de gentamicina

La inspección visual de SG polvo, reveló un discreto cambio en el color después de la irradiación, pasando de blanco-cremoso a ligeramente amarillo. Sin embargo, no se apreciaron cambios de color en los implantes.

### 1.2.1. Análisis de gentamicina

#### 1.2.1.1. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la actividad biológica de SG

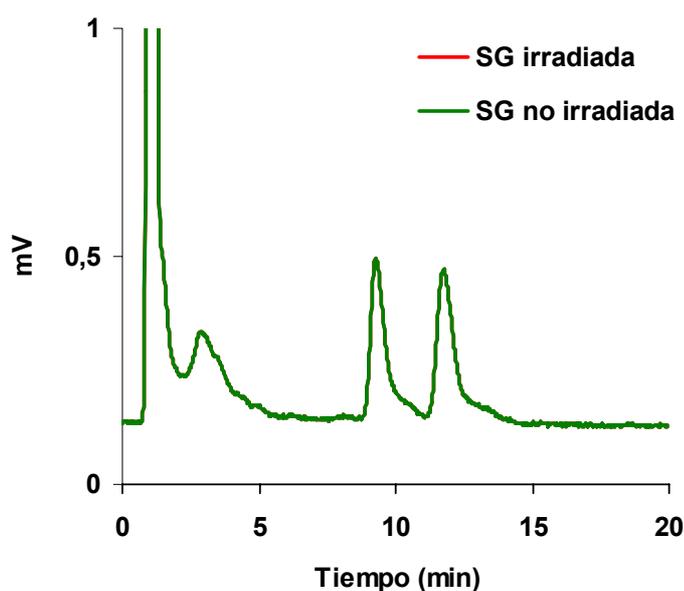
Para evaluar la influencia de la radiación  $\gamma$  sobre la actividad del SG, se determinó su actividad biológica a través de las CMI y CMB de SG frente a *S. aureus*, antes y después de la irradiación, no encontrándose diferencias. De hecho, las concentraciones fueron las mismas para el antibiótico irradiado y no irradiado: CMI entre 1,5 y 2  $\mu\text{g/ml}$  y CMB igual a 2  $\mu\text{g/ml}$ .

### **1.2.1.2. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la estabilidad química de SG**

La posible degradación del antibiótico bajo las condiciones de esterilización, se estudió utilizando la técnica de HPLC.

El análisis por DRX de SG polvo no se realizó, ya que es una sustancia esencialmente amorfa<sup>115</sup>.

En la figura 6 se muestran los cromatogramas obtenidos para las disoluciones preparadas con SG irradiada y no irradiada. Como puede observarse, el perfil cromatográfico de SG después de irradiada se superpone al obtenido a partir de muestras no irradiadas. En los cromatogramas se observan tres picos característicos de SG a los tiempos de retención de 3, 9 y 11,9 min. El pico saturado que aparece antes de los 3 minutos corresponde a la fase móvil. Estos resultados indican que la gentamicina permanece estable después de someterla a una dosis de radiación de 25 kGy y por lo tanto, no hay evidencias de degradación del antibiótico.



**Figura 6.-** Efecto de la radiación  $\gamma$  sobre el perfil cromatográfico del sulfato de gentamicina (SG).

## 1.2.2. Análisis de los componentes del implante

### 1.2.2.1. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la degradación del polímero

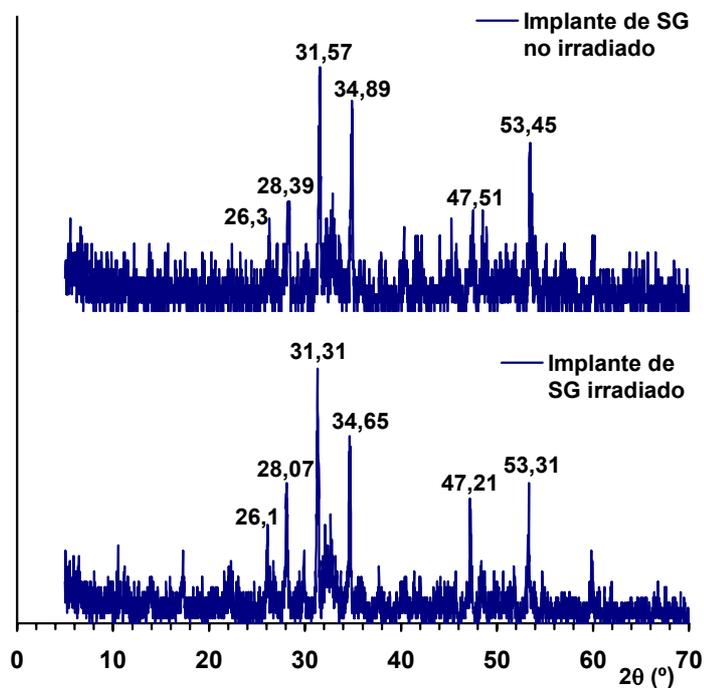
La influencia de la radiación  $\gamma$  en la degradación de los polímeros se comprobó determinando los pesos moleculares del PLA-30 y PLA-200, como componentes aislados y como constituyentes del implante, a tiempo cero y después de tres semanas en incubación en el medio de cesión. En la tabla 3 se recogen los resultados obtenidos por GPC con muestras no irradiadas e irradiadas.

	Mw (Da)	Mn (Da)	pd
<u>Muestras no irradiadas</u>			
PLA-200	221025 ± 1350	125914 ± 2545	1,75 ± 0,013
PLA-30	28207 ± 355	18420 ± 126	1,53 ± 0,016
<u>Implante, t = 0</u>			
Cubierta (PLA-200)	226726 ± 7825	144395 ± 3684	1,57 ± 0,014
Matriz (PLA-30)	27681 ± 398	18315 ± 148	1,52 ± 0,018
<u>Implante, t = 3 semanas</u>			
Cubierta (PLA-200)	223002 ± 735	122389 ± 6365	1,52 ± 0,011
Matriz (PLA-30)	26894 ± 110	17638 ± 182	1,82 ± 0,102
<u>Muestras irradiadas</u>			
PLA-200	88125 ± 5735	45871 ± 7365	1,92 ± 0,101
PLA-30	23309 ± 615	14653 ± 132	1,59 ± 0,019
<u>Implante, t = 0</u>			
Cubierta (PLA-200)	126725 ± 9848	70781 ± 10250	1,79 ± 0,12
Matriz (PLA-30)	25546 ± 70	17133 ± 775	1,49 ± 0,071
<u>Implante, t = 3 semanas</u>			
Cubierta (PLA-200)	88851 ± 761	40228 ± 999	2,21 ± 0,055
Matriz (PLA-30)	23036 ± 929	14765 ± 589	1,56 ± 0,035

**Tabla 3.** Efecto de la radiación  $\gamma$  sobre los pesos moleculares medios en peso (Mw) y en número (Mn) y polidispersividad (pd) de los polímeros, como productos aislados y como constituyentes de los implantes de gentamicina, al inicio ( $t = 0$ ) y final ( $t = 3$  semanas) del ensayo de cesión *in vitro*. Valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ).

### 1.2.2.2. Alteraciones en la estructura cristalina de los componentes

Los perfiles de difracción de rayos X de los componentes del implante de SG se muestran en la figura 7. El difractograma observado corresponde al fosfato tricálcico, no apreciándose el pico correspondiente a la HAP, por la pequeña proporción en la que se encuentra en la mezcla. El resto de los componentes del implante, al ser amorfos, no presentan picos de Bragg. Por tanto, la única conclusión que se extrae es que la radiación  $\gamma$  no afecta la estructura de los fosfatos.

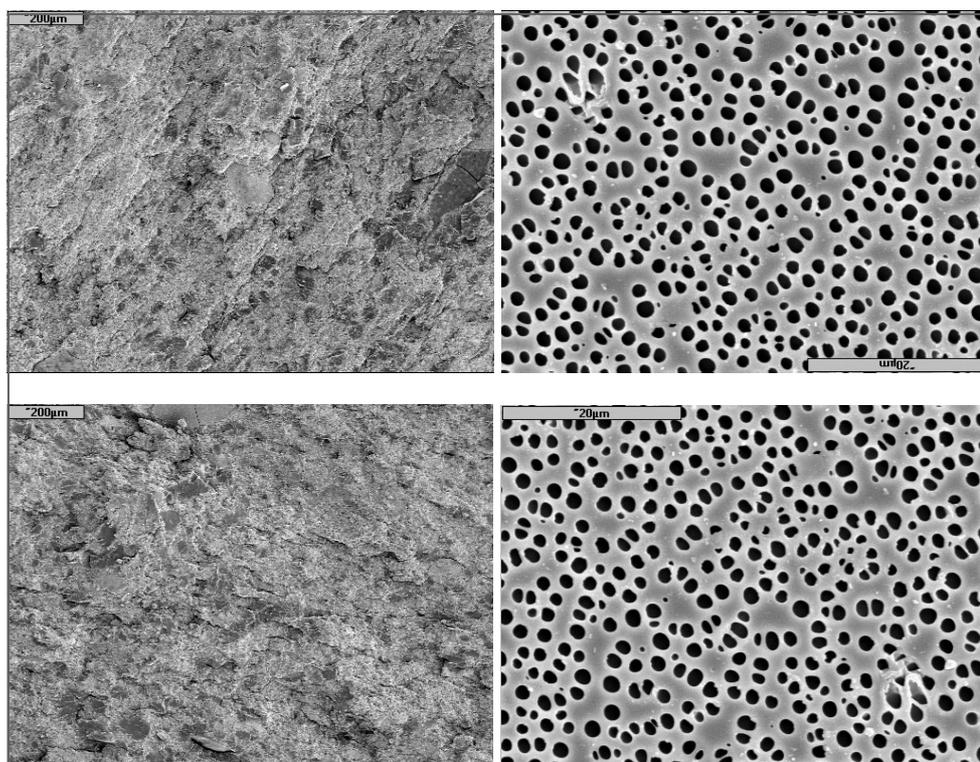


**Figura 7.-** Perfil de difracción de rayos X de implantes de sulfato de gentamicina (SG), no irradiados e irradiados, a tiempo  $t = 0$ .

### 1.2.3. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la morfología de los implantes

El análisis de los implantes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó con el objetivo de evaluar posibles cambios en la morfología de los implantes, como consecuencia de la irradiación.

En la figura 8 se muestran las microfotografías obtenidas con muestras irradiadas y no irradiadas, tanto del implante completo, como de las secciones transversales del mismo, no apreciándose alteración alguna.



**Figura 8.-** Microfotografías del corte transversal (x85) (izquierda) y del exterior (x2000) (derecha) de implantes de sulfato de gentamicina, no irradiados (microfotografías superiores) e irradiados (microfotografías inferiores), a tiempo  $t = 0$ .

#### 1.2.4. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre el perfil de cesión *in vitro*

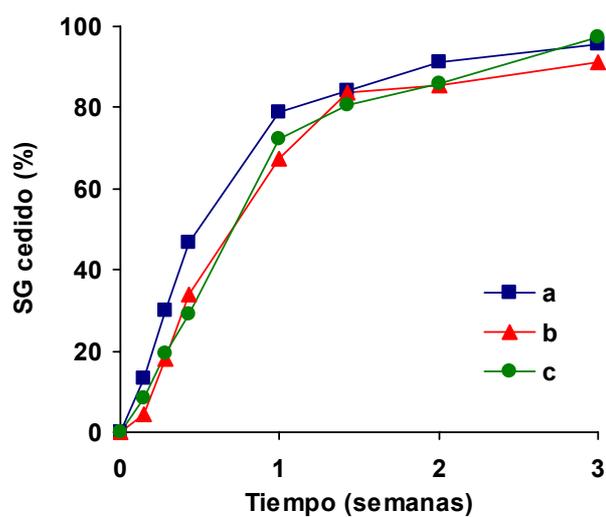
En las tablas 4 y 5 se recogen las cantidades de SG cedidas desde los implantes no irradiados e irradiados y en las figuras 9 y 10 se representan sus correspondientes perfiles de cesión.

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación estándar
	a	b	c		
0,143	4,72	1,65	3,36	3,25	1,54
0,286	10,6	6,51	7,96	8,35	2,06
0,429	16,5	12,3	11,9	13,5	2,56
1	27,8	24,4	29,7	27,3	2,69
1,43	29,7	30,2	33,2	31,0	1,85
2	32,2	30,9	35,3	32,8	2,30
3	33,7	32,9	40,0	35,5	3,87

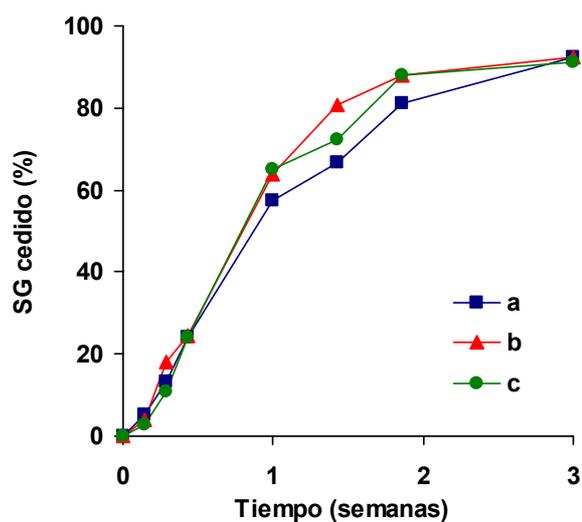
**Tabla 4.-** Cantidad de gentamicina cedida (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con los implantes no irradiados (35,4, 36,0 y 41,0 mg iniciales de sulfato de gentamicina para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación estándar
	a	b	c		
0,143	2,29	1,98	1,26	1,84	0,53
0,286	5,68	8,60	4,77	6,35	2,00
0,429	10,4	11,7	10,4	10,9	0,77
1	24,9	30,6	28,3	27,9	2,91
1,43	28,9	38,8	31,4	33,0	5,12
2	35,1	42,1	38,3	38,5	3,54
3	39,9	44,2	39,8	41,3	2,54

**Tabla 5.-** Cantidad de gentamicina cedida (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con los implantes irradiados (43,3, 47,9 y 43,6 mg iniciales de sulfato de gentamicina para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

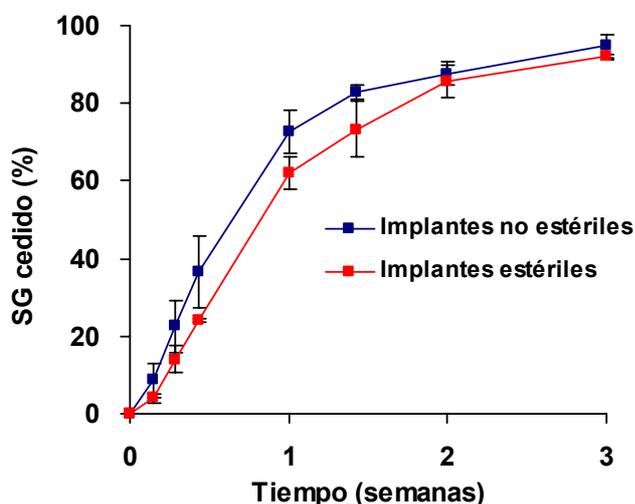


**Figura 9.-** Porcentajes acumulados de sulfato de gentamicina (SG) cedida a partir de los implantes no irradiados, en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 10.-** Porcentajes acumulados de sulfato de gentamicina (SG) cedida a partir de los implantes irradiados, en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

En la figura 11 puede apreciarse el efecto de la radiación  $\gamma$  sobre los perfiles de cesión medios de SG a partir de los implantes irradiados y no irradiados.



**Figura 11.-** Efecto de la radiación  $\gamma$  sobre el perfil de cesión *in vitro* de sulfato de gentamicina (SG) a partir de los implantes no irradiados e irradiados.

Con objeto de comprobar la equivalencia de los perfiles de disolución *in vitro* de los dos tipos de implantes, irradiados y no irradiados, se estimó el factor de similitud  $f_2$ , empleando los datos de cesión hasta las 2 semanas, cuando se ha cedido el 85% de SG. El valor obtenido, 52,8, indica que la radiación  $\gamma$  no parece afectar la cesión de SG desde estos implantes.

Asimismo se comprobó la equivalencia entre los perfiles de disolución de los tres replicados de cada tipo de implante, con el perfil correspondiente a sus valores medios. Esto nos permite determinar la variabilidad dentro de cada lote. Los resultados de los valores de  $f_2$  obtenidos, se recogen en la

tabla 6. Como en el caso anterior, los perfiles de cesión de los replicados son equivalentes para cada tipo de implante.

Lote	Implantes no irradiados			Implantes irradiados		
	I	II	III	I	II	III
$f_2$	60,3	71,8	71,7	70,2	70,8	81,8

**Tabla 6.-** Valores del factor de similitud,  $f_2$ , calculados para los tres replicados de cada lote de implantes de sulfato de gentamicina, usando como referencia los datos medios de cesión correspondientes a ese lote.

## 2. Ciprofloxacino

### 2.1. Elaboración de los implantes de CFX

Los implantes de ciprofloxacino fueron elaborados por compresión directa de la mezcla de fosfatos, PLA-30 y CFX. El peso medio resultante fue de  $499,9 \pm 2,167$  mg y sus dimensiones  $8,9 (\pm 0,051) \times 6,0 (\pm 0,025)$  mm ( $n = 25$ ), siendo el porcentaje de CFX incorporado del  $10,02 \pm 0,09\%$ .

### 2.2. Esterilización de los implantes de CFX

En la caracterización de los implantes de CFX y sus componentes antes y después de su esterilización, se procedió de igual forma que en el estudio con sulfato de gentamicina. En este caso, no se apreciaron cambios de color en el polvo ni en los implantes después de la irradiación.

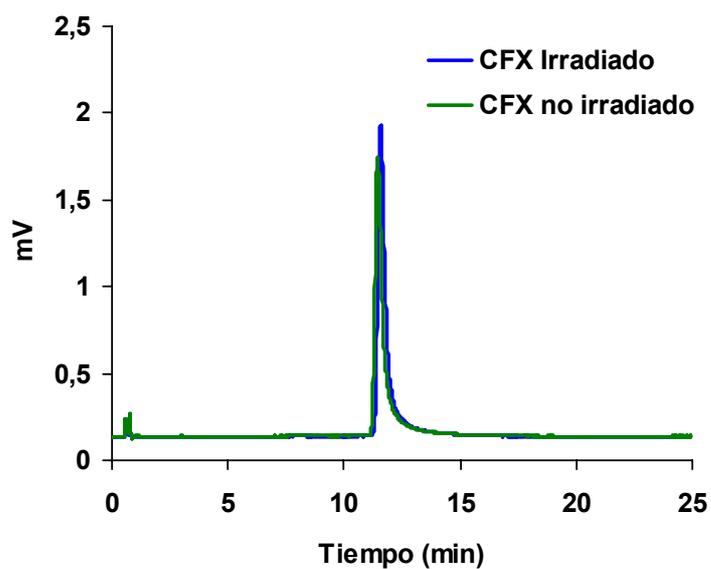
## **2.2.1. Análisis de CFX**

### **2.2.1.1. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la actividad biológica de CFX**

Al realizar el ensayo de actividad biológica de CFX polvo, estéril y no estéril, frente a *S. aureus*, se obtuvo un valor de CMI comprendido entre 0,1 y 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y de CMB de 1  $\mu\text{g/ml}$ , para ambas muestras. Claramente, la actividad antimicrobiana de CFX no se ve afectada por el proceso de esterilización.

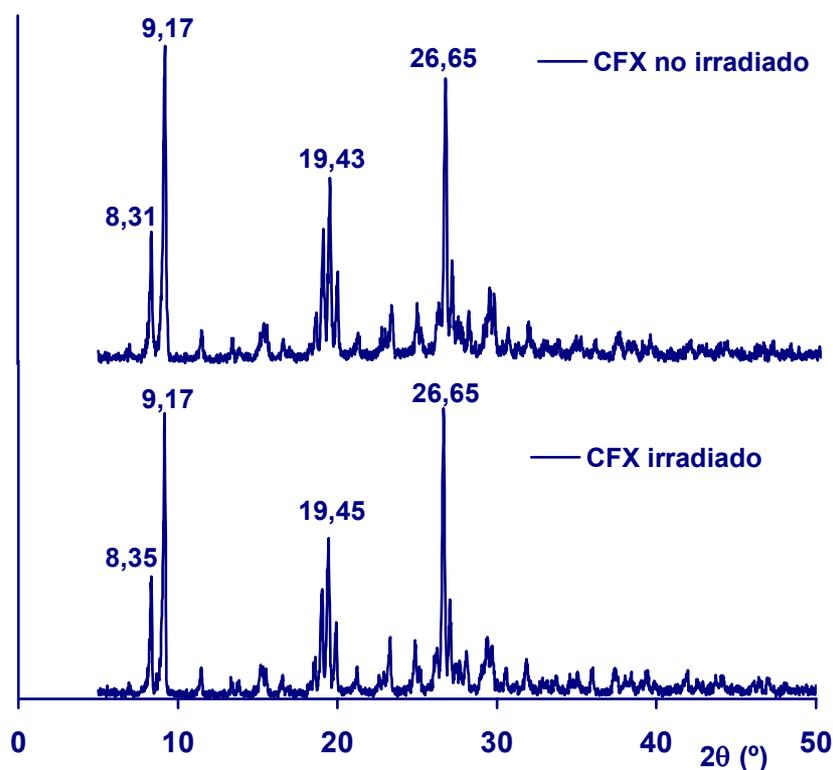
### **2.2.1.2. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la estabilidad química y estructura cristalina de CFX**

Para evaluar la estabilidad química del CFX se utilizó la técnica de HPLC. Los cromatogramas que se muestran en la figura 12, fueron obtenidos a partir de disoluciones de CFX polvo irradiado y no irradiado, observándose en ellos un pico característico a los 12 min. Los perfiles cromatográficos se superponen, por lo que no hay evidencias de degradación o descomposición de CFX.



**Figura 12.-** Cromatogramas de ciprofloxacino (CFX) polvo, antes y después de la esterilización por radiación  $\gamma$ .

Asimismo, en el análisis de DRX no se observan cambios en la estructura cristalina como consecuencia de la irradiación (figura 13). En los difractogramas, los picos de Bragg observados a  $8,31 (2\theta)$ ,  $9,17 (2\theta)$ ,  $19,43 (2\theta)$  y  $26,65^\circ (2\theta)$ , característicos de CFX, no se modifican. Es evidente que la esterilización por radiación no afecta la estructura cristalina de este antibiótico.



**Figura 13.-** Difractogramas de ciprofloxacino (CFX) polvo, antes y después de la esterilización por radiación  $\gamma$ .

## 2.2.2. Análisis de los componentes del implante

### 2.2.2.1. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la degradación del polímero

En la tabla 7 se recoge el efecto de la esterilización por radiación sobre el peso molecular y polidispersividad del polímero (PLA-30) constituyente de los implantes de CFX. Conjuntamente se muestran los

valores obtenidos para el PLA-30, como producto aislado, recogidos previamente en el correspondiente apartado del estudio con gentamicina.

	Mw (Da)	Mn (Da)	pd
<u>Muestras no irradiadas</u>			
PLA-30	28207 ± 355	18420 ± 126	1,53 ± 0,016
PLA-30 del implante	27632 ± 415	17040 ± 548	1,62 ± 0,131
<u>Muestras irradiadas</u>			
PLA-30	23309 ± 615	14653 ± 132	1,59 ± 0,019
PLA-30 del implante	23633 ± 775	14536 ± 621	1,62 ± 0,012

**Tabla 7.-** Efecto de la radiación  $\gamma$  sobre el peso molecular medio en peso (Mw) y en número (Mn) y polidispersividad (pd) del polímero (PLA-30) como producto aislado y como constituyente de los implantes de ciprofloxacino, a tiempo,  $t = 0$ . Valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ).

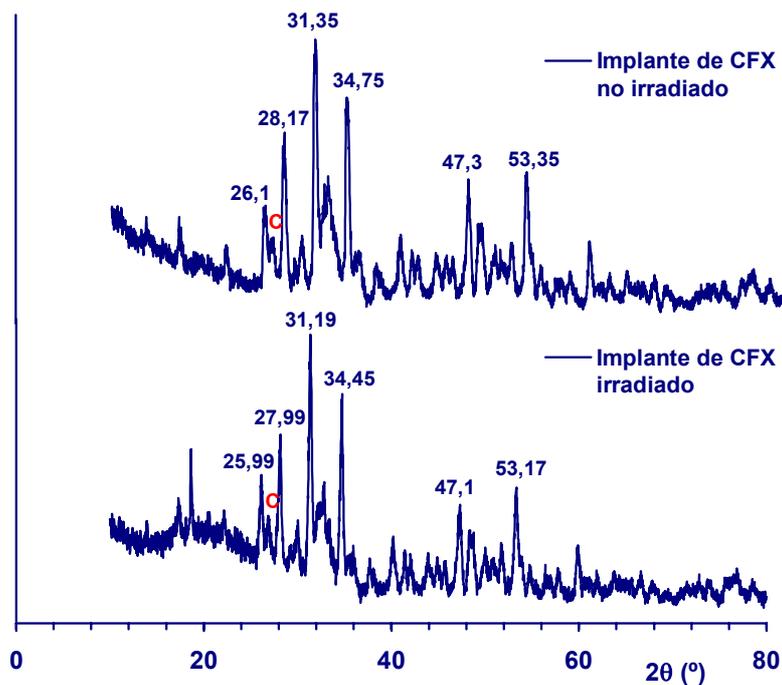
Los datos obtenidos ponen de manifiesto que el proceso de esterilización no afecta al peso molecular del PLA-30 utilizado en la elaboración de los implantes de CFX. El Mw disminuye ligeramente, pasando de un valor inicial de 27,6 kDa a 23,6 kDa después de la irradiación. Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación del método es del 5%, los resultados no indican degradación del PLA-30 durante la esterilización de los implantes de CFX.

#### 2.2.2.2. Alteraciones de la estructura cristalina de los componentes

En los difractogramas de los componentes del implante de CFX que se muestran en la figura 14, solo se pueden observar claramente los picos característicos del fosfato tricálcico, no apreciándose la mayoría de los picos

de Bragg correspondientes al CFX, excepto el de 26,65 ( $2\theta$ ), aunque muy débilmente debido a la pequeña cantidad que hay en la formulación, un 10%.

Analizando los difractogramas de la figura 14, no observamos cambios apreciables en los perfiles, por lo que podemos confirmar que la radiación  $\gamma$  no afecta la estructura cristalina de los componentes del implante de CFX.

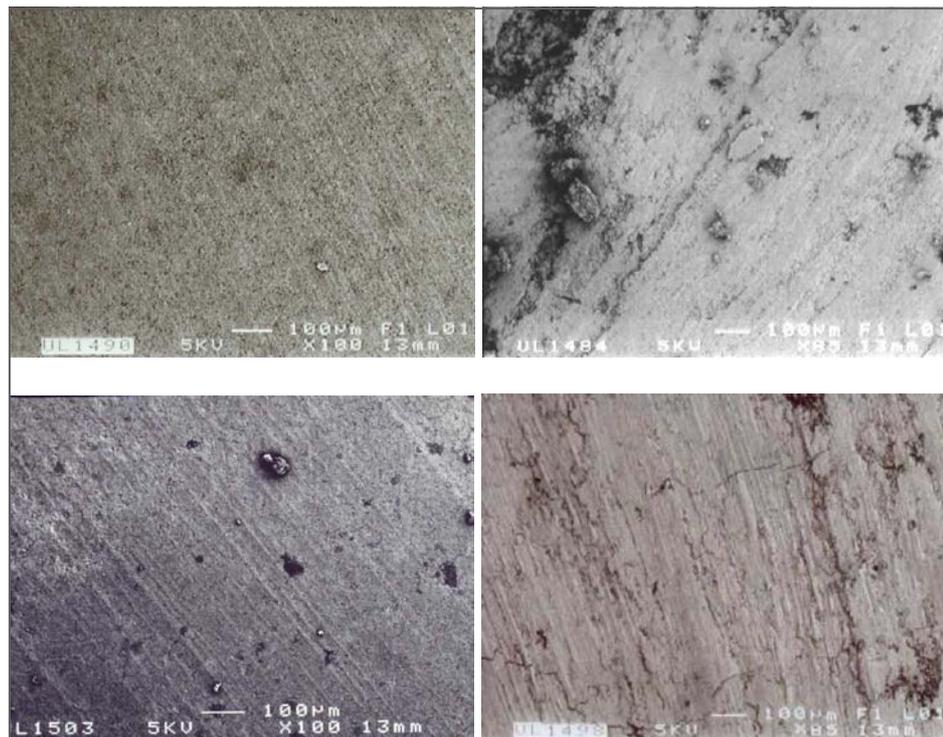


**Figura 14.-** Perfil de difracción de rayos X de implantes de ciprofloxacino (CFX), no irradiados e irradiados a tiempo,  $t = 0$ . (C = pico de Bragg a  $26,7^\circ$  correspondiente a CFX).

### 2.2.3. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre la morfología de los implantes

En la figura 15 se muestran las microfotografías de las muestras de implantes de CFX no irradiados e irradiados, tanto del implante completo,

como de las secciones transversales. En las imágenes se pueden observar que tanto la capa externa, como la estructura interna del implante, inicialmente se mantienen intactas, no apreciándose cambios relacionados con un aumento de porosidad o una mayor erosión debidos a la radiación, por lo que parece que la radiación  $\gamma$  no afecta la morfología de estos implantes.



**Figura 15.-** Microfotografías del exterior (x100) (izquierda) y del corte transversal (x85) (derecha) de implantes de ciprofloxacino, no irradiados (microfotografías superiores) e irradiados (microfotografías inferiores), a tiempo  $t = 0$ .

### 2.2.4. Efecto de la radiación $\gamma$ sobre el perfil de cesión *in vitro*

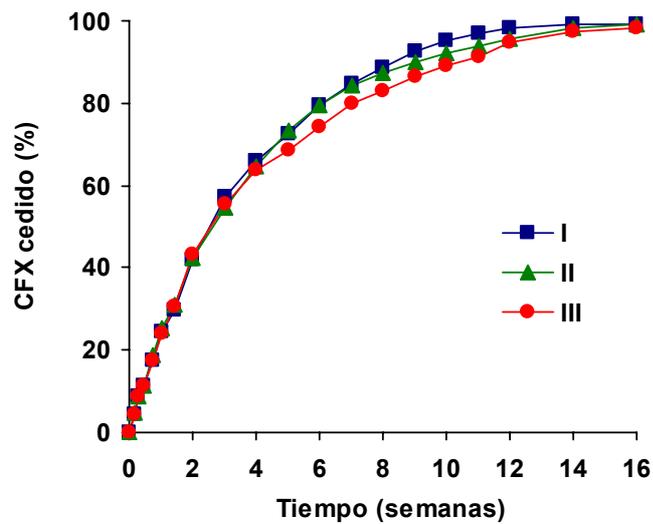
En las tablas 8 y 9 se recogen las cantidades de CFX cedidas desde los implantes no irradiados e irradiados, y en las figuras 16 y 17, se representan sus correspondientes perfiles de cesión.

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación estándar
	I	II	III		
0,143	2,26	2,33	2,19	2,26	0,07
0,286	4,41	4,33	4,26	4,33	0,07
0,429	5,65	5,68	5,58	5,64	0,05
0,714	8,79	9,28	8,64	8,90	0,34
1	12,3	12,7	12,0	12,3	0,34
1,429	14,9	15,3	15,3	15,2	0,27
2	21,0	21,1	21,5	21,2	0,28
3	28,5	27,2	27,8	27,9	0,66
4	32,9	32,2	31,7	32,3	0,57
5	36,3	36,6	34,3	35,7	1,24
6	39,6	39,6	37,1	38,8	1,44
7	42,3	42,0	39,9	41,4	1,27
8	44,2	43,6	41,5	43,1	1,39
9	46,1	44,8	43,1	44,7	1,51
10	47,6	45,8	44,4	45,9	1,57
11	48,3	46,7	45,54	46,8	1,37
12	48,9	47,7	47,2	47,9	0,89
14	49,5	48,9	48,7	49,0	0,42
16	49,5	49,4	49,1	49,4	0,19

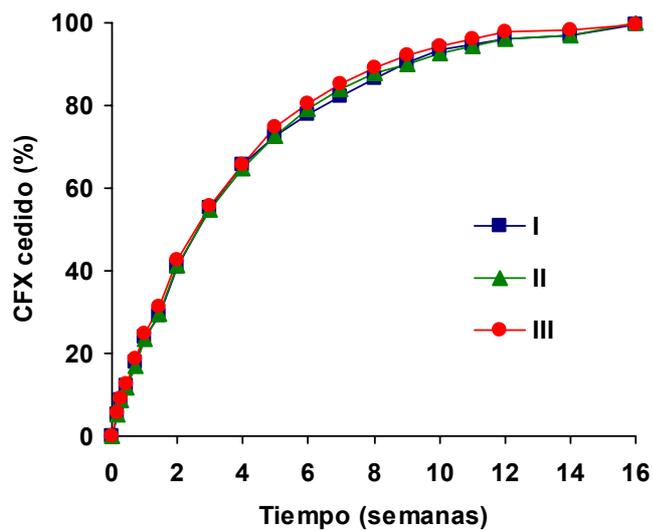
**Tabla 8.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con los implantes no irradiados (49,9, 49,8 y 49,9 mg iniciales de ciprofloxacino para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación estándar
	I	II	III		
0,143	2,7	2,68	2,93	2,77	0,14
0,286	4,27	4,29	4,57	4,38	0,17
0,429	5,97	5,90	6,37	6,08	0,26
0,714	8,84	8,56	9,24	8,88	0,34
1	11,9	11,8	12,5	12,1	0,37
1,429	14,6	14,8	15,6	15,0	0,56
2	20,5	20,7	21,3	20,8	0,43
3	27,6	27,3	27,7	27,6	0,24
4	32,7	32,3	32,8	32,6	0,25
5	36,3	36,3	37,3	36,7	0,61
6	38,8	39,5	40,2	39,5	0,65
7	41,0	41,9	42,6	41,8	0,81
8	43,2	43,7	44,6	43,8	0,70
9	45,2	44,9	46,0	45,4	0,57
10	46,7	46,2	47,1	46,7	0,45
11	47,3	47,1	48,0	47,5	0,47
12	47,9	48,0	48,9	48,3	0,55
14	48,5	48,4	49,1	48,7	0,38
16	49,8	49,9	49,7	49,8	0,10

**Tabla 9.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con los implantes irradiados (50, 49,9 y 49,9 mg iniciales de ciprofloxacino para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 16.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de los implantes no irradiados, en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



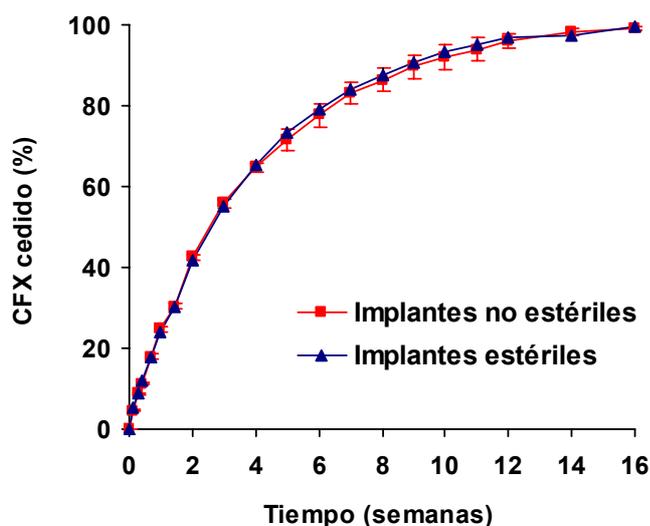
**Figura 17.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de los implantes irradiados, en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

En la tabla 10 se encuentran recogidos los valores obtenidos de  $f_2$  al comparar los perfiles de cesión de los tres replicados de cada tipo de implante con el perfil correspondiente a sus valores medios. Los datos confirman la observación gráfica de que la variabilidad intralote, tanto para los implantes estériles, como no estériles, es despreciable.

Lote	Implantes no irradiados			Implantes irradiados		
	I	II	III	I	II	III
$f_2$	91,6	92,8	84,4	94,5	98,3	92,4

**Tabla 10.-** Valores del factor de similitud,  $f_2$ , calculados para los tres replicados de cada lote de implantes de ciprofloxacino, usando como referencia los datos medios de cesión correspondientes a ese lote.

Asimismo, en la figura 18 puede apreciarse la superposición de los perfiles de cesión de CFX a partir de los implantes irradiados y no irradiados, El factor de similitud  $f_2$ , estimado a partir de los datos de porcentajes medios cedidos de CFX hasta el 85%, fue de 93,2. Claramente, la equivalencia entre los perfiles es indiscutible, por lo que la radiación no afecta la cesión de CFX desde estos implantes.



**Figura 18.-** Efecto de la radiación  $\gamma$  sobre el perfil de cesión *in vitro* de ciprofloxacino (CFX) a partir de los implantes no irradiados e irradiados.

### 3. Discusión de los resultados de esterilización

La esterilización de fármacos o de sistemas diseñados para ser implantados es un aspecto de gran importancia en Tecnología Farmacéutica, prefiriéndose la esterilización del producto final, al proceso aséptico de elaboración. Actualmente, el uso de radiaciones altamente energéticas en la esterilización de productos farmacéuticos ha aumentado, fundamentalmente por los inconvenientes, aceleración de la degradación de los productos o restos de residuos tóxicos de difícil eliminación, que presentan los métodos de esterilización convencionales, como el calor húmedo o seco y el empleo de óxido de etileno. Las radiaciones ionizantes son las más empleadas y en concreto radiaciones  $\gamma$  producidas por fuentes de  $^{60}\text{Co}$  o  $^{137}\text{Cs}$ , caracterizadas por un alto poder de penetración<sup>116</sup>. Una dosis uniforme de 25 kGy se considera, de acuerdo con las normas de buena práctica de manufactura

(GMP), suficiente para la esterilización<sup>104</sup>. Sin embargo, cuando la radiación  $\gamma$  interacciona con el sistema a esterilizar, se pueden modificar tanto las propiedades de los fármacos, como la de los componentes del sistema<sup>117</sup>.

La esterilización de los implantes elaborados en este trabajo es necesaria, ya que son sistemas diseñados para ser insertados en la cavidad intramedular, donde se encuentra el foco de infección. La elección del método de esterilización se hizo teniendo en cuenta que, tanto los antibióticos como los polímeros utilizados, son sensibles a la humedad y al calor. Sin embargo, el efecto de la radiación  $\gamma$  sobre este tipo de sistemas de liberación de fármacos, aunque ha sido ampliamente estudiado, es muy controvertido, según los resultados obtenidos por diversos autores<sup>118-129</sup>.

En nuestro caso, los resultados indican claramente que el proceso de esterilización no afecta a la estructura ni a la actividad antimicrobiana de los antibióticos empleados. En cuanto a los polímeros, hemos de resaltar que el PLA-30 constituyente de la matriz, no se modifica en los implantes de SG ni de CFX; el peso molecular en peso se mantiene, y la polidispersividad prácticamente no se modifica. Por el contrario, el PLA-200 empleado en el recubrimiento de los implantes de gentamicina, reduce su peso molecular y la polidispersividad aumenta ligeramente, debido a que la disminución del peso molecular en número (Mn) es ligeramente más acentuada que en peso (Mw). Si se analizan los resultados mostrados en la tabla 3, podemos observar que este efecto es mucho más acusado cuando se somete a la radiación, el polímero en polvo, que cuando se encuentra formando la cubierta de los implantes; probablemente esto es debido a que la superficie expuesta es mucho mayor. Sin embargo, el mecanismo de degradación debe ser el mismo, pues en ambos casos se reducen los pesos moleculares y la polidispersividad aumenta ligeramente, por lo que la rotura de las cadenas debe tener lugar predominantemente de forma selectiva. Las cadenas de

mayor peso molecular están sometidas a mayor tensión, lo que facilita su rotura, además de presentar un mayor número de enlaces, lo que aumenta la probabilidad de la misma<sup>130</sup>. Hemos de poner de manifiesto que esta degradación del polímero comienza durante el proceso de esterilización y continúa durante el ensayo de cesión llevado a cabo en tampón fosfato. Este efecto no se había observado en los implantes no estériles<sup>100,102</sup>, aún cuando la gentamicina es una sustancia básica, que podría catalizar la hidrólisis del polímero, por lo que parece más adecuado suponer que la degradación que se produce en esta etapa es un proceso autocatalítico<sup>106</sup>.

Los valores de  $f_2$  de los perfiles de cesión de ambos antibióticos, obtenidos con los implantes irradiados y no irradiados, pone de manifiesto unas diferencias menores al 10%, lo que hace suponer que la bioequivalencia se podría asegurar. Sin embargo, teniendo en cuenta que en estudios previos<sup>102</sup> ya se había detectado *in vivo* una ligera disminución del peso molecular del PLA-200 de la cubierta, podría suponerse que los implantes de gentamicina una vez irradiados, presentarán una degradación mucho más acusada *in vivo*.

Por otro lado, como se muestra en la figura 11, en la primera semana se ha liberado aproximadamente el 65% de la carga de gentamicina y en tres semanas la totalidad de la dosis, lo que supone una cesión muy rápida. Si a esto añadimos que *in vivo*, como ya se ha puesto de manifiesto anteriormente por nuestro grupo de investigación<sup>102,45</sup> y por otros autores<sup>94</sup>, el proceso de cesión se acelera y la degradación del PLA-200 de la cubierta es más rápida, la formulación elaborada con un 10% resultaría inadecuada para mantener concentraciones terapéuticas durante el tiempo suficiente, en el hueso afectado de osteomielitis.

En este estudio no se abordó la modificación de la formulación para retrasar la cesión de gentamicina puesto que, de acuerdo con publicaciones anteriores<sup>100-102</sup>, la única vía para conseguir este propósito es el recubrimiento

de los implantes y como hemos visto, al aumentar la carga de un producto soluble como la gentamicina, el efecto de la cubierta no es suficiente. Otra posibilidad es la encapsulación del fármaco en microesferas de polímero previa a la compactación; esta estrategia fue probada por nuestro grupo de investigación, resultando una eficacia de encapsulación muy baja, no alcanzándose dosis de antibiótico suficientes para elaborar un sistema potencialmente eficaz.

En resumen, los implantes de gentamicina fueron descartados para el posterior estudio *in vivo* en animales infectados por varias razones: por un lado, la duración de la cesión del antibiótico no es lo suficientemente prolongada, y por otro, la degradación de la película de PLA-200, factor limitante de la cesión de gentamicina, presumiblemente será mucho más acusada *in vivo*. Resultados anteriores<sup>102</sup> han mostrado que, mientras *in vitro* la liberación de gentamicina desde este tipo de implantes con menor carga, podía prolongarse durante 15 semanas, *in vivo* la cesión del fármaco se completaba en 8 y los niveles en hueso por encima de las CMI, solo se mantenían durante 4 semanas, efecto que en el caso de implantes irradiados, se espera sea aún más acusado.

Con respecto a los implantes de ciprofloxacino, como muestran las figuras 14, 15 y 18 y la tabla 7, el sistema no es afectado por el proceso de esterilización, ya que tanto el antibiótico, como el polímero (PLA-30), no se modifican y las curvas de cesión del antibiótico son superponibles. Este sistema es suficientemente estable y predecible, como para esperar que la cinética de cesión *in vivo* de CFX desde los implantes irradiados, sea similar a la obtenida con estos mismos implantes no estériles<sup>45</sup> y resulte eficaz para tratar la infección ósea, objetivo de este trabajo.

## **ESTUDIOS IN VIVO**

Los ensayos *in vivo* se realizaron con implantes estériles de 500 mg con un contenido en ciprofloxacino de 50 mg.

### **1. Protocolo de muestreo**

Con el fin de estudiar la eficacia de los implantes de CFX, los experimentos se llevaron a cabo en conejos infectados con *S. aureus*. Se compararon los resultados obtenidos a partir de animales tratados con CFX con los de animales no tratados.

Los animales utilizados en los experimentos de esta memoria se dividieron en dos grupos:

Grupo I: grupo infectado no tratado, formado por 18 animales.

Grupo II: grupo infectado y tratado, formado por 28 animales.

Por otra parte, para determinar si la presencia del proceso infeccioso podría alterar la cesión de CFX desde estos implantes, se compararon los resultados obtenidos a partir de animales infectados y tratados con implantes de CFX con otros previamente publicados<sup>45</sup>, obtenidos a partir de animales no infectados y tratados con la misma formulación de CFX.

Los experimentos realizados en cada grupo de animales fueron:

**Grupo I.** Este grupo lo formaban 18 animales, 3 para cada tiempo y se destinó al estudio control. Para ello, se les infectó con *S. aureus*, inoculando a través de la zona intercondílea del fémur del animal, 100 µl de la suspensión bacteriana de una concentración determinada, procediendo para ello como

indica el protocolo de infección (apartado 3.2.1.), recogido en el capítulo de materiales y métodos.

Durante las dos semanas siguientes en las que la infección va evolucionando, se monitorizaron periódicamente los parámetros biológicos y signos clínicos de infección correspondientes.

A las 2 semanas de la inoculación, los conejos fueron intervenidos de nuevo para proceder a la limpieza y desbridamiento de tejidos infectados de la zona, siguiendo el protocolo de limpieza recogido en el apartado 3.2.2.1., de materiales y métodos. Seguidamente se les practicaba un orificio en la región intercondílea, tal y como se indica en el apartado 3.2.2.2., de materiales y métodos, pero sin insertarles el implante. Una vez finalizada la intervención, los animales permanecían monitorizados en sus jaulas hasta el momento del sacrificio.

Los conejos se sacrificaban después de 3 días, 1, 2, 3, 4 y 6 semanas con una dosis letal de pentobarbital sódico, previamente anestesiados con la mezcla de ketamina y xilacina. Para asegurar la muerte del animal, se procedía a la sección del diafragma. La extracción del fémur se realizó desarticulándolo de la rodilla y de la cadera, y extrayéndolo con la mínima cantidad posible de tejido muscular. Para proceder a la toma de muestras y tratamiento de las mismas, se siguieron los protocolos recogidos en los apartados 3.2.3. y 3.2.4., del capítulo de materiales y métodos.

**Grupo II.** Formado por 28 animales, cuatro para cada tiempo, destinados al estudio de la eficacia de los implantes de CFX.

Los animales fueron infectados y tratados de la misma forma que los del grupo I. Asimismo, al cabo de dos semanas de haber inoculado la suspensión de *S. aureus*, se les intervenía para proceder a la limpieza y desbridamiento del área femoral infectada.

Una vez realizada la limpieza de la zona, se insertaba el implante de CFX siguiendo para ello, el protocolo recogido en el apartado 3.2.2.2., del capítulo de materiales y métodos. Durante todo este periodo y hasta el momento de ser sacrificados, los animales fueron monitorizados periódicamente.

Los conejos fueron sacrificados después de 3 días, 1, 2, 3, 4, 6 y 12 semanas siguiendo el método descrito anteriormente, extrayendo el fémur, en el que previamente se le había colocado el implante. Posteriormente, se extraía el implante y el fémur se trataba igual que en el caso del grupo I, cortando transversalmente el fémur para separar la zona distal (FD) de la zona proximal (FP) e introduciéndolo en solución salina estéril.

Las muestras óseas de los animales infectados (grupos I y II) obtenidas a distintos tiempos, se utilizaron para el recuento de células viables de *S. aureus*, con la finalidad de evaluar la eficacia del tratamiento con los implantes de CFX.

Para valorar el CFX remanente en el implante, se procedía a su incubación en tampón citrato pH 4, a temperatura ambiente, durante 24 horas, en agitación y oscuridad. Posteriormente, se determinaba la concentración de CFX por el método microbiológico descrito en el apartado 3.4., del capítulo de materiales y métodos.

De los cuatro animales del grupo II asignados a cada tiempo, uno de ellos se seleccionaba al azar para su estudio radiológico e histológico. Las tres muestras restantes se emplearon para el recuento de células viables de *S. aureus* y para la valoración de CFX remanente en el implante.

La evolución radiológica se llevó a cabo con los animales vivos. Las imágenes radiológicas se tomaban al animal sano, antes de infectarlo, y después, periódicamente, incluyendo siempre la correspondiente al día antes de sacrificarlo.

Para el análisis histológico, se extraía el fémur con el implante en su interior y se conservaba en una disolución de formaldehído al 10% hasta la realización del análisis.

Para simplificar la nomenclatura en esta memoria, los animales se han designado de la siguiente manera: grupo-tiempo-replicado, de tal forma que el grupo puede ser C, grupo control o CFX, grupo tratado con el implante; el tiempo es el correspondiente a las semanas transcurridas tras la segunda intervención quirúrgica y los replicados pueden ser a, b, c y RxH, éste último designa al animal destinado al estudio radiológico e histológico.

Antes de proceder a la presentación de los resultados de ambos grupos de animales, hemos de puntualizar varios aspectos:

1. Desde el inicio, cada animal fue asignado a un experimento determinado, para lo cual se le identificaba tatuándolo en la oreja.
2. Después de inocular a los animales con *S. aureus*, cuatro murieron a los 2-3 días de la intervención, y en dos de ellos no se desarrolló la infección, por lo que hubo que añadir otros para sustituirlos y así cubrir todo el ensayo. Los datos que hasta el momento del exitus se habían recogido, no se han registrado en esta memoria.
3. Dos animales del grupo control, no superaron la segunda intervención en la que se iba a proceder a la limpieza de la zona infectada, por lo que también tuvieron que ser sustituidos. En este caso, si hemos registrado los datos recogidos durante el periodo previo y posterior a la inoculación hasta el momento del exitus. Así mismo, se procedió al recuento de células viables en fémur, datos que nos permitieron tener una idea aproximada de la concentración bacteriana que había a las dos semanas de infectados.
4. Un animal del grupo control asignado a 3 semanas, murió a los 11 días y otro de 4 semanas, curó espontáneamente.

5. De los animales del grupo control destinados a seis semanas, dos murieron a los 30 y 33 días por lo que, debido al estado del animal y por motivos éticos, fue sacrificado el tercero. Por ello, aunque se tuvieron en cuenta y se registraron los datos de estos animales, no disponemos de los correspondientes al término del ensayo.

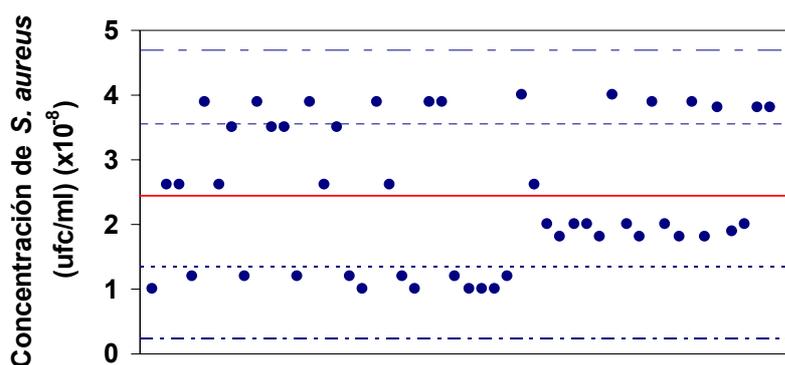
Hemos de indicar, que en algunos casos, tampoco disponemos de los valores correspondientes a todos los parámetros biológicos, debido a la imposibilidad de extraer sangre en unas ocasiones, y al estado del animal, en otras.

## **2. Inducción, valoración y control de la infección ósea**

Este apartado recoge los aspectos relacionados con la inoculación de *S. aureus* en el fémur de los conejos, así como la valoración y control de la infección durante las 2 semanas siguientes a la inoculación, a través de la monitorización de los parámetros biológicos y signos clínicos de infección en el animal. Para ello, previamente se determinaron los valores basales de distintos parámetros.

### **2.1. Inoculación de *S. aureus* en el fémur de conejos**

Para infectar el fémur, se inoculaban 100  $\mu$ l de una suspensión de *S. aureus*. Las concentraciones bacterianas obtenidas una vez realizado el recuento de células viables en la suspensión, se recogen en la figura 19. La concentración media de la suspensión bacteriana inoculada a los animales fue de  $2,45 \times 10^8 \pm 1,12 \times 10^8$  ufc/ml.



**Figura 19.-** Concentración de la suspensión de *S. aureus* inoculada en el fémur de cada uno de los animales. Valor medio (línea continua)  $\pm 1$  (trazo discontinuo corto) y 2 (trazo discontinuo largo) desviaciones típicas ( $n = 48$ ).

## 2.2. Parámetros biológicos y signos clínicos de infección

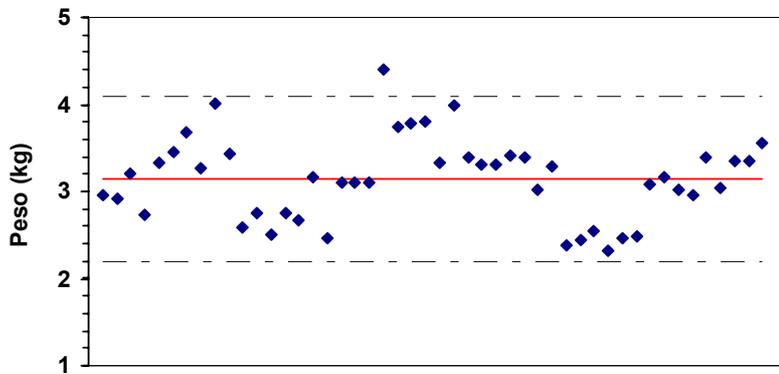
A lo largo del ensayo *in vivo* se monitorizaron varios parámetros del animal para su posible uso como indicadores del grado de infección alcanzado y posteriormente, de la eficacia del tratamiento. Previamente fueron determinados sus valores basales. Las observaciones clínicas sobre la articulación intervenida, se valoraban al hacer la artrotomía es decir, a las dos semanas de infectado y una vez sacrificado. Estos datos se recogen en los apéndices I y II.

### 2.2.1. Determinación de valores basales de los parámetros biológicos

#### a) Peso

El peso inicial del animal fue tomado momentos antes de ser anestesiado para inocularle la bacteria. El valor medio fue de  $3,15 \pm 0,472$  kg

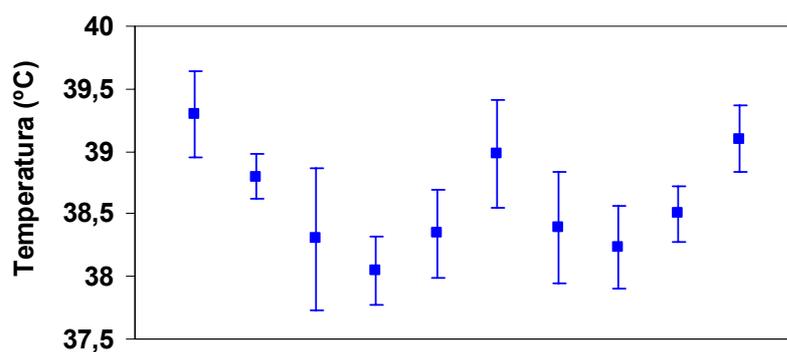
(n = 48). En la figura 20 se representa el peso inicial de cada animal y el intervalo de confianza.



**Figura 20.-** Carta control del peso inicial. Valor medio  $\pm$  2 desviaciones típicas (n = 48).

## b) Temperatura

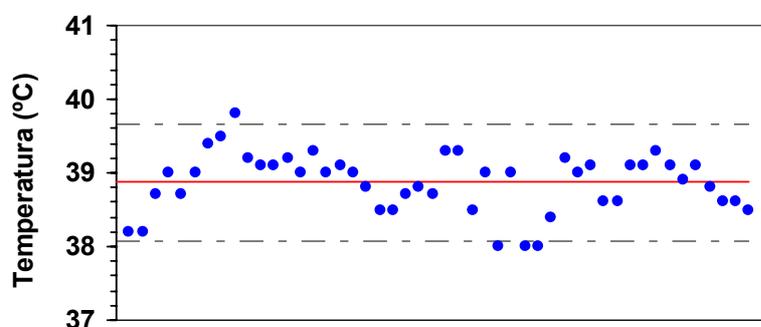
Con el fin de determinar la variabilidad intraindividual, la temperatura de 10 animales tomados al azar, fue medida diariamente durante una semana, hasta el día de la inoculación del fémur con *S. aureus*. Los valores medios obtenidos para cada animal muestreado se representan en la figura 21.



**Figura 21.-** Temperaturas basales medias semanales, y variación intraindividual de cada uno de los 10 conejos muestreados.

Tras realizar el correspondiente análisis de la varianza (ANOVA), las diferencias de temperatura entre animales fueron significativas ( $p < 0,001$ ), pero no, las observadas en un mismo animal ( $p = 0,67$ ). Por ello, como temperatura basal, se tomó la medida correspondiente al día de la primera intervención, representada en la figura 22, donde se recoge además, el valor medio y el intervalo de confianza (media  $\pm 2$  desviaciones típicas).

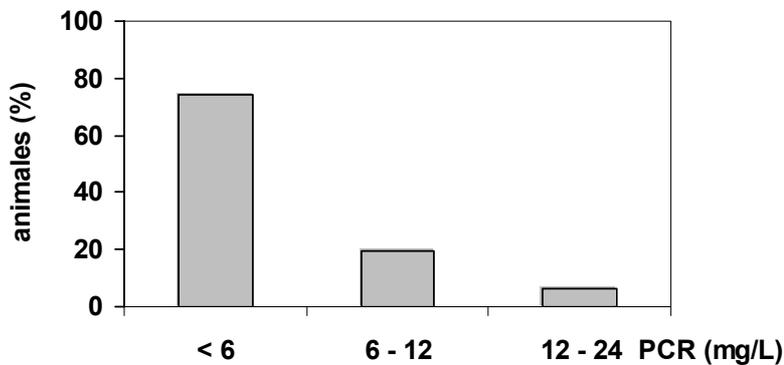
La temperatura media basal fue de  $38,9 \pm 0,402$  °C ( $n = 48$ ). Este dato concuerda con los recogidos por otros autores en la bibliografía<sup>131,132</sup>.



**Figura 22.-** Carta control de la temperatura basal. Valor medio  $\pm 2$  desviaciones típicas ( $n = 48$ ).

### c) Proteína C-Reactiva (PCR)

En la figura 23 se representan los valores de PCR basales. De los 46 animales a los que se les pudo extraer sangre y valorar la PCR basal, 34 (78%) presentaban concentraciones séricas normales, 9 (19,5%) presentaban valores comprendidos entre 6 y 12 mg/l y 3 (6,5%), entre 12 y 24 mg/l. Estos valores positivos de PCR pudieron ser provocados por algún proceso inflamatorio presente en el animal y no detectado durante la observación clínica.

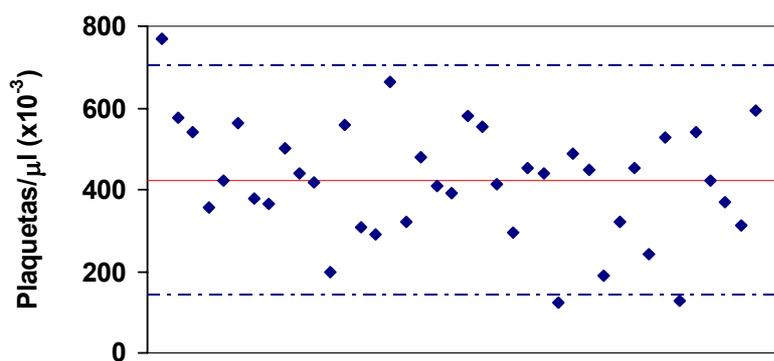


**Figura 23.-** Valores basales de Proteína C-Reactiva (PCR) en suero de los animales de experimentación (n = 46).

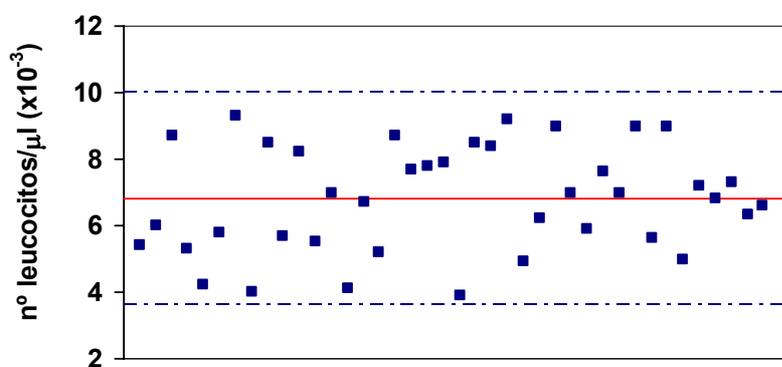
### d) Plaquetas y leucocitos

En el hemograma realizado antes de infectar al animal se determinó la serie roja, serie blanca y recuento de plaquetas.

En las figuras 24 y 25 se muestran los valores basales de plaquetas y leucocitos junto con sus intervalos de confianza. Los valores medios fueron  $421 \times 10^3 \pm 141 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu$ l y  $6,8 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu$ l (n = 40).



**Figura 24.-** Carta control del número de plaquetas/ $\mu$ l, basal. Valor medio (línea continua)  $\pm 2$  desviaciones típicas (líneas discontinuas),  $n = 40$ .



**Figura 25.-** Carta control del número de leucocitos/ $\mu$ l, basal. Valor medio (línea continua)  $\pm 2$  desviaciones típicas (líneas discontinuas),  $n = 40$ .

El recuento de hematíes, neutrófilos y linfocitos, así como el hematocrito y hemoglobina de cada animal se recogen en los apéndices I y II de esta memoria.

### **2.2.2. Monitorización de parámetros y signos clínicos de infección durante el periodo de pre-tratamiento**

Durante el periodo transcurrido entre la inoculación con *S. aureus* y la limpieza y desbridamiento del área afectada (dos semanas), se monitorizaron los parámetros elegidos como indicadores del grado de infección, cuyos valores se encuentran recogidos en las tablas 11 y 12.

El proceso infeccioso conlleva una pérdida del peso de  $12,2 \pm 6,11\%$ , calculada mediante la ecuación 5, durante las dos semanas en las que se desarrolla.

Por el contrario, la temperatura no parece verse afectada de forma importante. En la tabla 11, puede observarse que su valor permanece constante, con ligeras oscilaciones a lo largo del ensayo, excepto en algunos animales, en los que aumentó a las 24-48 horas siguientes a la inoculación (apéndices I y II).

Con respecto al recuento de leucocitos, en la tabla 11 se observa cómo en la primera semana se produce un aumento importante, debido al proceso infeccioso, pero luego su valor disminuye aunque no llega a normalizarse.

Las plaquetas sin embargo, aumentan a lo largo de las dos semanas, pasando de 421.000 inicialmente, a 1.132.000 al final del periodo. El aumento tan espectacular que se observa en todos los animales, puede permitirnos utilizar el recuento de plaquetas como parámetro indicativo o de referencia de la presencia o no de infección en el animal.

Parámetros	Tiempo (semanas)		
	0	1	2
Peso (kg)	3,15 ± 0,472 (n = 48)	2,85 ± 0,408 (n = 48)	2,75 ± 0,353 (n = 48)
Temperatura (°C)	38,9 ± 0,4 (n = 48)	39,1 ± 0,374 (n = 48)	38,9 ± 0,456 (n = 48)
Leucocitos/ $\mu\text{l}$ ( $\times 10^{-3}$ )	6,8 ± 1,6 (n = 40)	10,2 ± 3,87 (n = 43)	8,7 ± 2,61 (n = 44)
Plaquetas/ $\mu\text{l}$ ( $\times 10^{-3}$ )	421 ± 141 (n = 40)	1108 ± 201 (n = 43)	1132 ± 287 (n = 44)

**Tabla 11.-** Evolución temporal del peso, temperatura y número de leucocitos y plaquetas, en los animales durante el periodo previo al tratamiento, que abarca desde que son infectados (valores basales,  $t = 0$ ) hasta que son tratados ( $t = 2$  semanas). Valores medios  $\pm$  desviación estándar.

PCR (mg/l)	Tiempo (semanas)		
	0	1	2
	% de animales		
< 6	73,91		
6 -12	19,57		
12 - 24	6,52		4,55
24 – 48		2,38	13,64
48 – 96		2,38	9,09
96 – 192		21,43	15,91
$\geq 192$		73,81	56,82

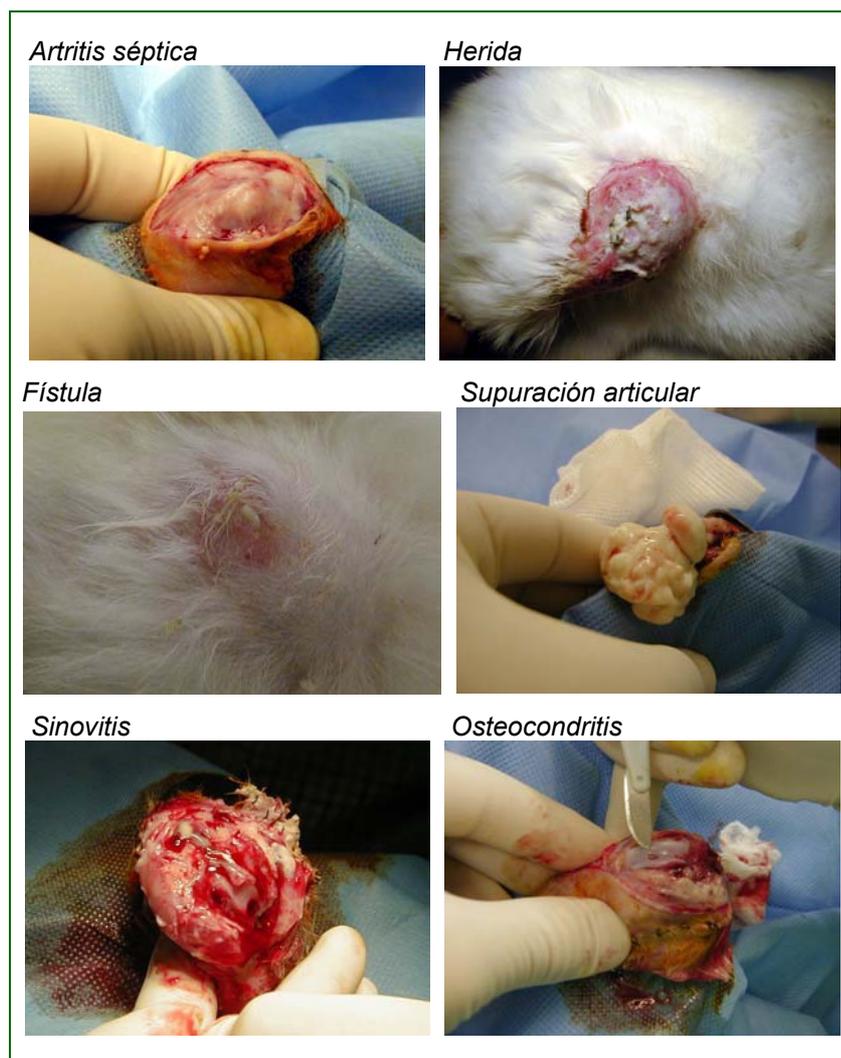
**Tabla 12.-** Porcentajes de animales con niveles de Proteína C-Reactiva (PCR) obtenidos durante el periodo previo al tratamiento, que abarca desde que son infectados (valores basales,  $t = 0$ ) hasta que son tratados ( $t = 2$  semanas). (Para  $t = 0$ ,  $n = 45$ ; para  $t = 1$  semana,  $n = 42$  y para  $t = 2$  semanas,  $n = 44$ ).

Como muestran los datos recogidos en la tabla 12, la PCR podría ser utilizada como indicador de la infección en los conejos. Inicialmente, un 74% de animales tiene valores menores de 6 mg/l, mientras que a la semana de ser infectados prácticamente el mismo porcentaje presenta niveles superiores a 192 mg/l y a las 2 semanas, un 16% de animales tiene niveles entre 96 y 192 mg/l y un 57%, niveles mayores de 192 mg/l.

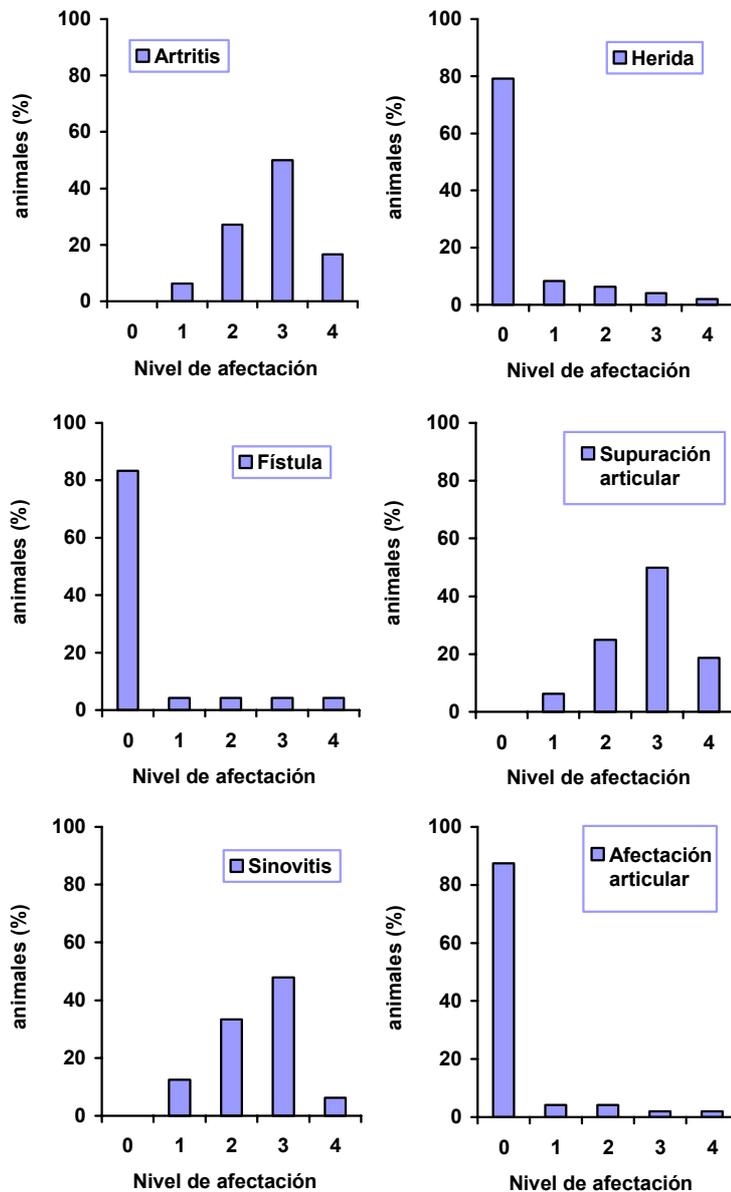
Al final de estas dos semanas de infección, se valoraron también los signos presentes en la articulación afectada, definidos en la tabla 13. En la figuras 26 y 27 se muestran las imágenes correspondientes a cada uno de estos signos y la valoración del estado de la articulación afectada, durante la segunda intervención quirúrgica.

<b>Observación</b>	<b>Definición</b>
Artritis	Inflamación articular
Herida	Aspecto según evolución: normal, cerrada, cicatrizada, abierta y necrosis de los bordes.
Fístula	Supuración exterior desde la articulación a través o no de la herida.
Supuración	Presencia, aspecto y cantidad de pus intraarticular; pseudocápsula; presencia de pus en intercóndilo y/o orificio de inoculación. Aspecto de la supuración: pastosa, granulosa; amarillenta/cremoso.
Sinovitis	Inflamación de la membrana sinovial y formación de pannus (tejido de granulación proveniente de la sinovial que recubre la superficie articular). Presencia de líquido sinovial.
Afectación articular	Lesiones degenerativas articulares: cartilaginosas (condrolisis), osteocondritis, artrosis. Rigidez articular, inmovilidad de la pata afectada e impotencia funcional.

**Tabla 13.-** Observaciones y signos clínicos monitorizados durante los experimentos.



**Figura 26.-** Imágenes de los signos de afectación de la zona intervenida, correspondientes a las dos semanas de la inoculación de *S. aureus* en el fémur del animal.



**Figura 27.-** Porcentaje de animales con distintos niveles de afectación de la zona intervenida, para cada uno de los signos o síntomas evaluados antes de iniciar el tratamiento (n = 48). El criterio seguido en la evaluación fue 0 = negativo o normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave.

El análisis de los signos clínicos observados al final de las dos primeras semanas de infección, pone de manifiesto el predominio de la artritis, supuración articular y sinovitis, sobre otros como el aspecto de la herida, la presencia de fístulas y la afectación articular (rigidez articular, lesiones degenerativas, inmovilidad de la pata).

Aproximadamente el 80% de los animales presentan una herida normal o leve, sin fístula y sin afectación articular relevante. Sin embargo, el 50% tiene artritis, sinovitis y supuración articular de grado 3, es decir, grave. El otro 50% de animales presenta distintos grados de afectación de estos tres signos, entre leve (grado 1), moderado (grado 2) y muy grave (grado 4). Clínicamente, la infección ósea inducida es relevante.

### **3. Tratamiento de la infección ósea**

Una vez confirmada la infección ósea por *S. aureus*, el tratamiento se llevó a cabo mediante la colocación *in situ* de implantes de CFX. No obstante, debe tenerse en cuenta que el desbridamiento del tejido infectado y la limpieza del área afectada, forman parte también del tratamiento. Por ello los animales de experimentación se diferenciaron en dos grupos, según fueran o no implantados.

#### **3.1. Cesión de ciprofloxacino *in vivo***

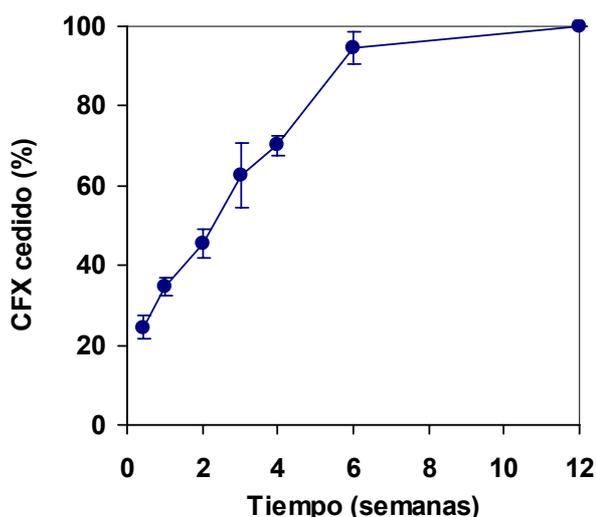
La valoración de CFX remanente en los implantes a lo largo del tiempo, se hizo siguiendo el método de difusión en agar, descrito en materiales y métodos. La incorporación experimental de CFX en los implantes fue del  $10,0 \pm 0,213$  %.

Los porcentajes de CFX remanentes en los implantes, una vez insertados en el fémur de conejos de animales infectados, se recogen en la tabla 14.

Tiempo (semanas)	Ciprofloxacino remanente (%)			Media
	I	II	III	
0,429	72,5	78,3	75,8	75,5 ± 2,91
1	63,2	65,4	67,7	65,4 ± 2,25
2	53,8	51,1	58,6	54,5 ± 3,8
3	46,5	34,4	31,1	37,3 ± 8,11
4	27,4	32,5	29,8	37,3 ± 8,11
6	2,19	3,77	10,2	5,39 ± 4,24
12	0,01	0,01	0,02	0,01 ± 0,005

**Tabla 14.-** Porcentajes remanentes de ciprofloxacino en los implantes insertados en fémur de conejos. Media ± desviación estándar (n = 3).

En la figura 28 se puede apreciar que prácticamente, la totalidad de la dosis de CFX se ha cedido desde estos implantes en las primeras 6 semanas. No obstante, el ensayo se prolongó durante 6 semanas más, para comprobar si se producía reinfección del fémur.

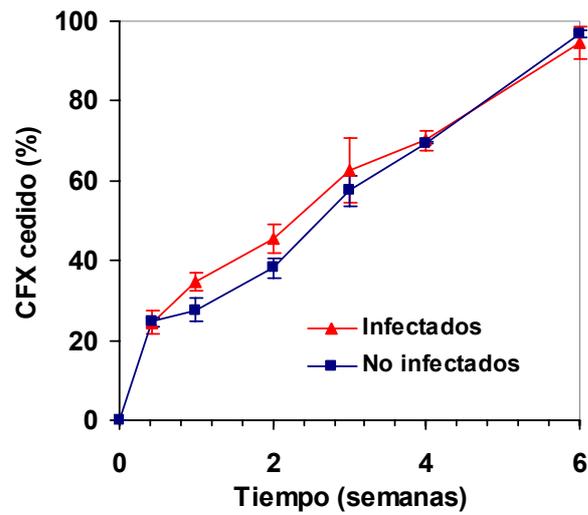


**Figura 28.-** Porcentaje de ciprofloxacino (CFX) cedido desde los implantes, tras su inserción en el fémur de conejos (media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ).

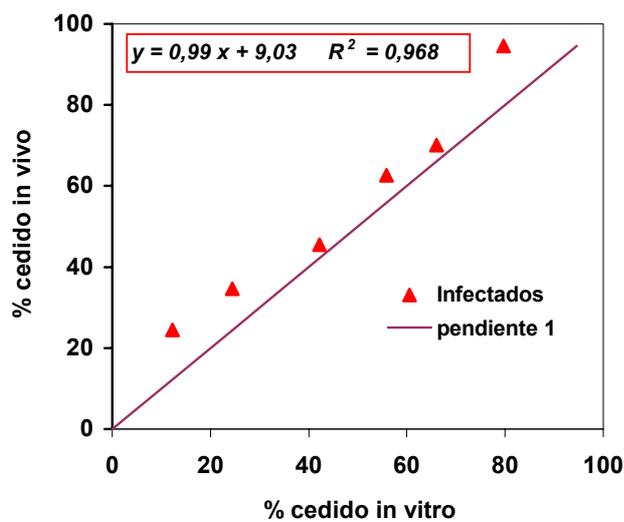
Estos resultados están totalmente de acuerdo con los obtenidos previamente por Castro et al.<sup>45</sup>, a partir de animales no infectados y tratados con la misma formulación (figura 29). Como puede observarse en la figura 29, la presencia de la infección no altera la liberación de CFX desde estos implantes.

En la figura 30 se muestra la correlación obtenida *in vivo* - *in vitro*. Los datos corresponden a la cesión de CFX desde implantes estériles y a partir de animales infectados. La pendiente obtenida por regresión lineal es prácticamente igual a la unidad.

Una vez más se confirma que la cesión de CFX desde estos implantes es más rápida *in vivo* que *in vitro*, ya que mientras que *in vitro* se libera aproximadamente un 80% a las 6 semanas, *in vivo* se cede casi el 100%.



**Figura 29.-** Cesión de ciprofloxacino (CFX) tras la inserción del implante en el fémur de conejos infectados (Grupo II) y no infectados. (Media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ).



**Figura 30.-** Correlación in vivo – in vitro, establecida entre el porcentaje de ciprofloxacino (CFX) cedido desde los implantes, tras su inserción en el fémur de conejos infectados (Grupo II) y el porcentaje cedido in vitro.

### 3.2. Valoración de la eficacia del tratamiento

Se llevó a cabo mediante el recuento de unidades viables de *S. aureus* en las muestras óseas, monitorización de los parámetros y signos clínicos y evolución radiológica e histológica del hueso infectado.

#### 3.2.1. Evolución de la infección de *Staphylococcus aureus* en fémur

El análisis cualitativo de las muestras de pus tomadas con hisopo y jeringa confirmó siempre la presencia de *S. aureus*, indicando por tanto, que la infección era producida por esta bacteria. Además, se observó la presencia de macrófagos y un crecimiento bacteriano máximo en la zona infectada ( $10^8$  ufc/ml).

En la figura 31 se muestra la evolución temporal de la concentración de *S. aureus* tras la inoculación del fémur de los conejos. A las 2 semanas, el valor medio fue de  $4 \times 10^8$  y  $1,13 \times 10^8$  ufc/ml para fémur distal y proximal, respectivamente. Como puede observarse en la figura, al cabo de 3 días de realizarse la limpieza y desbridamiento del área afectada, se produjo una caída de la concentración de *S. aureus* en el fémur, a  $10^4$  ufc/ml es decir, una reducción de 4 logaritmo, tanto en los conejos del grupo control, como en los tratados con el implante de CFX. Este hecho indica que la técnica de limpieza por sí sola contribuye a la disminución del número de células viables en el hueso.

A partir de los tres días de la limpieza de la zona afectada, la evolución en los dos grupos de animales fue totalmente diferente. En el grupo I (grupo control) la concentración de *S. aureus* aumentó, llegando a alcanzar a las 4 semanas de la limpieza, un nivel de  $10^7$  ufc/ml en el área distal del fémur y  $10^6$  ufc/ml en la zona proximal, hecho que parece lógico, ya que en la zona

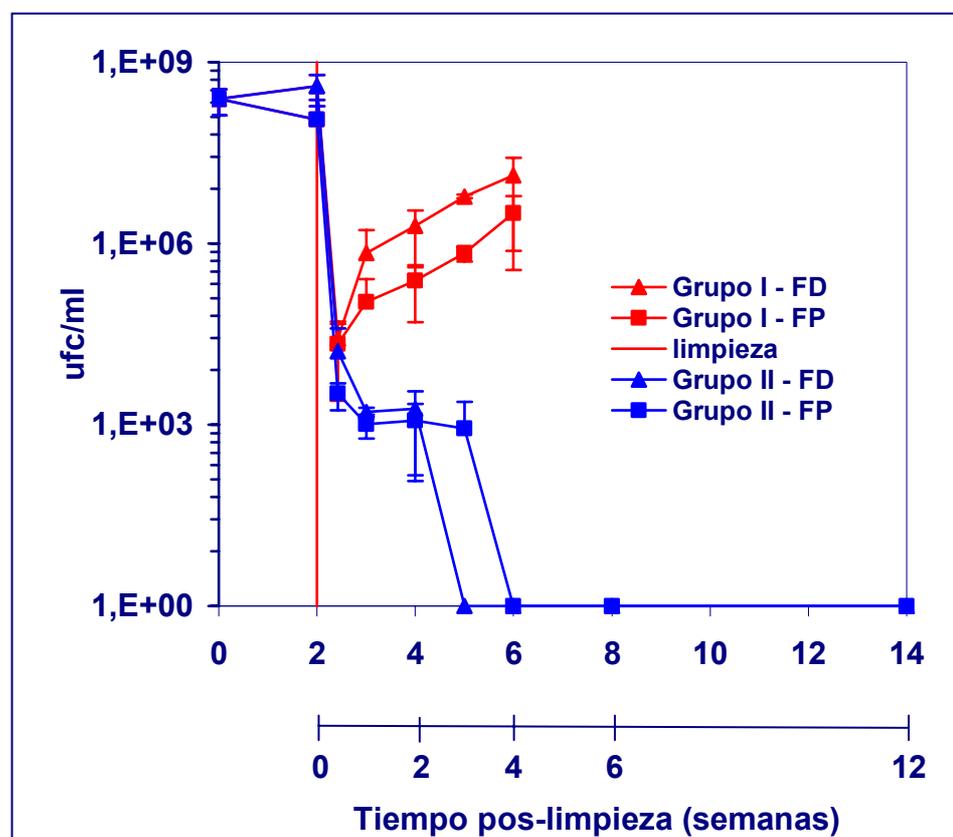
distal se realiza la inoculación y por tanto, es la zona donde se inicia el foco de infección.

Por el contrario, en el grupo tratado con los implantes de CFX (grupo II), los niveles de *S. aureus* disminuyeron progresivamente a partir de los tres días de la limpieza, para alcanzar una concentración de  $10^3$  ufc/ml al cabo de 3 semanas pos-limpieza en fémur proximal, mientras que en dicho tiempo, se produjo la eliminación de la infección en el fémur distal, siendo necesaria una semana más para la eliminación de la infección en el área proximal del fémur.

Debe recordarse, que el implante se encuentra localizado en la diáfisis distal, por lo que en esta zona se alcanzan los niveles de CFX más elevados, de aproximadamente 1180  $\mu\text{g/g}$  de tejido, a las tres semanas, mientras que en la mitad proximal, las concentraciones no son tan elevadas, aunque siempre son superiores a la CMI para *S. aureus*. Teniendo en cuenta estos datos, que han sido valorados previamente por Castro et al.<sup>45</sup>, y que la cinética de cesión de CFX *in vivo* es igual en animales infectados y no infectados (figura 29), cabe esperar que en los primeros, también se alcancen niveles óseos de CFX similares.

Los resultados del análisis estadístico de las comparaciones de los recuentos de colonias de *S. aureus*, en ufc/ml, del grupo II frente al grupo control (grupo I) a los 3 días, 1, 2, 3 y 4 semanas, estratificando por la variable "fémur", indican que a los 3 días, no existen diferencias significativas ( $p = 0,30$ ) en el número de colonias entre ambos grupos. Sin embargo, las medianas del recuento de colonias de *S. aureus* en el grupo tratado con el implante, frente al grupo control, fueron inferiores a la primera ( $p = 0,007$ ), segunda ( $p = 0,002$ ), tercera ( $p = 0,01$ ) y cuarta semana ( $p = 0,002$ ). Por lo tanto, a partir de la primera semana de iniciar el tratamiento, existen diferencias significativas entre ambos grupos, lo que nos permite concluir que

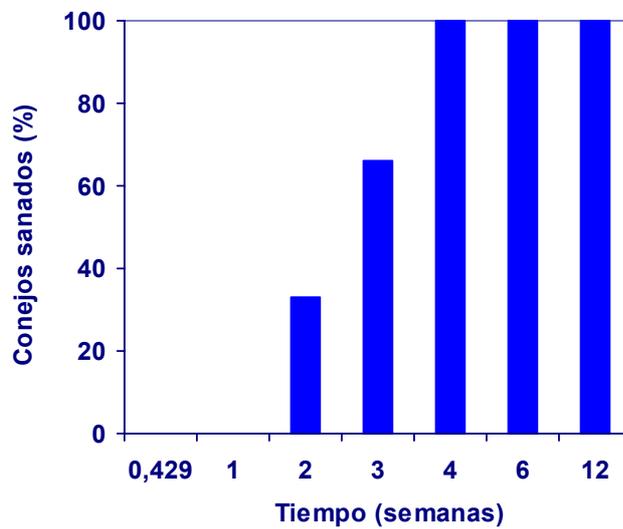
la colocación *in situ* del implante de CFX resultó eficaz como tratamiento de la infección ósea.



**Figura 31.-** Evolución temporal de la concentración de *S. aureus* en la zona distal (FD) y proximal (FP) del fémur de los animales infectados del grupo I (no tratados) y II (tratados con implante de ciprofloxacino). Valores medios  $\pm$  desviación estándar.

Un aspecto importante a resaltar, es que no se produjo reinfección del fémur, tal como se extrae de los datos correspondientes a las 12 semanas del comienzo del tratamiento con los implantes (figura 31), teniendo en cuenta que desde las 6 semanas se ha cedido prácticamente toda la dosis de CFX.

En la figura 32 se muestran los porcentajes de curación, que fueron de un 33% y 66%, a las 2 y 3 semanas de la implantación, respectivamente, y del 100% en 4 semanas.



**Figura 32.-** Porcentaje de animales infectados que sanaron a lo largo del tiempo transcurrido después de haberles insertado el implante de ciprofloxacino (grupo II).

### 3.2.2. Monitorización de parámetros y signos clínicos durante el periodo postratamiento

A la vista de los resultados obtenidos durante el periodo pretratamiento, los parámetros que pueden ser útiles como indicadores de la evolución de la infección son: peso, leucocitos, plaquetas y PCR, además de los signos clínicos de afectación. La temperatura, utilizada por algunos autores para el seguimiento de la infección<sup>87,94</sup>, fue descartada porque resultó ser un parámetro no discriminador, hecho que coincide con otros resultados publicados<sup>87</sup>.

### a) Peso

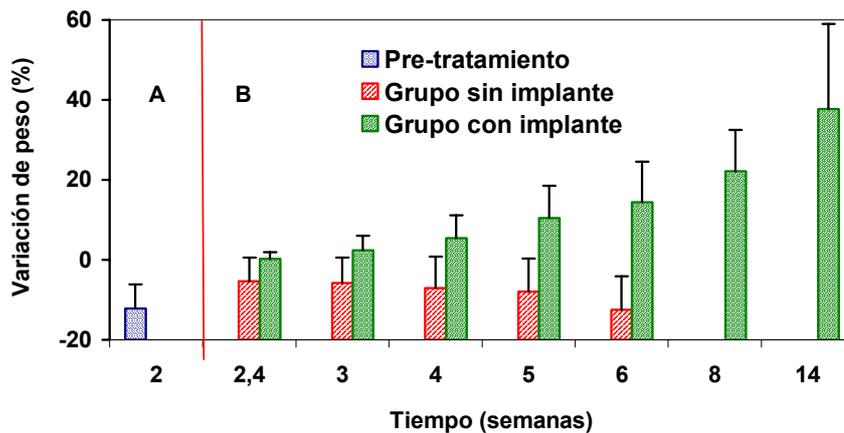
Es uno de los parámetros que más acusadamente se ha visto afectado durante todo el ensayo.

En la tabla 15 se recoge el peso medio de los animales a lo largo del periodo pre y pos-limpieza y desbridamiento, tanto para el grupo control, como para el tratado.

Como se ha visto anteriormente, el proceso infeccioso provoca una importante pérdida de peso durante las dos primeras semanas de infección (12,2%), que continúa en aquellos animales del grupo control. Por el contrario, en el grupo tratado con implantes de CFX, se produce un aumento normal del peso. En la figura 33 se pone de manifiesto la recuperación ponderal en estos animales, así como la pérdida o ganancia de peso que tiene lugar en cada grupo, a lo largo del ensayo.

T (semanas)		Peso (kg)	
Tiempo desde inicio	Tiempo desde limpieza	Grupo I	Grupo II
2	0	2,75 ± 0,353 (n = 48)	
2,249	0,249	2,62 ± 0,263 (n = 18)	2,8 ± 0,387 (n = 28)
3	1	2,57 ± 0,274 (n = 15)	2,86 ± 0,326 (n = 24)
4	2	2,56 ± 0,199 (n = 11)	2,96 ± 0,29 (n = 20)
5	3	2,46 ± 0,199 (n = 8)	3,09 ± 0,358 (n = 16)
6	4	2,31 ± 0,279 (n = 6)	3,21 ± 0,426 (n = 12)
8	6		3,45 ± 0,485 (n = 8)
14	12		3,89 ± 0,856 (n = 4)

**Tabla 15.-** Evolución del peso de los animales desde la colocación (grupo II) o no (grupo I) del implante de ciprofloxacino. Valores medios ± desviación estándar.



**Figura 33.-** Variación del peso de los animales infectados antes (pre-tratamiento, periodo A) y después (periodo B) de limpiar la zona afectada y colocar o no el implante de ciprofloxacino.

### b) Proteína C-Reactiva

En las tablas 16 y 17 se recogen los porcentajes de animales que tienen distintos valores de PCR, a lo largo del periodo de pos-tratamiento, que abarca desde que son intervenidos para limpiar y desbridar el área afectada, hasta el final del ensayo, y en la figura 34 se muestra la proporción de animales que tienen distintos niveles de PCR al inicio y a las 4 semanas del periodo pos-tratamiento. El 80% de animales del grupo no tratado, presenta niveles de PCR mayores de 192 mg/l a las 4 semanas y el resto, niveles entre 96 y 192 mg/l. Estos valores son incluso mayores que los que presentaban al final de las dos semanas del periodo de inducción de la infección, indicando que a medida que la infección progresa, los niveles de PCR aumentan. Por el contrario, en el grupo II, casi un 60% tiene valores de PCR menores de 6

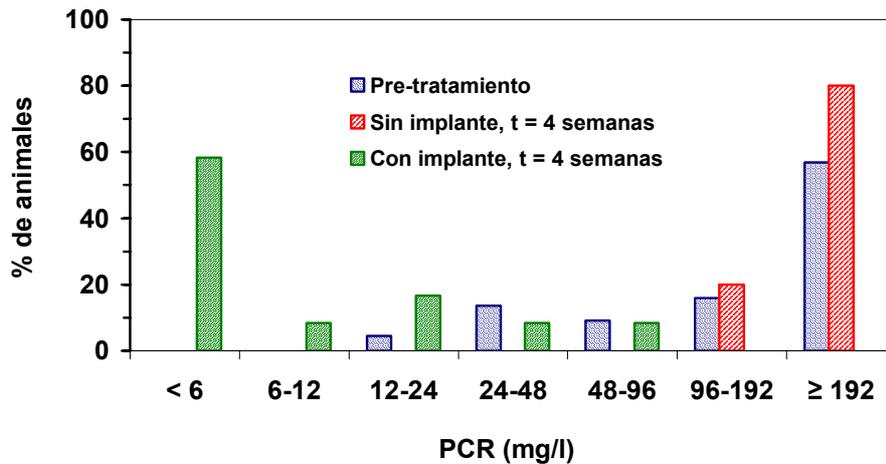
mg/l, considerados negativos, un 17% entre 12 y 24 mg/l y otro 17% tiene valores entre 24 y 96 mg/l.

Tiempo (semanas)		PCR (mg/l)						
		< 6	6-12	12-24	24-48	48-96	96-192	≥ 192
Desde inicio	Desde limpieza	% de animales						
2	0			4,55	13,64	9,09	15,91	56,82
3	1						10	90
4	2						22,2	77,8
5	3					33,3	16,7	50
6	4						20	80

**Tabla 16.-** Niveles de Proteína C-Reactiva (PCR) obtenidos en el suero de los animales del grupo I, durante el periodo pos-tratamiento.

Tiempo (semanas)		PCR (mg/l)						
		< 6	6-12	12-24	24-48	48-96	96-192	≥ 192
Desde inicio	Desde limpieza	% de animales						
2	0			4,55	13,64	9,09	15,91	56,82
3	1		5	20		35	25	15
4	2	5,88	41,2		29,4	5,88	17,65	
5	3	46,67	20	13,33		20		
6	4	58,33	8,33	16,67	8,33	8,33		
8	6	75		25				
14	12	100						

**Tabla 17.-** Niveles de Proteína C-Reactiva (PCR) obtenidos en el suero de los animales del grupo II, durante el periodo pos-tratamiento.



**Figura 34.-** Niveles de PCR (Proteína C-Reactiva) en los animales infectados antes de limpiar la zona afectada (pre-tratamiento) y a las 4 semanas de colocar (grupo II) o no (grupo I) el implante de ciprofloxacino.

Estos resultados revelan que, después de dos semanas de infectados, más de la mitad de los animales (56,8%) tienen niveles muy elevados de PCR y que si no son tratados, el porcentaje de animales con estos mismos niveles, aumenta al 80% a las 4 semanas. Por el contrario, en el grupo tratado con el implante, los niveles de PCR disminuyen, llegando a normalizarse a las 4 semanas en un 60% de animales y en un 100%, al final del ensayo (12 semanas), por lo que los niveles de PCR son útiles para el seguimiento del proceso inflamatorio-infeccioso desarrollado en los animales.

### c) Leucocitos y plaquetas

Como puede observarse en la tabla 18, con respecto al valor medio inicial, en el grupo I se produjo un aumento de leucocitos a lo largo de las 4 semanas del ensayo, paralelo al recuento de unidades viables de *S. aureus*.

Sin embargo, en el grupo II su número disminuye progresivamente hasta valores normales, de aproximadamente 6.800 leucocitos/ $\mu\text{l}$ . Como cabía esperar, la infección provocó una leucocitosis importante en el animal.

Con respecto a las plaquetas (tabla 19), aunque se observan ligeras oscilaciones, su valor se mantiene muy elevado hasta el final del ensayo, en el grupo I, mientras que en el grupo II van disminuyendo hasta alcanzar valores normales (421.000 plaquetas/ $\mu\text{l}$ ).

T (semanas)		Leucocitos/ $\mu\text{l}$ ( $\times 10^{-3}$ )	
Tiempo desde inicio	Tiempo desde limpieza	Grupo I	Grupo II
2	0	8,7 $\pm$ 2,605 (n = 44)	
3	1	13,1 $\pm$ 8,12 (n = 12)	8,36 $\pm$ 1,97 (n = 19)
4	2	14,6 $\pm$ 9,87 (n = 10)	8,03 $\pm$ 1,74 (n = 17)
5	3	12,8 $\pm$ 9,54 (n = 7)	7,52 $\pm$ 1,27 (n = 13)
6	4	12,5 $\pm$ 7,53 (n = 6)	7,33 $\pm$ 1,11 (n = 12)
8	6		7,09 $\pm$ 0,844 (n = 8)
14	12		6,9 $\pm$ 0,316 (n = 4)

**Tabla 18.-** Evolución del recuento de leucocitos en los animales implantados (grupo II) y no implantados (grupo I). Valores medios  $\pm$  desviación estándar.

T (semanas)		Plaquetas/ $\mu\text{l}$ ( $\times 10^{-3}$ )	
Tiempo desde inicio	Tiempo desde limpieza	Grupo I	Grupo II
2	0	1132 $\pm$ 287 (n = 44)	
3	1	1196 $\pm$ 301 (n = 12)	840 $\pm$ 214 (n = 20)
4	2	1277 $\pm$ 208 (n = 10)	682 $\pm$ 228 (n = 18)
5	3	1034 $\pm$ 278 (n = 7)	645 $\pm$ 125 (n = 14)
6	4	1366 $\pm$ 130 (n = 6)	572 $\pm$ 136 (n = 12)
8	6		492 $\pm$ 91 (n = 8)
14	12		318 $\pm$ 69 (n = 4)

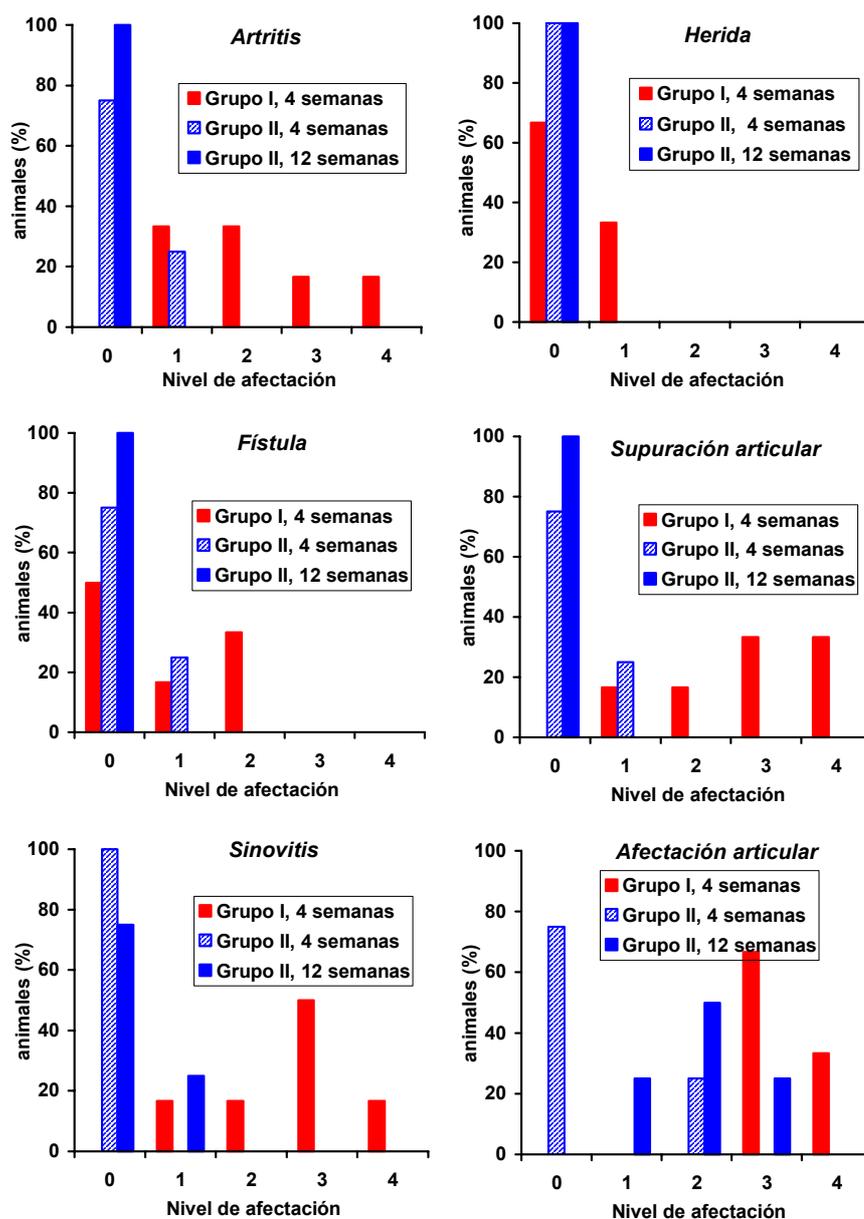
**Tabla 19.-** Evolución del recuento de plaquetas en los animales implantados (grupo II) y no implantados (grupo I). Valores medios  $\pm$  desviación estándar.

Los hallazgos confirman que, al igual que ocurre en humanos, los niveles de PCR, y el recuento de plaquetas y leucocitos, son parámetros de gran utilidad en el diagnóstico del proceso infeccioso, y en la valoración de la eficacia del tratamiento.

#### d) Observaciones clínicas de la articulación afectada

En los histogramas de la figura 35 se muestran los porcentajes de animales con distinto grado de afectación para cada uno de los signos evaluados, según el criterio utilizado, a las 4 semanas del periodo pos-tratamiento, para ambos grupos y a las 12 semanas del inicio del tratamiento para el grupo II.

Con respecto a la artritis, mientras que los animales del grupo I presentan distinto grado de afectación, en el 75% del grupo II no se observa



**Figura 35.-** Porcentaje de animales con distinto grado de afectación de la zona intervenida, para cada uno de los signos evaluados a las 4 semanas de limpiar la zona afectada (grupo I) e insertar el implante de ciprofloxacino (grupo II), así como a las 12 semanas de iniciar el tratamiento en el grupo II.

este signo, un 25% tiene inflamación articular de grado 1, y ningún animal mostró signos de artritis al final del ensayo. En la figura 36 se muestran imágenes de la articulación con y sin artritis.



**Figura 36.-** Articulación con artritis leve de un animal del grupo II (izquierda) y con artritis muy grave en un animal del grupo I (derecha), correspondientes a las 4 semanas postratamiento.

La evolución de la herida quirúrgica en el grupo II, fue favorable, presentando un aspecto normal, totalmente cicatrizada y cubierta completamente por el pelo del animal, a partir de la 4ª semana. Sin embargo un 33% de animales del grupo I, tenía la herida abierta y con necrosis de los bordes. Ambas situaciones pueden observarse en la figura 37.



**Figura 37.-** Herida quirúrgica normal en un animal implantado (izquierda) y muy grave en uno del grupo control (derecha).

La presencia de fístulas a las 4 semanas se observó en un 50% de animales del grupo I y en un 25% del grupo II (figura 35). En todos ellos hubo supuración exterior desde la articulación, aunque no siempre a través de la herida. No obstante, a las 12 semanas no se observó fístula en ninguno de los animales del grupo II (figura 38).



**Figura 38.-** Ausencia de fístula en un animal implantado (izquierda) y presencia de una fístula y supuración, muy grave, en un animal del grupo control (derecha).

La supuración articular fue uno de los signos más relevantes de la infección en los animales. La presencia de pus intraarticular, en la zona intercóndilo y/o en el orificio de inoculación, formando o no pseudocápsulas, fue evidente en los animales del grupo I. El aspecto de la supuración fue variable, en unos casos era un pus pastoso y en otros, granuloso, de color amarillento/cremoso y normalmente, abundante. Solo un 25% de los animales del grupo II presentaron supuración de grado I a las 4 semanas, remitiendo a las 12. En la figura 39 se muestran imágenes correspondientes a los dos grupos, a las 4 semanas de la limpieza y desbridamiento del área afectada.



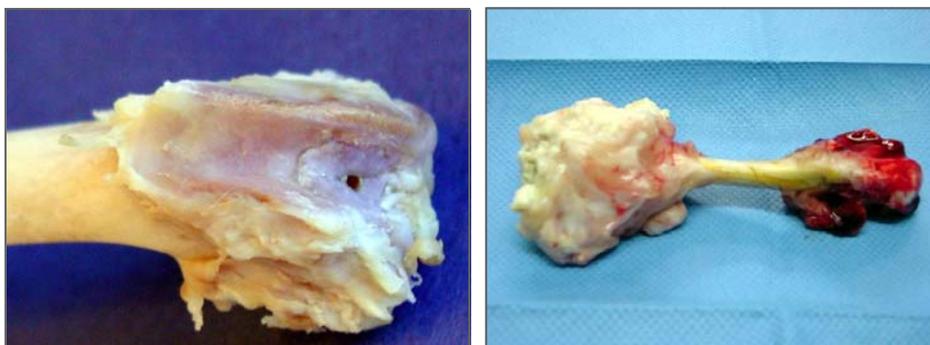
**Figura 39.-** Aspecto de una herida sin supuración correspondiente a un animal del grupo tratado (izquierda) y supuración moderada en la articulación de un animal del grupo control (derecha).

La inflamación de la membrana sinovial y formación de pannus, con presencia de líquido sinovial, fue otro de los signos característicos de la afectación articular durante el proceso infeccioso. Una sinovitis grave, de grado 3, se observó en un 50% de animales del grupo I. El resto presentaba distintos grados de afectación. En el grupo II, no se observó inflamación de la membrana sinovial ni líquido sinovial a las 4 semanas, en ninguno de los animales y tampoco en 3 de los cuatro animales de 12 semanas; solo en uno de ellos se apreció sinovitis leve al final del ensayo (figura 40).



**Figura 40.-** Sinovitis leve en la articulación de un animal tratado (izquierda) y muy grave en un animal control (derecha).

La afectación articular fue valorada mediante la presencia de lesiones degenerativas articulares como condrolisis, osteocondritis o artrosis y por la existencia de rigidez articular, inmovilidad de la pata afectada e impotencia funcional. A las 4 semanas, un 75% de animales del grupo I presentó una afectación articular grave y el resto, muy grave. A este tiempo, solo un 25% del grupo II mostraba una afectación moderada, mientras que el 75% restante no presentaba signos de lesiones o rigidez articular (figura 35). Sin embargo, al final del ensayo, los 4 animales del grupo II tenían afectada la articulación, la mitad de ellos en grado moderado. En la figura 41 se muestran imágenes del fémur con distinto grado de afectación articular.



**Figura 41.-** Artrosis en la articulación de un animal implantado (izquierda) y afectación articular muy grave en un animal control (derecha).

La aparición de signos degenerativos articulares a las 12 semanas parece un proceso crónico o de carácter evolutivo y se puede interpretar desde las siguientes posibilidades: el daño articular por la condrolisis ocasionada por la propia infección, el daño articular durante la implantación por el fresado (orificio de 6 mm en el intercóndilo femoral) y, por último, el daño que pueda producir el antibiótico en el cartílago, como ya se comenta en

la introducción. Sin embargo, nos inclinamos por la primera de las causas, es decir, consecuencia de la infección, ya que en estudios previos realizados en conejos no infectados y monitorizados a lo largo de 6 meses, no se apreció ningún caso de afectación articular<sup>45</sup>.

De todo lo expuesto anteriormente, podemos concluir que el proceso infeccioso es la causa de la aparición y evolución de muchos de estos signos y que posiblemente, la técnica quirúrgica también contribuye a ello, sobre todo en la afectación articular.

Los resultados del análisis estadístico de las comparaciones de las proporciones de los signos o síntomas del grupo tratado (grupo II) frente al grupo control (grupo I) a las 4 semanas, indican que las proporciones de artritis ( $p = 0,006$ ), supuración articular ( $p < 0,001$ ), sinovitis ( $p = 0,008$ ) y afectación articular ( $p = 0,002$ ) fueron inferiores en el grupo tratado con el implante, frente al grupo control. Las diferencias significativas encontradas entre ambos grupos nos permiten afirmar una vez más, que el tratamiento con los implantes de CFX es eficaz en infecciones óseas inducidas por *S. aureus*.

### **3.2.3. Evolución radiológica del fémur infectado**

Como hemos indicado anteriormente, para valorar la eficacia del tratamiento con implantes de CFX, hemos realizado el estudio radiológico del fémur de cada uno de los animales tratados a lo largo de todo el ensayo.

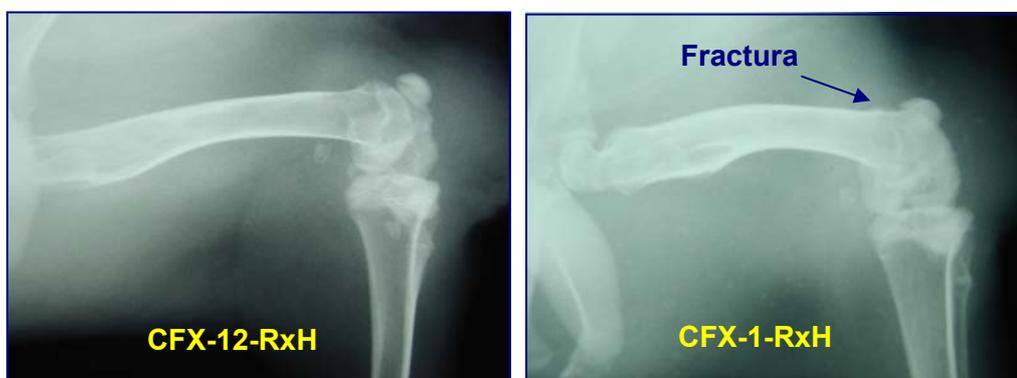
Para mostrar la evolución radiológica y evitar imágenes reiterativas, hemos seleccionado las correspondientes al conejo de 12 semanas (CFX-12-RxH). No obstante, también se presentan aquellas en las que se observan diferencias o aspectos que no aparecen en las de este animal.

Antes de comenzar el ensayo, se tomaron imágenes radiológicas de cada uno de los animales, una de las cuales se muestra en la figura 42.



**Figura 42.-** Imagen radiológica obtenida antes de la inoculación de *S. aureus* en el fémur del conejo CFX-12-RxH.

A las dos semanas pos-inoculación, en ninguna de las imágenes de los animales se observan signos radiológicos de osteomielitis, pero si se aprecia un aumento considerable de partes blandas, debido a la infección. En el fémur del conejo CFX-1-RxH se aprecia una pequeña fractura diafisometafisaria distal (figura 43), debida al debilitamiento óseo provocado por la infección.



**Figura 43.-** Imágenes radiológicas obtenidas a las dos semanas pos-inoculación.

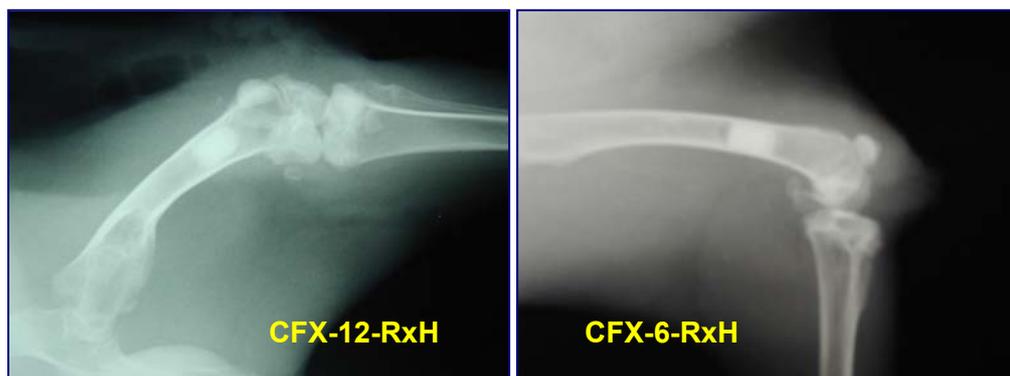
A continuación, describimos la evolución radiológica temporal tras la colocación del implante.

Inicialmente, a los 3 días de la colocación del implante, en la imagen del animal CFX-0,4-RxH (figura 44) se observa un proceso de osteolisis central simétrica, sin esclerosis marginal, en el tercio distal del fémur, que engloba la estructura cilíndrica hiperdensa, que corresponde al implante. La osteolisis es debida probablemente, al efecto mecánico de la fresa durante el acto operatorio.



**Figura 44.-** Imágenes radiológicas obtenidas a los tres días de la colocación del implante.

En las imágenes radiológicas de los animales CFX-1-RxH, CFX-3-RxH, CFX-4-RxH, CFX-6-RxH y CFX-12-RxH correspondientes a una semana, sigue viéndose el implante bien delimitado, aunque ya no podemos apreciar claramente dónde acaba éste y dónde empieza la cortical, como puede verse en la imagen del conejo CFX-6-RxH de la figura 45 y en la del conejo CFX-2-RxH. En todas las imágenes se advierte la presencia de osteolisis periimplante, pero mucho menos acusada que en las de tres días, como puede observarse en el fémur del conejo CFX-6-RxH (figura 45).



**Figura 45.-** Imágenes radiológicas obtenidas tras la primera semana de la colocación del implante.

En la figura 46, correspondiente a las dos semanas de la implantación, se observa en la zona del implante, un engrosamiento de la cortical del fémur de los animales CFX-2-RxH, CFX-3-RxH, CFX-4-RxH, CFX-6-RxH y CFX-12-RxH. Se aprecia disminución del área de osteolisis en el fémur del conejo CFX-3-RxH, y al igual que en el fémur del conejo CFX-2-RxH, se sigue observando que los límites del implante son poco precisos.



**Figura 46.-** Imágenes radiológicas obtenidas a las dos semanas de la colocación del implante.

A la tres semanas, en las imágenes radiológicas correspondientes a los animales CFX-3-RxH, CFX-4-RxH, CFX-6-RxH y CFX-12-RxH (figura 47), lo más llamativo que se observa es un ensanchamiento del diámetro de la zona del hueso donde se encuentra el implante (CFX-12-RxH). Así mismo, se aprecia también una clara disminución de la zona radiolúcida (CFX-3-RxH).



**Figura 47.-** Imágenes radiológicas obtenidas a las tres semanas de la colocación del implante.

En las imágenes correspondientes a las cuatro semanas es cuando se hacen más claros los cambios radiológicos respecto a la primera semana.

En las radiografías de los animales CFX-4-RxH, CFX-6-RxH y CFX-12-RxH se observa ensanchamiento del diámetro óseo con engrosamiento cortical. El área de osteolisis es prácticamente inexistente (figura 48).



**Figura 48.-** Imagen radiológica obtenida a las cuatro semanas de implantación.

En las imágenes radiológicas obtenidas a la quinta y sexta semana (figura 49), no hemos observado cambios significativos en el fémur de los animales CFX-6-RxH y CFX-12-RxH, con respecto a la cuarta semana.



**Figura 49.-** Imágenes radiológicas obtenidas a la 5ª y 6ª semana de implantación.

A las nueve semanas, en la imagen radiológica del conejo CFX-12-RxH, se aprecia el área de lisis totalmente remodelada, con presencia de hueso radiológicamente maduro, especialmente en la zona proximal al implante (figura 50).



**Figura 50.-** Imagen radiológica obtenida a las nueve semanas de implantación.

Por último, a las 12 semanas de la implantación, podemos observar en la imagen del fémur del conejo CFX-12-RxH, como el implante ha perdido ya sus límites, dando la impresión de que aumenta longitudinalmente al aparecer hueso radiológicamente maduro, tanto proximal como distal al implante (figura 51).



**Figura 51.-** Imagen radiológica obtenida a las doce semanas de implantación.

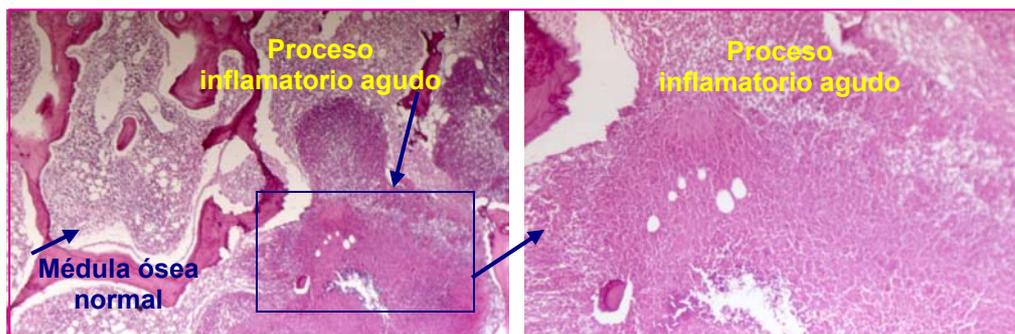
### 3.2.4. Evolución histológica

Con el fin de confirmar la eficacia de los implantes de CFX, se realizó el estudio anatomopatológico del fémur intervenido. Para ello, se dispuso de siete muestras correspondientes a siete fémures de conejos sacrificados a los 3 días, 1, 2, 3, 4, 6 y 12 semanas, un fémur para cada tiempo.

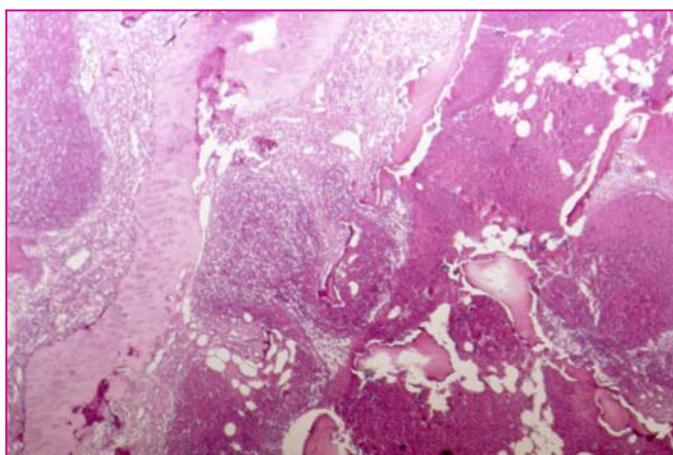
Las muestras se sometieron a técnicas de decalcificación en un periodo variable dependiente de la consistencia pétreo de las mismas. A continuación, se seccionaron longitudinalmente, se identificó el implante y se seccionó la zona correspondiente al mismo y zonas adyacentes que se incluyeron en parafina para efectuar su estudio histológico. Se practicaron secciones de 6 micras a las que se les efectuó la técnica convencional de tinción de hematoxilina-eosina.

Los hallazgos histológicos observados corresponden al proceso evolutivo convencional de un cuadro inflamatorio infeccioso en torno al implante.

Inicialmente, a los tres días de la implantación se observa un proceso inflamatorio agudo, difuso, periimplante, con acúmulo de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y colonias bacterianas (elementos bacterianos cocoides), que desplazan la médula ósea normal y se extienden a espacios intertrabeculares adyacentes, constituyendo grandes placas (figuras 52 y 53). En el implante se aprecian estructuras cristaloides en forma de estrella.



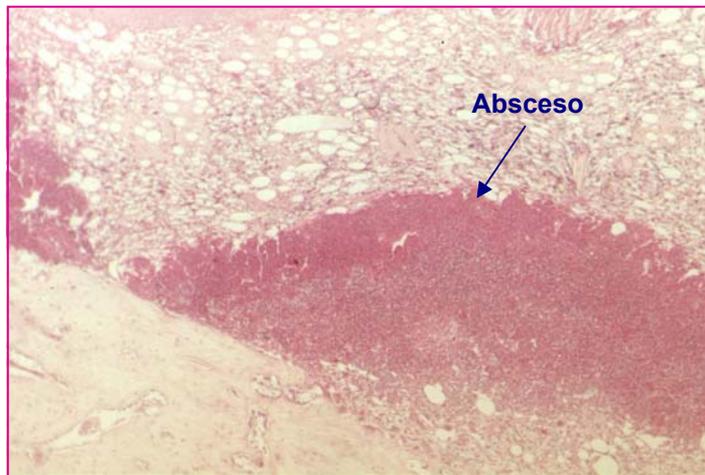
**Figura 52.-** Proceso inflamatorio agudo y médula ósea normal observada en preparaciones de muestras correspondientes a los 3 días del inicio del tratamiento (conejo CFX-0,2-RxH).



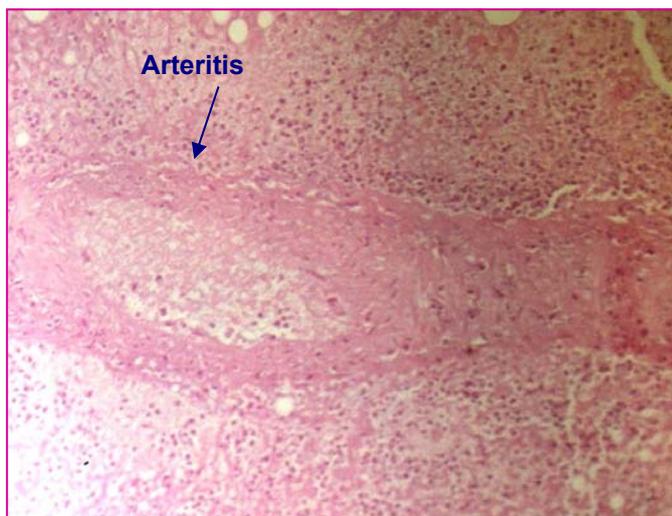
**Figura 53.-** Extensión del proceso inflamatorio agudo a lo largo del espacio intertrabecular óseo observado en preparaciones de muestras correspondientes a los 3 días del inicio del tratamiento (conejo CFX-0,2-RxH).

En la muestra correspondiente a una semana, ya aparece el absceso histológico (figura 54) y en una de las secciones coincide con una imagen de arteritis en vaso de mediano calibre (figura 55). También se aprecia en otra sección, la pared del vaso permeado por el componente inflamatorio con

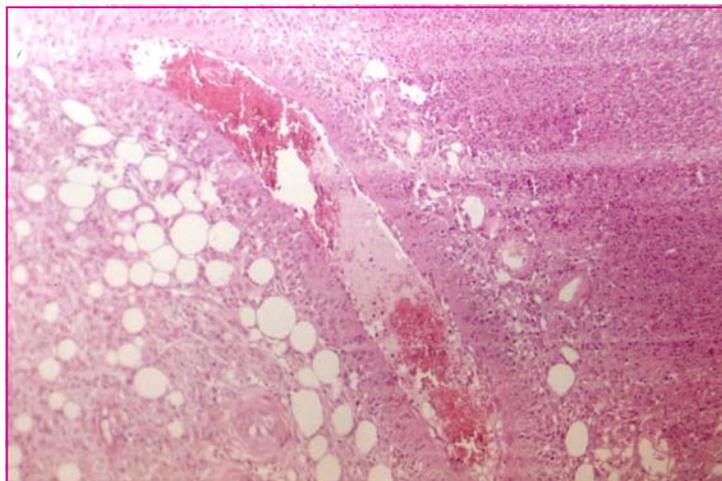
necrosis parietal focal (figura 56). Se observan cuerpos asteroides calcificados en el implante, así como un callo de fractura.



**Figura 54.-** Absceso periimplante observado en preparaciones de muestras correspondientes a la primera y tercera semana (conejos CFX-1-RxH y CFX-3-RxH).

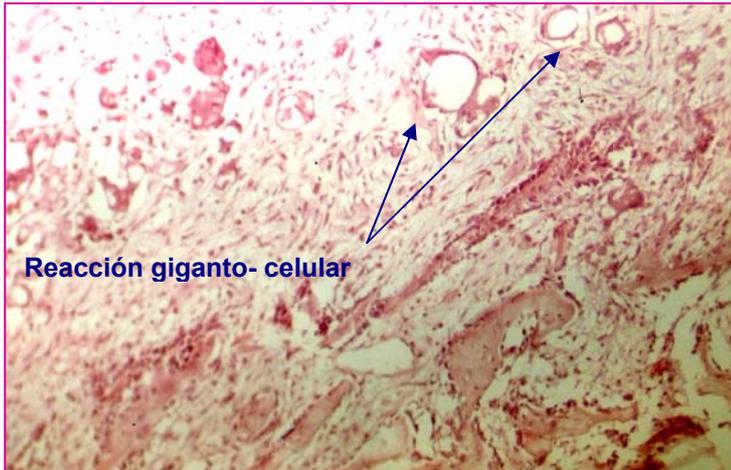


**Figura 55.-** Absceso histológico periimplante con arteritis en un vaso de mediano calibre observado en una de las secciones de la muestra correspondiente a una semana (conejo CFX-1-RxH).

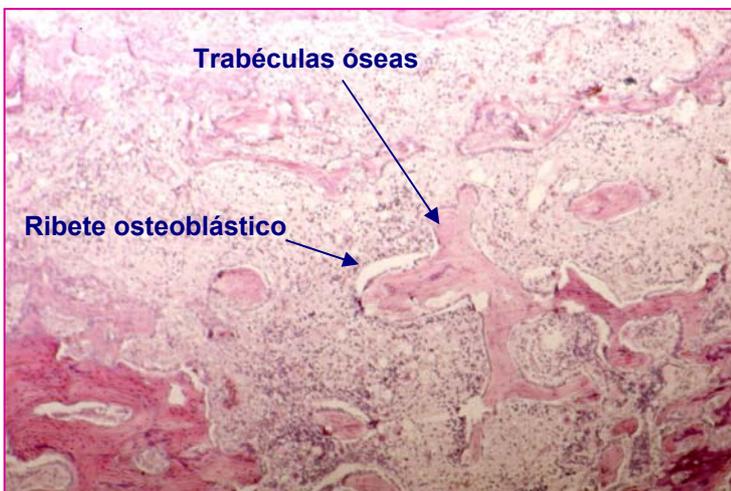


**Figura 56.-** Pared del vaso permeado por el componente inflamatorio con necrosis parietal focal observado en una de las secciones de la muestra correspondiente a una semana (conejo CFX-1-RxH).

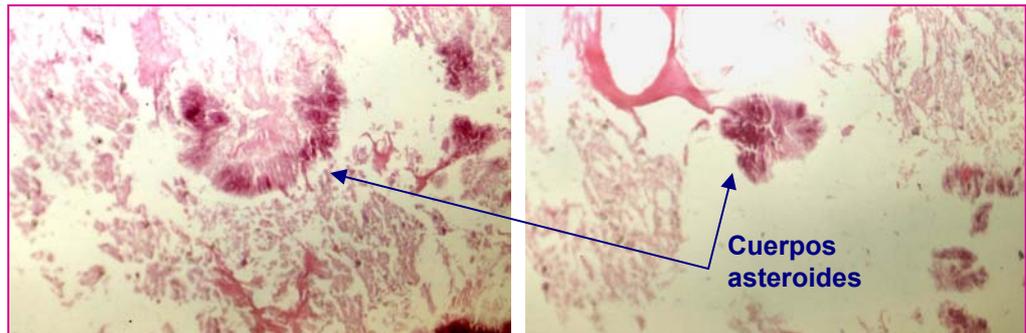
A las dos semanas se añade una reacción gigantocelular, tipo cuerpo extraño (figura 57). En la preparación se ve un callo de fractura evolucionado (figura 58) y el proceso isquémico inflamatorio periimplante con colonias bacterianas. También se observan los cuerpos asteroides calcificados en el implante (figura 59).



**Figura 57.-** Reacción giganto-celular, tipo cuerpo extraño, observada en una de las preparaciones correspondientes a la muestra de dos semanas (conejo CFX-2-RxH).

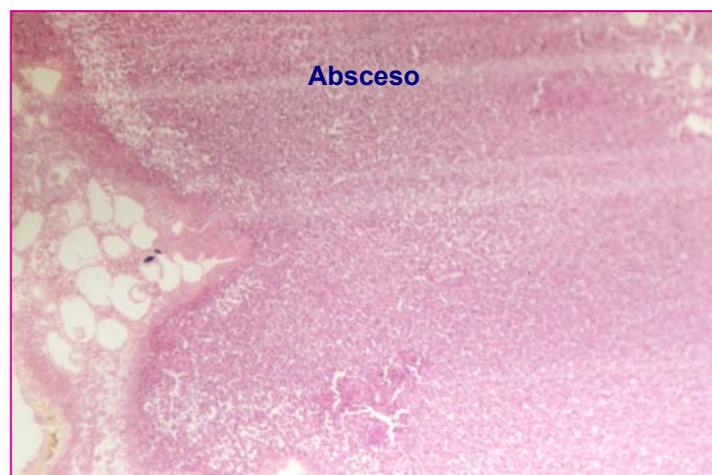


**Figura 58.-** Callo de fractura: trabéculas óseas inmaduras con ribete osteoblástico prominente y tejido conectivo inmaduro intertrabecular, observado en preparaciones correspondientes a muestras de una, dos y tres semanas (conejos CFX-1-RxH, CFX-2-RxH y CFX-3-RxH, respectivamente).



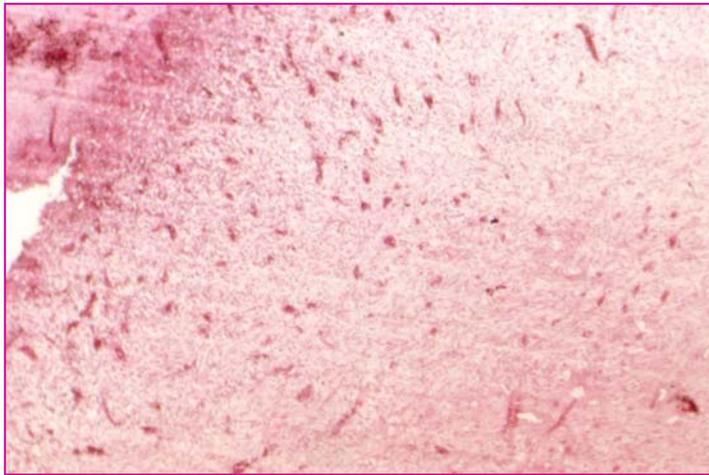
**Figura 59.-** Cuerpos asteroides calcificados observados en las preparaciones correspondientes a la muestra de dos semanas (conejo CFX-2-RxH).

A las tres semanas se observa además, un proceso isquémico con formación de pseudoquistes. Permanece la presencia de un callo de fractura, la reacción gigantocelular tipo cuerpo extraño y abscesos histológicos (figura 60). En el implante se observan escasos cuerpos pigmentados.

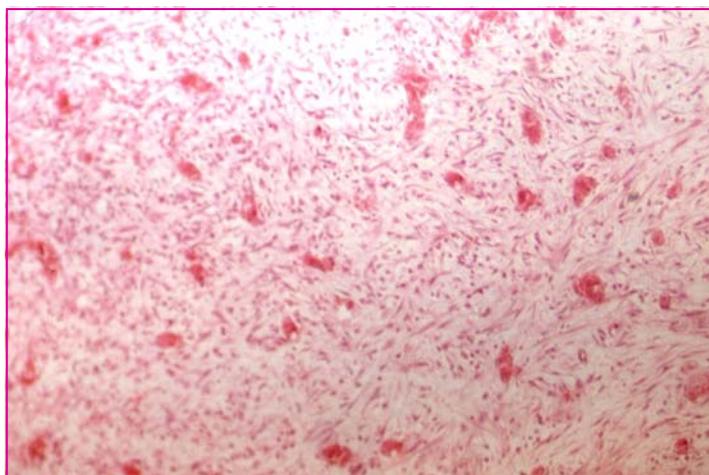


**Figura 60.-** Absceso histológico observado en una de las secciones de la muestra de tres semanas (conejo CFX-3-RxH).

A las cuatro semanas comienza a formarse un tejido de granulación inmaduro en torno al cuadro inflamatorio isquémico (figura 61). Se observa el desarrollo de pequeños vasos capilares y tejido conectivo inmaduro (figura 62). En el implante continua la presencia de estructuras cristaloides poligonales pigmentadas.

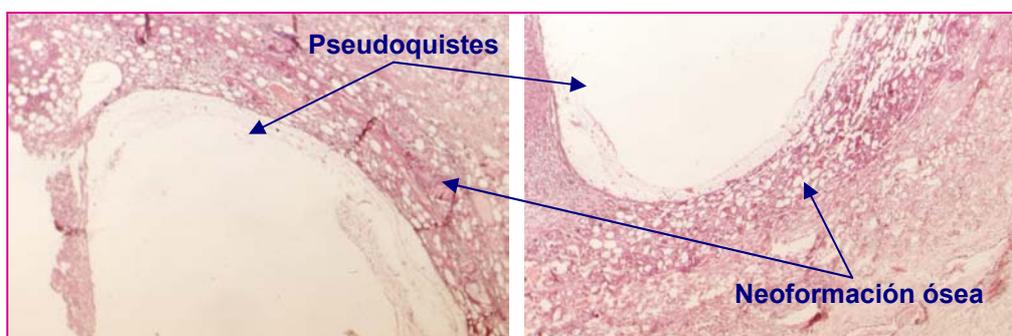


**Figura 61.-** Tejido de granulación inmaduro observado en la muestra correspondiente a las cuatro semanas (conejo CFX-4-RxH).

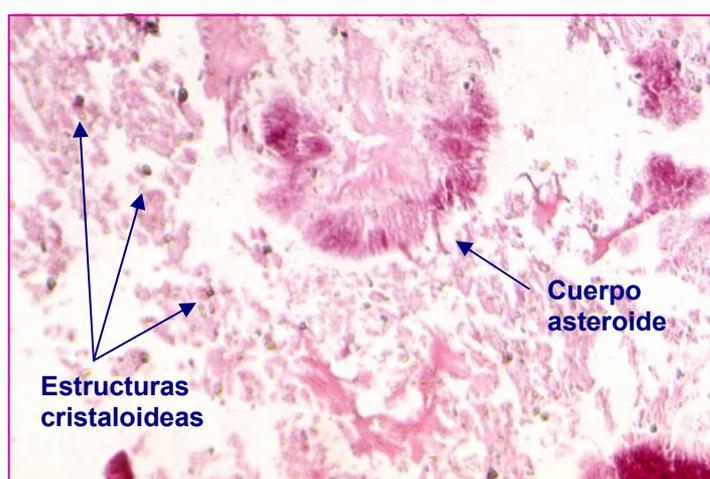


**Figura 62.-** Proliferación fibrovascular: desarrollo de pequeños vasos capilares y tejido conectivo inmaduro observado en una de las secciones de la muestra de cuatro semanas (conejo CFX-4-RxH).

A las seis semanas se añade neoformación ósea inmadura que rodea al proceso inflamatorio, observándose la presencia de abscesos y pseudoquiste periimplante (figura 63) y las estructuras cristaloides pigmentadas en el implante (figura 64).



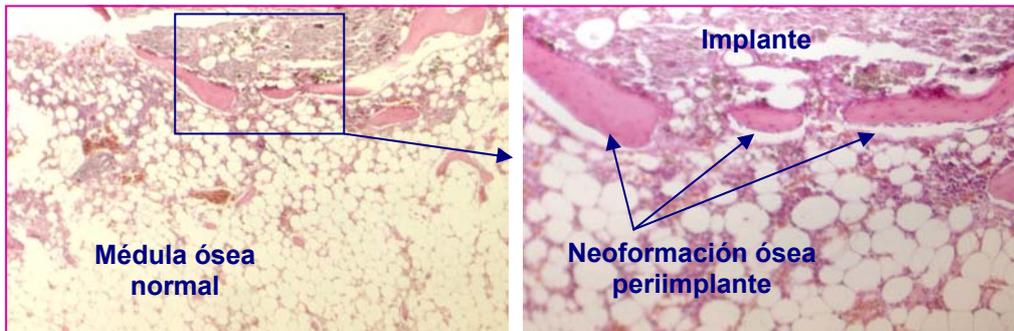
**Figura 63.-** Pseudoquistes periimplante con neoformación ósea inmadura circundante, observados en secciones correspondientes a la sexta semana (conejo CFX-6-RxH).



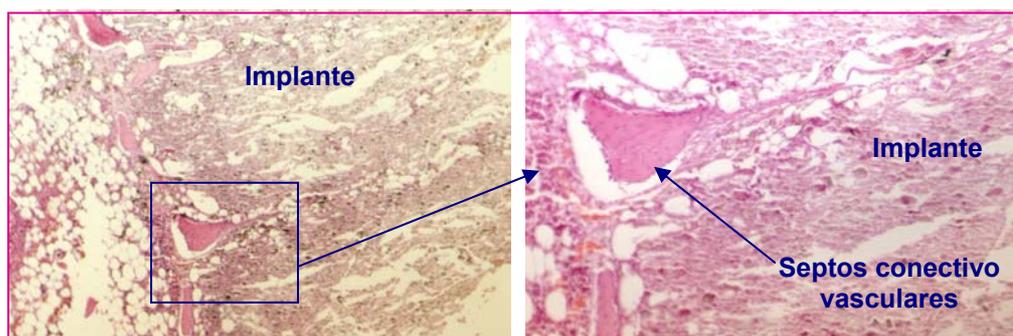
**Figura 64.-** Presencia de estructuras cristaloides pigmentadas y asteroides intrainplante, observados en una de las secciones correspondientes a la sexta semana (conejo CFX-6-RxH).

En todo este tiempo, el implante no sufre modificaciones histológicas significativas; sólo llama la atención, como hemos comentado anteriormente, la presencia en las primeras etapas, de estructuras asteroideas calcificadas que, en etapas posteriores son sustituidas por estructuras poligonales pigmentadas.

A las doce semanas, en las secciones histológicas efectuadas, desaparece el componente inflamatorio e isquémico periimplante con restitución completa del tejido medular, se constituye un pequeño envoltorio óseo (neoformación ósea) periimplante (figura 65) y empiezan a visualizarse septos conectivo-vasculares que penetran desde la periferia al interior del implante (figura 66).



**Figura 65.-** Neoformación ósea periimplante, observada en una de las secciones histológicas, correspondiente a las doce semanas (conejo CFX-12-RxH).



**Figura 66.-** Septos conectivo-vasculares parcialmente osificados intrainplante, observados en una de las secciones histológicas, correspondiente a las doce semanas (conejo CFX-12-RxH).

#### 4. Discusión de los resultados del estudio *in vivo*

En el trabajo realizado, hemos utilizado un modelo de osteomielitis experimental en conejos en el que, para asegurar la colonización de la zona, hemos inoculado *S. aureus* directamente en la médula del fémur, a través del intercóndilo. Este modelo, aunque similar al desarrollado por otros autores<sup>110,98,94,85,87</sup>, no utiliza por ejemplo, cuerpos extraños precolonizados o no, ni agentes esclerosantes para provocar una osteonecrosis local, antes de la inoculación bacteriana, con objeto de potenciar o asegurar el desarrollo de la infección. Cabe resaltar que en todos los animales inoculados, se desarrolló una osteomielitis aguda destructiva, excepto en dos, en los que no se observaron signos de infección, por lo que nuestro modelo resultó eficaz en la mayoría de los animales y adecuado para inducir una osteomielitis, tal y como confirma la anatomía patológica.

La concentración bacteriana con la que se inoculó el fémur de los animales ( $2,5 \times 10^8$  ufc/ml), se mantuvo durante el periodo pre-tratamiento en valores prácticamente iguales.

Según la bibliografía consultada, el tiempo necesario para que se desarrolle la infección, oscila entre dos<sup>98,110</sup> y tres<sup>85,94</sup> semanas, dependiendo del modelo experimental. En nuestro caso, a las dos semanas ya existían signos evidentes de infección en los animales, por lo que se eligió como periodo adecuado.

Otro aspecto interesante y que constituye una práctica habitual en clínica, para el tratamiento de las infecciones osteoarticulares, es el desbridamiento y limpieza de la zona afectada, antes de proceder, como en nuestro caso, a la colocación del implante con antibiótico. Como hemos comprobado, este proceso contribuye a la eliminación de los microorganismos causantes de la infección, pero sin embargo, si no se instaure rápidamente una terapia antimicrobiana eficaz, el crecimiento bacteriano se intensifica (figura 31), por lo que como único tratamiento no sería suficiente para curar la infección. Por otro lado, en muchas ocasiones, la administración sistémica de antibióticos no es eficaz para alcanzar niveles terapéuticos en el foco de infección; esta situación es lo que ha llevado al desarrollo de sistemas de liberación local de antibióticos, como el elaborado en este trabajo, que ha permitido la eliminación total del foco infeccioso y lo que es más importante aún, la ausencia de recidivas después de tres meses de la implantación de este sistema con ciprofloxacino.

El cuadro inflamatorio-infeccioso y su evolución tras el tratamiento, se ven reflejados en la evolución temporal de los parámetros biológicos seleccionados como indicadores clínicos. Tras la implantación, tanto los leucocitos y plaquetas, como los niveles de proteína C-Reactiva se normalizan y el peso evoluciona hacia valores normales.

El peso es un parámetro habitualmente empleado como indicador de la gravedad de la infección<sup>87,94</sup> y, aunque algunos autores<sup>98</sup> lo consideran poco discriminador, nosotros creemos que puede ser un fiel reflejo del proceso; así, hemos observado una importante pérdida de peso durante el

periodo pre-tratamiento y un incremento fisiológico durante el proceso de recuperación en los animales tratados, al contrario que el grupo control, que continúa perdiendo peso.

De acuerdo con la bibliografía consultada de modelos experimentales, el parámetro hematológico más utilizado es el recuento de leucocitos<sup>87</sup>, en cambio el registro de los niveles de PCR y plaquetas no es habitual para el seguimiento del proceso inflamatorio-infeccioso. Sin embargo, en nuestro estudio, ambos parámetros fueron muy ilustrativos de la gravedad de la infección. Si bien es cierto que el aumento de la proteína C-Reactiva puede indicar tanto un proceso infeccioso, como inflamatorio, en este caso los elevados niveles que se alcanzan durante el periodo pre-tratamiento son debidos fundamentalmente a la infección.

Una vez superado este periodo los dos grupos son desbridados y sometidos al fresado interno del hueso y por tanto, la única diferencia entre ambos es la instauración o no del tratamiento local con el implante de ciprofloxacino. Los niveles de PCR aumentan como respuesta a la inflamación debida a la intervención quirúrgica y a la infección provocada, si bien mientras en los tratados se van normalizando, en el grupo no tratado los niveles de PCR se mantienen elevados, principalmente debido al componente infeccioso, aún cuando el proceso inflamatorio perdura, tal y como se observa en los análisis histológicos.

Además del recuento de estafilococos y la monitorización de los parámetros biológicos, para cuantificar la evolución de la infección se empleó el “índice de gravedad de la infección”. Éste permite valorar conjuntamente todos los signos clínicos; se calcula a partir del promedio de los valores obtenidos para cada signo, exceptuando el de afectación articular, por considerarlo un signo de cronicidad. Por lo tanto, se analizaron cinco signos cuyos valores, según el criterio aplicado, varían de 0 a 4, en función de la gravedad. Según el grado de infección, el índice puede tomar los siguientes

valores: 0-4 indica estado normal, 5-8 leve, 9-12 moderado, 13-16 grave y 17-20 muy grave. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 20, donde se observa que al realizar la limpieza del área afectada, el índice de gravedad obtenido correspondió a moderado. Desde este momento, el índice del grupo control pasó de moderado a los 3 días, a grave durante las tres primeras semanas, para estabilizarse en moderado a las 4 semanas. Sin embargo, en el grupo II, el índice de gravedad disminuyó, manteniéndose en valores normales durante todo el experimento. Por la tanto, la infección empeoró o se mantuvo igual en los animales del grupo I, mientras que los del grupo II, tratados con el implante de CFX, mejoraron e incluso se normalizaron. Estos datos clínicos reflejados en el índice de gravedad, se encuentran correlacionados con los parámetros hematológicos y bioquímicos, tal y como puede observarse en los apéndices I y II de esta memoria.

T (semanas)	0	0,42	1	2	3	4	6	12
Grupo I	8,9	8,7	15,7	12,3	15,3	10		
Grupo II	8,9	2,3	2	1,3	1	0,75	0	0,5

**Tabla 20.-** Índice de gravedad de la infección en una escala de 0 a 20, calculados para los signos clínicos de artritis, herida, fístula, supuración articular y sinovitis, durante el periodo postratamiento.

El estudio radiológico reveló que a las dos semanas de la inoculación de *S. aureus*, los signos de infección apreciados fueron el aumento considerable de partes blandas, descrito por la mayoría de los autores, y la presencia de una fractura espontánea en uno de los casos, parámetro que Lucke et al.<sup>87</sup> incluyen también como criterio de infección.

Tras la colocación del implante, a los tres días, se aprecia un proceso de osteólisis central que engloba el implante, que va difuminándose en las siguientes semanas, comenzando a las dos semanas a observarse un engrosamiento de la cortical en la zona del implante. En las semanas sucesivas, desaparece finalmente el área de radiolucencia (osteólisis) perimplante y se va ensanchando el diámetro óseo con engrosamiento cortical a nivel del implante, el cual va perdiendo sus límites, apareciendo finalmente, entre las nueve y las doce semanas, hueso radiológicamente maduro, tanto en la zona proximal como distal a él.

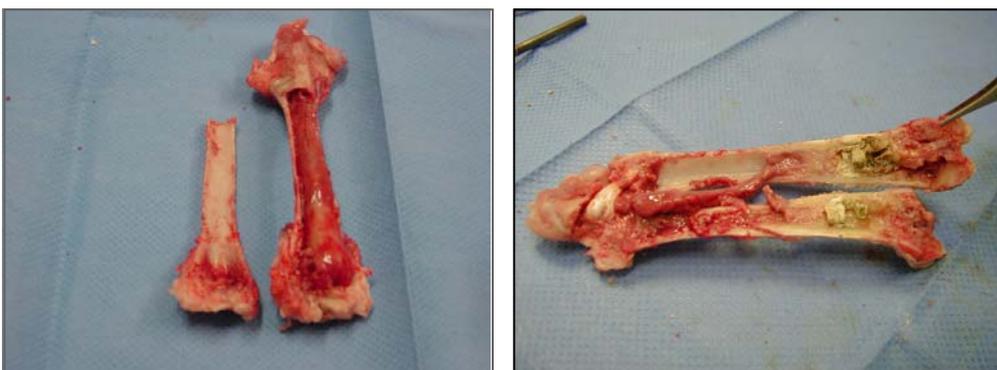
Después del tratamiento con el implante, en ningún animal se encontraron aquellos signos o parámetros radiográficos indicativos de infección, establecidos por numerosos autores<sup>68,85,87,95,96</sup>. Estos autores determinan radiológicamente la eficacia del tratamiento a través de: (a) la desaparición gradual del área de osteólisis<sup>98</sup>, (b) la reducción de la deformidad de las partes blandas<sup>85</sup>, (c) el no empeoramiento radiográfico del proceso<sup>73,80</sup>, (d) la unión del implante al hueso<sup>70</sup>, (e) la no aparición de signos de infección en los animales implantados<sup>87</sup> o la presencia de formas más leves<sup>96</sup> y (f) la disminución progresiva de los signos hasta la normalización del hueso<sup>84</sup>.

En resumen, la eficacia de los implantes de CFX se confirma por la no progresión de la infección, siguiendo los diferentes parámetros radiográficos indicativos de osteomielitis, establecidos por la mayoría de los autores citados.

La evolución del proceso infeccioso, valorado a partir del recuento de estafilococos, parámetros biológicos, índice de gravedad de la infección y signos radiológicos, se refleja en los resultados de anatomía patológica. Los hallazgos histológicos observados corresponden a un proceso inflamatorio infeccioso. Inicialmente se observan leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, macrófagos, colonias bacterianas, reacción gigantocelular tipo

cuerpo extraño y procesos isquémicos, que van desapareciendo en el tiempo para dejar paso a un proceso de recuperación tisular. A partir de las cuatro semanas, comienza a formarse un tejido de granulación inmaduro entorno al cuadro inflamatorio-isquémico, que desemboca en neoformación ósea inmadura y que evoluciona hacia la restitución completa del tejido medular, y la formación de septos conectivo-vasculares que penetran desde la periferia al interior del implante.

En la figura 67 podemos ver las diferencias macroscópicas entre un fémur infectado del grupo control y otro del grupo II, a las 4 semanas. En el fémur no tratado, la cavidad medular tiene aspecto inflamatorio, eritematoso y brillante, y las corticales adelgazadas. Mientras que en el fémur tratado con el implante de CFX, se observa una trabeculación medular normal y en la zona del implante, neoformación ósea periférica con engrosamiento cortical.



**Figura 67.-** Aspecto de la cavidad medular del fémur infectado a las 4 semanas, sin tratar (izquierda) y tratado con el implante de CFX (derecha).

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. La esterilización mediante radiaciones  $\gamma$  tanto de los implantes de gentamicina, como de ciprofloxacino, elaborados con mezcla de fosfatos cálcicos y polímero, no afecta a los componentes de la matriz. Solamente el peso molecular del polímero de la cubierta de los implantes de gentamicina, PLA-200, disminuyó de forma importante.
2. Los perfiles de cesión *in vitro* de ambos antibióticos desde estos sistemas, no se modificaron tras el proceso de esterilización.
3. La cesión de gentamicina *in vitro* desde los implantes conteniendo una carga próxima al 10%, resultó demasiado rápida como para considerarlos adecuados para el tratamiento local de una osteomielitis.
4. El método experimental de infección por *Staphylococcus aureus* utilizado, permitió el desarrollo de una osteomielitis aguda difusa en el fémur de conejos.
5. La monitorización del peso, recuento de plaquetas y leucocitos, y niveles séricos de proteína C-reactiva, a lo largo de los ensayos *in vivo*, permitió la valoración de la evolución de la infección. Así, durante el periodo de pre-tratamiento, el peso de los animales disminuyó en un 12%, las plaquetas aumentaron desde valores normales de 400.000 a 1.100.000 y los leucocitos de 6.800 a 8.700. Los niveles de proteína C-reactiva fueron superiores a 96 mg/l, en la mayoría de los animales.

6. La eficacia terapéutica de los implantes de ciprofloxacino se puso de manifiesto a través del aumento de peso, disminución del número de leucocitos, plaquetas, niveles de PCR e índice de gravedad.
7. La eficacia terapéutica de los implantes de ciprofloxacino, desde el punto de vista radiológico, se confirmó por la no progresión de signos radiográficos indicadores de infección y la integración del implante en la estructura ósea afectada.
8. El análisis anatomopatológico resultó ser una herramienta útil para el seguimiento de la eficacia de los implantes de ciprofloxacino. Inicialmente se aprecia un proceso inflamatorio infeccioso, que desaparece con el tiempo, mientras tiene lugar una respuesta reparativa y la progresiva invasión del implante por neoformación ósea.
9. Los implantes de ciprofloxacino fueron terapéuticamente eficaces para el tratamiento de la infección ósea por *S.aureus*. El 100% de los animales infectados sanaron en cuatro semanas, y no se observaron recidivas durante los tres meses que duró el estudio.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Nelaton A. "Eléments de pathologie chirurgicale", en "Osteítis". Ed. Coudane H. y Gérard A. EMQ. Elsevier. Paris. 2002.14-078.
- <sup>2</sup> Trueta J. "The three types of acute haematogenous osteomyelitis". *J. Bone Joint Surg.* 1959; 41-B: 671-680.
- <sup>3</sup> Trueta J. "Studies of the development and decay of the human frame". W.B. Saunders. Philadelphia. 1968; pp: 254-260.
- <sup>4</sup> Coudane H. y Gérard A. "Osteítis". EMQ. Elsevier. Paris. 2002.14-078.
- <sup>5</sup> Bello Prats S. "La prótesis total de rodilla infectada". *Rev. Ortop. Traumatol.* 2000; 2: 226-236.
- <sup>6</sup> Javaloyas Morlius M. "Osteomielitis". *Jano* 2003; 64:43-53.
- <sup>7</sup> Waldvogel F. A., Medoff G. y Swartz M.N. "Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects". *N. Engl. J. Med.* 1970; 282: 198-206.
- <sup>8</sup> Cierny G., Mader J.T. y Pennick H. "A clinical staging system of adult osteomyelitis". *Contemp. Orthop.* 1985; 10: 17-37.
- <sup>9</sup> Pigrau Serrallach C. "Osteomielitis". *Medicina Interna.* Masson. 2002; pp: 1675-1680.
- <sup>10</sup> Gomis Gavilán M., Ledesma Martín-Pintado F. y Sánchez Artola B. "Diagnóstico de la Osteomielitis crónica". *Jano* 1997; 52:43-48.
- <sup>11</sup> Bureau N. J., Chhem R. K. y Cardinal E. "Musculoskeletal infections : US manifestations". *Radiographics* 1999; 19:1585-1592.
- <sup>12</sup> Hanssen A.D. y Rand J.A. "Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty". *J. Bone Joint. Surg.* 1998; 80-A: 910-922.
- <sup>13</sup> Vaqué Rafart J., Nardi Vilaardaga J., Rosselló Urgell J., Arribas Llorente J.L., Hernández Navarrete M.J., García Caballero J. y Herruzo Cabrera R. "Epidemiología de las infecciones en cirugía ortopédica y traumatología". Estudio EPINE. *Med. Clin.(Barc.)*1997; 109 (supl 1): 3-11.

- <sup>14</sup> Gillespie W.J. "Prevention and management of infection at the site of a total joint replacement". *Clin. Infect. Dis.* 1997; 25:1310-1317.
- <sup>15</sup> Barberan J., Carroquino G. y Gomis M. "Preguntas y respuestas sobre infecciones de prótesis articulares". *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2000; 18 (7): 370-375.
- <sup>16</sup> Cordero Ampuero J. "Mecanismos de resistencia bacteriana en la infección de implantes". *Rev. Ortop. Traumatol.* 2000; 2: 115-126.
- <sup>17</sup> Petty W. "The effect of methylmethacrylate on bacterial phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leukocytes". *J. Bone Joint Surg.* 1978; 60 (6):752-757.
- <sup>18</sup> Gristina A.G., Naylor P.T. y Myrvik Q.N. "Mechanisms of musculoskeletal sepsis". *Orthop. Clin. North Am.* 1991; 22: 363-371.
- <sup>19</sup> Gristina A.G. y Costerton J.W. "Bacterial adherence to biomaterials and tissue". *J. Bone Joint Surg.* 1985; 67A: 264-273.
- <sup>20</sup> Ellington J.K., Harris M., Webb L., Smith T., Tan K. y Hudson M. "Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis". *J. Bone Joint Surg.* 2003; 85-B: 918-921.
- <sup>21</sup> Tsukayama D.T., Estrada R. y Gustilo R.B. "Infection after total hip arthroplasty: a study of the treatment of one hundred and six infections". *J. Bone Joint Surg.* 1996; 78A: 512-523.
- <sup>22</sup> Choudhry R.R., Rice R.P., Triffitt P.D., Harper W.M. y Gregg P.J. "Plasma viscosity and C-Reactive protein after total hip and knee arthroplasty". *J. Bone Joint Surg.* 1992; 74 (4): 523-524.
- <sup>23</sup> González-Zárate A., Apiñániz P., Aguirrebengoa Ibarburen K. y Montejo Baranda M. "Infección en prótesis ortopédicas". Curso actualización 38º congreso SECOT. 2001.
- <sup>24</sup> Barberan J. "La Osteomielitis: una asignatura pendiente para el siglo XXI". *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2001; 19: 247-248.
- <sup>25</sup> Drancourt M., Stein A., Argenson J.N., Zannier A., Curvale G. y Raoult D. "Oral Rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37: 1214-1218.

- <sup>26</sup> Rissing J.P. "Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: Role of the Quinolones". *Clin. Infect Dis.* 1997; 25: 1327-1333.
- <sup>27</sup> Levine A.M. y DiBona J.R. "Fluoroquinolones". *J.Am.Acad. Orthop Surg.* 2002;10:1-4.
- <sup>28</sup> Menschik M, Neumüller J., Steiner C.W., Erlachre L., Köller M., Ullrich R., Graninger W. y Graninger W.B. "Effects of Ciprofloxacino and ofloxacin on adult human cartilage in vitro". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 2562-2565.
- <sup>29</sup> Lerner R.K., Esterhai J.L., Polomano R.C., Cheatle M.D. y Heppenstall R.B. "Quality of life assessment of patients with posttraumatic fracture non-union, chronic refractory osteomyelitis, and lower-extremity amputation". *Clin. Orthop.* 1993; 295: 28-36.
- <sup>30</sup> Flores Sánchez X., Joshi Jubert N. y Hernández Martínez A. "Tratamiento quirúrgico de la osteítis crónica". Cursos de Actualización. 39º Congreso SECOT. 2002.
- <sup>31</sup> Cabo Cabo J., Fernández Sabaté A. y Pérez Fernández A. "Tratamiento de cavidades y defectos óseos segmentarios infectados". Cursos de Actualización. 40º Congreso SECOT. 2003.
- <sup>32</sup> Colchero Rozas F. "Tratamiento integral del paciente con infección ósea". Trillas. Mexico.1990.
- <sup>33</sup> Fernández Sabaté A., Schwartz Riera S., Rubio Fernández I. y Chacon P. "Análisis del líquido de irrigación continua en el tratamiento de las infecciones osteoarticulares". *Rev. Ortop. Traumatol.* 1980; 24 IB: 462-472.
- <sup>34</sup> Fitzgerald R.H., Ruttle P.E., Arnold P.G., Kelly P.J. y Irons G.B. "Local muscle flaps in the treatment of chronic osteomyelitis". *J. Bone Joint Surg.* 1985; 67-A: 175-185.
- <sup>35</sup> Fernández Sabaté A. y Cabo J. "Tratamiento quirúrgico de la infección de cadera". En "La cadera" (tomo II). Ed.: Herrera A., Herrero G., Fernández L. y Rodríguez A. Masson, Barcelona. 2002; 103-113.
- <sup>36</sup> Chan Y.S., Ueng S.W., Wang C.J. Lee S.S., Chen C.Y. y Shin C.H. "Antibiotic-impregnated autogenic cancellous bone grafting is an effective and safe method for the management of small infected tibial defects: a comparison study". *J. Trauma.* 2000; 48(2): 246-255.

- <sup>37</sup> Fernández Sabaté A., Riu Labrador R., Moreta Monujos D. y Cáceres Palou E. "Tratamiento de las osteítis diafisarias de tibia mediante sinostosis tibioperonea y resección ósea". *Rev. Ortop. Traumatol.* 1984; 28 IB: 275-284.
- <sup>38</sup> Stock W. y Hierner R. "Applications and techniques of vascularized bone transfer". *Injury* 1994; 25: 35-45.
- <sup>39</sup> Bianchi Maiocchi A. y Martí González J.C. "Osteosíntesis: Técnica de Ilizarov". Norma, Madrid. 1990.
- <sup>40</sup> Campos Amigo E., Calzadilla Moreira V. y Castilla García I. "Transportación ósea en el tratamiento de la osteomielitis". *Rev. Cubana Ortop. Traumatol.* 1999; 13(1-2): 99-103.
- <sup>41</sup> Cordero Ampuero J. "Biomateriales". En "Actualizaciones en cirugía ortopédica y traumatología". 3ª ed., Masson, Barcelona. 2001.
- <sup>42</sup> Kanellopoulou K. y Giamarellos-Bourboulis E.J. "Carrier system for the local delivery of antibiotics in bone infections". *Drugs* 2000; 59(6):1223-1232.
- <sup>43</sup> Rushton N. "Applications of local antibiotic therapy". *Eur. J. Surg.* 1997; 578: 27-30.
- <sup>44</sup> Allababidi S. y Shah J.C. "Kinetics and mechanism of release from glyceryl monostearate-based implants: evaluation of release in a gel simulating in vivo implantation". *J. Pharm. Sci.* 1998; 87(6): 738-744.
- <sup>45</sup> Castro C., Sánchez E., Delgado A., Soriano I., Nuñez P., Baro M., Perera A. y Évora C. "Ciprofloxacin implants for bone infection. *In vitro-in vivo* characterization". *J. Control. Rel.* 2003; 93: 341-354.
- <sup>46</sup> Wahlig H., Dingeldein E., Bergmann R. y Reuss K. "The release of gentamicin from polymethylmetacrylate beads". *J. Bone Joint Surg.* 1978; 60-B: 270-275.
- <sup>47</sup> Wahlig H. y Dingeldein E. "Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop. Scand.* 1980; 51: 49-56.
- <sup>48</sup> Walenkamp G.H., Kleijn L.L. y Leeuw M. "Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years". *Acta Orthop, Scand*, 1998; 69: 518-522.

- <sup>49</sup> Klemm K.W. "Gentamicin-PMMA-Kulgen in der Behandlung abszedierender Knochen-und Weichteilinfektionen". *Zentralbl. Chir.* 1979; 104: 934-942.
- <sup>50</sup> Klemm K.W. "Antibiotic bead chains". *Clin. Orthop.* 1993; 295: 63-76.
- <sup>51</sup> Klemm K.W. y Schnettler R. "The use of gentamicin-PMMA chains in the treatment of infected tibial non-union". *Acta Orthop. Belg.* 1992; 58 (supl I): 222-226.
- <sup>52</sup> Blaha J.D., Calhoun J.H., Nelson C.L., Henry S.L., Seligson D., Esterhai J.L.Jr., Heppenstall R.B., Mader J., Evans R.P. y Wilkins J. "Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis". *Clin. Orthop.* 1993; 295: 8-12.
- <sup>53</sup> Nelson C.L., Evans R.P., Blaha J.D., Calhoun J., Henry S.L. y Patzakis M.J. "A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmetacrylate beads implantation to convencional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty". *Clin. Orthop.* 1993; 295: 96-101.
- <sup>54</sup> Evans R.P. y Nelson C.L. "Gentamicin-impregnated polymethylmetacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment do chronic osteomyelitis". *Clin. Orthop.* 1993; 295: 37-42.
- <sup>55</sup> Calton T.F., Fehring T.K. y Griffin W.L. "Bone loss associated with the use of spacer blocks in infected total knee arthroplasty". *Clin. Orthop.* 1997; 345:148-154.
- <sup>56</sup> Koo K.H., Yang J.W., Cho S.H., Song H.R., Park H.B., Ha Y.C., Chang J.D., Kim S.Y. y Kim Y.H. "Impregnation of vancomycin, gentamicin and cefotaxime in a cement spacer for two-stage cementless reconstruction in infected total hip arthroplasty". *J. Arthrop.* 2001; 16: 882-892.
- <sup>57</sup> Kendall R.W., Duncan C.P., Smith J.A. y Ngui-Yen J.H. "Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots.A reason for caution". *Clin. Orthop.* 1996; 329: 273-280.
- <sup>58</sup> Stamos M.J. "Effectiveness of collagen-gentamicin implant for treatment of "dirty" abdominal wounds". *Diseases of Colon Rectum* 1999; 42(9):1239.
- <sup>59</sup> Holzer B., Gruner U., Bruckner B., Houf M. Kiffner E., Schildberg F.W., Vogel P. y Rosen H.R. "Efficacy and tolerance of a new gentamicin collagen

fleece (Septocoll®) after surgical treatment of a pilonidal sinus". *Colorrectal Disease* 2003; 5(3): 222-227.

<sup>60</sup> Ipsen T., Jorgensen P.S., Damholt V. y Torholm C. "Gentamicin-collagen sponge for local applications. 10 cases of chronic osteomyelitis followed for 1 year". *Acta Orthop. Scand.* 1991; 62: 592-594.

<sup>61</sup> Stemberger A., Grimm H., Bader F., Rahn H.D. y Ascherl R. "Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge". *Eur. J. Surg.* 1997; Supl 578:17-26.

<sup>62</sup> Peltier L.F. "The use of plaster of Paris to fill large defects en bone: a preliminary report". *Clin. Orthop.* 2001; 382: 3-5.

<sup>63</sup> Sherry E., Boeck H. y Warnke H. "Percutaneous treatment of chronic MRSA osteomyelitis with a novel plant-derived antiseptic". *BMC Surgery* 2001; 1:1-3.

<sup>64</sup> Mckee M.D., Wild L.M., Schemitsch E.H. y Waddell J.P. "The use of an antibiotic-impregnated, osteoconductive, bioabsorbable bone substitute en the treatment of infected long bone defects: early results of a prospective trial". *J. Orthop. Traum.* 2002; 16: 622-627.

<sup>65</sup> Turner T.M., Urban R.M., Gitelis S., Kuo K.N. y Andersson G.B.J. "Radiographic and histologic assessment of calcium sulfate in experimental animal models and clinical use as a resorbable bone-graft substitute, a bone-graft expander and a method for local antibiotic delivery". *J. Bone Joint Surg.* 2001; 83-A (supl2): 8-18.

<sup>66</sup> Gitelis S. y Brebach G.T. "The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant". *J. Ortho. Surg.* 2002; 10(1): 53-60.

<sup>67</sup> Cordero Ampuero J. "Biomateriales". Manual SECOT de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Masson, Barcelona. 2003: 42-52.

<sup>68</sup> Korkusuz F., Uchida A., Shinto Y., Araki N., Inoue K. y Ono K. "Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-clacium hidroxiapatite ceramic composites". *J. Bone Joint Surg.* 1993; 75-B: 111-114.

<sup>69</sup> Solberg B., Gutow A.P. y Baumgaertner M.R. "Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model". *J. Orthop. Trauma.* 1999; 13(2): 102-106.

- <sup>70</sup> Itokazu M., Ohno T., Tanemori T., Wada E., Kato N. y Watanabe K. "Antibiotic-loaded hydroxyapatite blocks in the treatment of experimental osteomyelitis in rats. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46: 779-783.
- <sup>71</sup> Lambotte J.C., Thomazeau H., Cathelineau G., Lancien G., Minet J. y Langlais F. "Phosphate tricalcique, vecteur d'antibiotiques : étude sur foyer d'ostéomyélite expérimentale chez le lapin". *Chirurgie* 1998; 123: 572-579.
- <sup>72</sup> Norden C.W. "Experimental osteomyelitis. A description of the model". *J. Infect. Dis.* 1970 ; 122: 928-932.
- <sup>73</sup> Shirliff M.E., Calhoun J.H. y Mader J.T. "Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite". *Clin. Orthop.* 2002; 401: 239-247.
- <sup>74</sup> Mader J.T. "Animal models of osteomyelitis". *Am. J. Med.* 1985; 78: 213-217.
- <sup>75</sup> Yamashita Y., Uchida A., Yamakawa T., Shinto Y., Araki N. y Kato K. "Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic". *Int. Orthop.* (SICOT) 1998; 22: 247-251.
- <sup>76</sup> Kawanabe K., Okada Y., Matsusue Y., Iida H. y Nakamura T. "Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic". *J. Bone Joint Surg.* 1998; 80-B: 527-530.
- <sup>77</sup> Boyan B.D., Nasatzky E. Séller T.A. y Schwartz Z. "Sustitutos del injerto óseo". *Current Opinión Orthop.* 1998; III(4): 17-23.
- <sup>78</sup> García Novalvos A., Clavel-Sainz M., Meseguer J., Tabardo A., Santoja F. "Poliésteres (PLA/PGA) biodegradables en cirugía ortopédica: estudio de su degradación y sustitución por tejido óseo". *Rev. Ortop. Traum.* 1996; 40: 500-510.
- <sup>79</sup> Castillo F., SDoso S. y Fernández Retana P. "Evaluación del potencial osteogénico de los polímeros bioabsorbibles derivados del ácido láctico utilizados como sustitutivos óseos. Estudio experimental en conejos". *Rev. Ortop. Traumatol.* 2003; 47: 428-433.
- <sup>80</sup> Calhoun J. y Mader J.T. "Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant". *Clin. Orthop.* 1997; 341:206-214.

- <sup>81</sup> Jacob E., Cierny G., Zorn K., McNeill J.F. y Fallon M.T. "Delayed local treatment of rabbit tibial fractures with biodegradable cefazolina microspheres". *Clin. Orthop.* 1997; 336: 78-285.
- <sup>82</sup> Garvin K.L., Miyano J.A., Robinson D., Giger D., Novak J. y Radio S. "Polylactide/ polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model". *J. Bone Joint Surg.* 1994; 76-A: 1500-1506.
- <sup>83</sup> Fitzgerald R.H. "Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis". *J. Bone Joint Surg.* 1983; 65-A: 371-380.
- <sup>84</sup> Yagmurlu M.F., Korkusuz F., Gürsel I., Korkusuz P., Örs U. y Hasirci V. "Sulbactam-cefeperazon polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis". *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 46(4): 494-503.
- <sup>85</sup> Gürsel I., Korkusuz F., Türesin F., Gürdal Alaessinoglu N. y Hasirci V. "In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release system for the treatment of implant-related osteomyelitis". *Biomaterials* 2001; 22: 73-80.
- <sup>86</sup> Rutledge B., Hüyete D., Day D. y Anglen J. "Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer". *Clin. Orthop.* 2003; 411: 280-287.
- <sup>87</sup> Lucke M., Schmidmaier G., Sadoni S., Wildmann B., Schiller R., Hass N.P. y Raschke M. "Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats". *Bone* 2003; 32: 521-531.
- <sup>88</sup> Lew D.P. y Waldvogel F.A. "Quinolones and osteomyelitis; state of the art". *Drugs* 1995; 49 (supl2): 101-111.
- <sup>89</sup> Overbeck J.P., Winckler S.T., Meffert R., Törmälä P., Spiegel H.U. y Brug E. "Penetration of ciprofloxacin into bone: a new bioabsorbable implant". *J. Invest. Surg.* 1995; 8: 155-162.
- <sup>90</sup> Ramchandani M. y Robinson D. "In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants". *J. Control. Rel.* 1998; 54: 167-175.
- <sup>91</sup> Page-Clisson M.E., Pinto-Alphandary H., Ourevitch M., Andremont A. y Courver P. "Development of ciprofloxacin-loaded nanoparticles: physicochemical study of the drug carrier". *J. Control Rel.* 1998; 56: 23-32.

- <sup>92</sup>Owusu-Ababio G., Rogers J. y Anwar H. "Effectiveness of ciprofloxacin microspheres in eradicating bacterial biofilm". *J. Control. Rel.* 1999; 57: 151-159.
- <sup>93</sup> Kanellakopoulou K., Kolia M., Anastassiadis A., Korakis T., Giamarellos-Bourboulis E.J., Andreopoulos A., Dounis E. y Giamarellou H. "Lactic acid polymers as biodegradable carries of fluorquinolones: an in vitro study". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43 (3): 714-716.
- <sup>94</sup> Kanellakopoulou K., Galanakis N., Giamarellos-Bourboulis J., Rifiotis C., Papakostas K., Adreopoulos A., Dounis E., Daragianalos P. y Giamarellou H. "Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant staphylococcus aureus with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacino". *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 46: 311-314.
- <sup>95</sup> Nie L., Nicolau D., Tessier P., Kourea H., Browner B. y Nightingale C. "Use of a bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment". *J. Orthop. Res.* 1998; 16: 76-79.
- <sup>96</sup> Nicolau D., Nie L., Tessier P., Kourea H. y Nightingale C. "Prophylaxis of acute osteomyelitis with absorbable ofloxacin-impregnated beads". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42 (4): 840-842.
- <sup>97</sup> Morrissy R.T. y Haynes D.W. "Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology". *J. Pediatr. Orthop.* 1989; 9 (4): 447-456.
- <sup>98</sup> Sasaki S. y Ishii Y. "Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis". *J. Orthop. Sci.* 1999; 4 (5): 361-369.
- <sup>99</sup> Dekel S. y Francis M.J. "The Treatment of osteomyelitis of the tibia with sodium salicylate". *J. Bone Joint Surg.* 1981; 63-B: 178-184.
- <sup>100</sup> Soriano I. y Évora C. "Formulation of calcium phosphates/poly (d,l-lactide) blends containing gentamicin for bone implantation". *J. Control Rel.* 2000; 68: 121-134.
- <sup>101</sup> Sánchez E., Baro M., Soriano I., Perera A. y Évora C. "In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001; 52: 151-158.
- <sup>102</sup> Baro M., Sánchez E., Delgado A., Perera A., y Évora C. "In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants". *J. Control Rel.* 2002; 83: 353-364.

- <sup>103</sup> Zhang X., Wyss U.P., Pichora D. y Goosen M.F.A. "Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties". *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46: 718-724.
- <sup>104</sup> USP Pharmacopeia 24, sterilization and sterility assurance. En: The United States Pharmacopeia & National Formulary. The United States Pharmacopeia Convention, USP 24 NF19; 2000; 2145-2146.
- <sup>105</sup> Moujir L., Gutiérrez-Navarro A.M., González A.G., Ravelo A.G. y Luis J.G. "The relationship between structure and antimicrobial activity in quinines from the celastraceae". *Biochemical Systematic and Ecology*, 1990; 18: 25-28.
- <sup>106</sup> Mauduit J., Bukh N. y Vert M. "Gentamycin/poly(lactic acid) blends aimed at sustained release local antibiotic therapy administered per-operatively. I. The case o gentamycin base and gentamycin sulphate in poly(DL-lactic acid)oligomers". *J. Control. Rel.* 1993; 23: 209-220.
- <sup>107</sup> Torniaainen K., Tammilehto S. y Ulvi V. "The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin". *Int. J. Pharm.* 1996; 132: 53-61.
- <sup>108</sup> Moore J.D. y Flanner H.H. "Mathematical comparison of dissolution profiles". *Pharm. Technol.* 1996; 20: 64-74.
- <sup>109</sup> Shah V.P., Tsong Y., Satle P. y Lin P. " In vitro dissolution profile comparison-statistic and analysis of the similarity factor,  $f_2$ ". *Pharm. Res.* 1998; 15: 889.895.
- <sup>110</sup> Mayberry-Carson K.J., Tober-Meyer B., Gill L.R., Lambe D.W. y Hossler F.E. "Effect of ciprofloxacin on experimental osteomyelitis in the rabbit tibia, induced with a mixed infection of *Staphylococcus epidermidis* and *Bacterioides thetaiotaomicron*". *Microbios.* 1990; 64: 49-66.
- <sup>111</sup> Wei G., Kotoura Y., Oka M., Yamamuro T., Wada R., Hyon S.H. y Ikada Y. "A bioabsorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis. The use of lactic acid oligomer as a carrier". *J. Bone Joint Surg.* 1991; 73-B: 246-252.
- <sup>112</sup> Siegel S. y Castellan N. J. "Nonparametric statistic for the Behavioural Sciences". 2ª ed; McGraw-Hill. New York. 1988.

- <sup>113</sup> Baro Darías M. "Estudio *in vivo* - *in vitro* de implantes óseos de gentamicina". Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. ISBN: 84-688-5018-7; 2002.
- <sup>114</sup> Castro Pertiñez C. "Desarrollo y optimización de implantes osteointegrables de cesión controlada de ciprofloxacino para el tratamiento local de infecciones óseas". Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. ISBN:84-688-5040-3; 2003.
- <sup>115</sup> Rosenkrantz B.E., Greco J.R., Hoogerheide J.G. y Oden E.M. "Gentamicin sulphate" En: *Analytical Profiles of Drug Substances*. Ed. Florey K. Academy Press. New York . 1980; vol 9, pág. 310.
- <sup>116</sup> Maggi L., Segale L., Ochoa Machiste E., Buttafava A., Faucitano A. y Conte U. "Chemical and physical stability of hidroxypropylmethylcellulose matrices containing diltiazem hydrochloride alter gamma irradiation". *J. Pharm. Sci.* 2003; 92 (1): 131-141.
- <sup>117</sup> Montarini L., Costantini M., Ciranni Signoretti E., Valvo L., Santucci M., Bartolomei M., Fattibene P., Onori S., Faucitano A., Conti B. y Genta, I. "Gamma irradiation effects on poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres". *J. Control. Rel.* 1998; 56: 219-229.
- <sup>118</sup> Gilding D.K. y Reed A.M. "Biodegradable polymers for use in surgery. Poly(glycolic acid)/poly(lactic acid) homo and copolymers:1". *Polymer.* 1979; 20: 1459-1464.
- <sup>119</sup> Sanders L.M., Kent J.S., McRae G.I., Vickery B.H., Tice T.R. y Lewis D.H. "Controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone analogue from poly (d,l-lactide-co-glycolide) microspheres". *J. Pharm. Sci.* 1984; 73 (9): 1294-1297.
- <sup>120</sup> Spenlehauer G., Vert M., Benoit J.P. y Boddaert A. "In vitro and in vivo degradation of poly (D,L-lactide/glycolide) type microparticles made by solvent evaporation method". *Biomaterials.* 1989; 10: 557-563.
- <sup>121</sup> Ruiz J.M., Busnel J.P. y Benoit J.P. "Influence of average molecular weights of poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) copolymers 50/50 on phase separation and in vitro drug release from microspheres". *Pharm. Res.* 1990; 7 (9): 928-935.

- <sup>122</sup> Asano M., Fukuzaki H., Yoshida M., Kumakura M., Máximo T., Yuasa H., Imai K., Yamanaka H., Kawaharada U. y Suzuki K. "In vivo controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist from poly(DL-lactic acid) formulations of varying degradation pattern". *Int. J. Pharm.* 1991; 67: 67-77.
- <sup>123</sup> Merkli A., Heller J., Tabatabay C. y Gurny R. "Gamma sterilization of a semi-solid poly(ortho ester) designed for controlled drug delivery. Validation and radiation effects". *Pharm. Res.* 1994; 11 (10): 1485-1491.
- <sup>124</sup> Mehta R.C., Jeyanthi R., Calis S., Thanoo B.C., Burton K.W. y DeLuca P.P. "Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drugs". *J. Control. Rel.* 1994; 29: 375-384.
- <sup>125</sup> Yoshioka S., Aso Y., Otsuka T. y Kojima S. "The effect of  $\gamma$ -irradiation on drug release from poly(lactide) microspheres". *Radiat. Phys. Chem.* 1995; 46: 281-285.
- <sup>126</sup> Hausberger A.G., Kenley R.A. y DeLuca P.P. "Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles". *Pharm. Res.* 1995; 12: 233-242.
- <sup>127</sup> Sintzel M.B., Merkli A., Tabatabay C. y Gurny R. "Influence of irradiation sterilization on polymers used as drug carriers. A review". *Drug Dev. and Ind. Pharm.* 1997; 23 (9): 857-878.
- <sup>128</sup> Mohr D., Wolff M. y Kissel T. "Gamma irradiation for terminal sterilization of 17 $\beta$ -estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles". *J. Control. Rel.* 1999; 61: 203-217.
- <sup>129</sup> Herrero-Vanrell R., Ramirez L., Fernández-Carballido A. y Refojo M.F. "Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation Technique, in vitro release profiles, and sterilization process". *Pharm. Res.* 2000; 17 (10): 1323-1328.
- <sup>130</sup> Delgado A., Evora C. y Llabrés M. "Degradation of DL-PLA-methadone microspheres during in vitro release". *Int. J. Pharm.* 1996; 140: 219-227.
- <sup>131</sup> Wolford S.T., Schroer R.A., Gohs F.X., Gallo P.P., Brodeck M., Falk H.B. y Ruhren R. "Reference range data base for serum chemistry and haematology values in laboratory animals". *J. Toxicol. Environ. Health* 1986; 18(2): 161-88.

<sup>132</sup> Wolfensohn S. y Lloyd M. "Biological data". En: Handbook of laboratory animal management and welfare. Oxford University Press. New York. 1994; pág.120.

## **APÉNDICE I**

**C-0,4-a**

**a) Peso y temperatura**

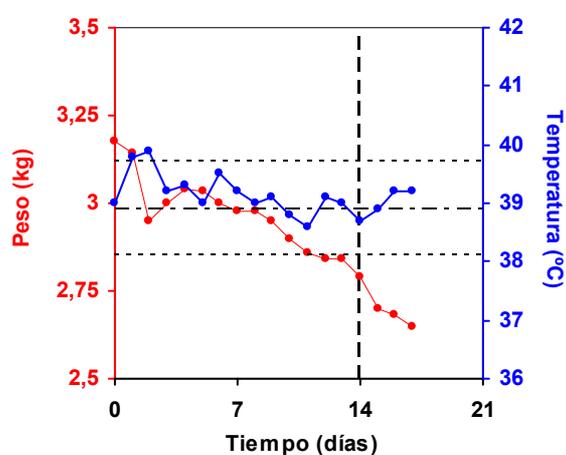


Figura I-1.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 17 d
Artritis	3	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	2	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: hematoma periarticular.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,71 \cdot 10^6$	$5,95 \cdot 10^6$	$6,87 \cdot 10^6$
Hto (%)	34,4	34,8	40,1
Hg (g/dL)	11,8	11,7	13,2
Leucocitos/ $\mu$ L	$4,9 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^3$
NE (%)	15	31,4	36,1
LY (%)	73	63,5	51,2
Plaquetas/ $\mu$ L	$454 \cdot 10^3$	$814 \cdot 10^3$	$837 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	96-192	24-48

## C-0,4-b

## a) Peso y temperatura

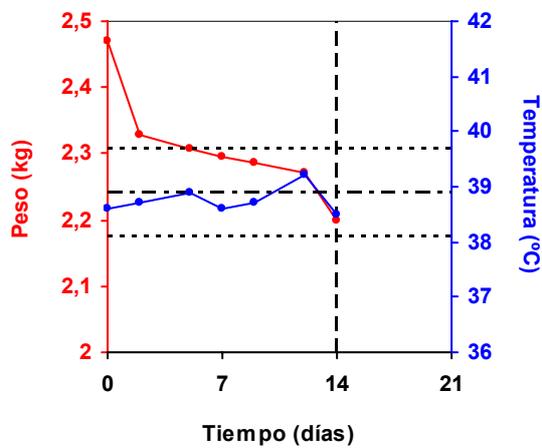


Figura I-2.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d
Artritis	3
Herida	0
Fístula	1
Supuración articular	3
Sinovitis	3
Afectación articular	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: exitus durante la segunda intervención.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d
Hemáties/ $\mu$ L	$6,02 \cdot 10^6$	$5,17 \cdot 10^6$	$5,87 \cdot 10^6$
Hto (%)	36,7	31	34,5
Hg (g/dL)	12,4	10,7	11,6
Leucocitos/ $\mu$ L	$3,9 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$
NE (%)	35,8	29,4	34,9
LY (%)	52,7	52,1	61
Plaquetas/ $\mu$ L	$582 \cdot 10^3$	$839 \cdot 10^3$	$835 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	12-24	96-192	96-192

**C-0,4-c**

**a) Peso y temperatura**

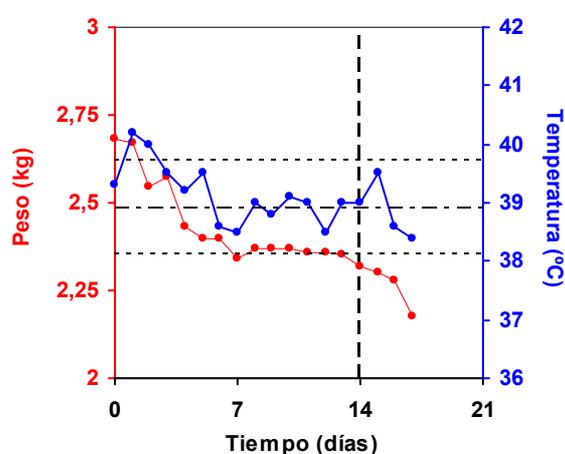


Figura I-3.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 17 d
Artritis	3	3
Herida	0	3
Fístula	0	0
Supuración articular	3	2
Sinovitis	2	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,13 \cdot 10^6$	$5,31 \cdot 10^6$	$5,33 \cdot 10^6$
Hto (%)	38,2	31,5	30,5
Hg (g/dL)	12,8	10,6	10,2
Leucocitos/ $\mu$ L	$9,2 \cdot 10^3$	$9,8 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$
NE (%)	27,5	43,1	39,9
LY (%)	66,2	42,7	39,9
Plaquetas/ $\mu$ L	$295 \cdot 10^3$	$1402 \cdot 10^3$	$1400 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	96-192

## C-0,4-d

## a) Peso y temperatura

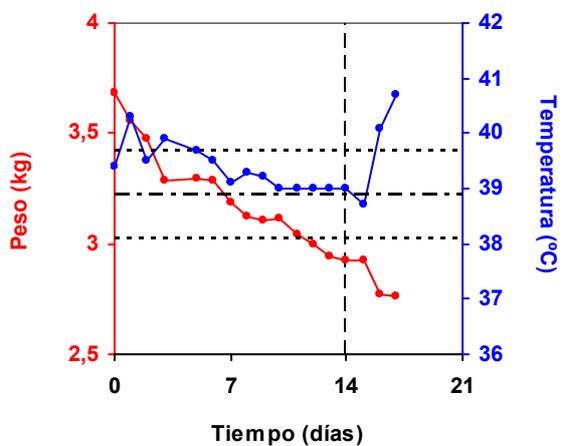


Figura I-4.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 17 d
Artritis	2	4
Herida	3	2
Fístula	0	3
Supuración articular	2	4
Sinovitis	1	3
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: supuración en partes blandas adyacentes a los 3 días de limpiar la zona intervenida.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d
Hematíes/ $\mu$ L	$8,17 \cdot 10^6$	$5,67 \cdot 10^6$	$5,69 \cdot 10^6$
Hto (%)	49,8	33,9	32,6
Hg(g/dL)	17,1	11,2	11
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,4 \cdot 10^3$	$10,1 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$
NE (%)	37,1	56,7	41,2
LY (%)	55,4	23,7	33,4
Plaquetas/ $\mu$ L	$415 \cdot 10^3$	$1066 \cdot 10^3$	$1010 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$

**C-1-a**

**a) Peso y temperatura**

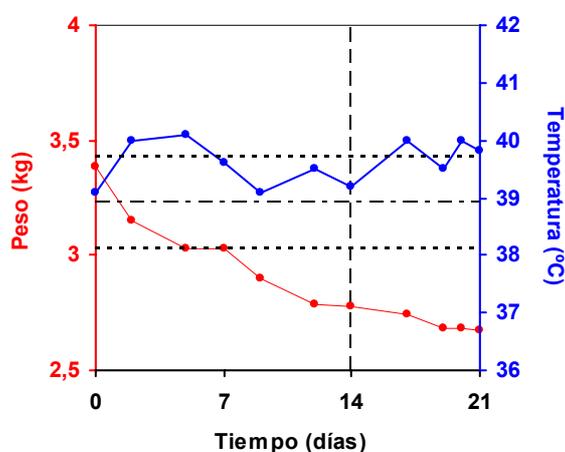


Figura I-5.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 21 d
Artritis	3	4
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	4
Sinovitis	3	4
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: al abrir el fémur a la semana de la 2ª intervención, se observa el canal medular edematizado, pálido, desestructurado.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,29 \cdot 10^6$	$6,08 \cdot 10^6$	$4,23 \cdot 10^6$	$4,76 \cdot 10^6$
Hto (%)	36,8	35,3	26,1	26,4
Hg (g/dL)	12,9	11,7	8,2	8,6
Leucocitos/ $\mu$ L	$7 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^3$	$9,3 \cdot 10^3$	$10 \cdot 10^3$
NE (%)	22,8	31,7	62	45,4
LY (%)	70,1	53,1	28,9	34,4
Plaquetas/ $\mu$ L	$489 \cdot 10^3$	$948 \cdot 10^3$	$1962 \cdot 10^3$	$1560 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

## C-1-b

## a) Peso y temperatura

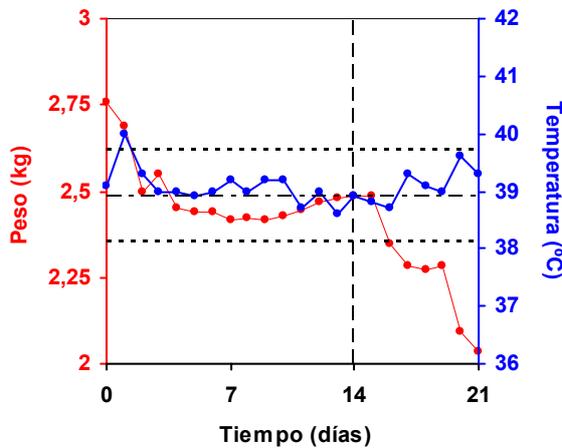


Figura I-6.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 21 d
Artritis	2	4
Herida	0	4
Fístula	0	3
Supuración articular	2	4
Sinovitis	2	4
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: a tiempo final (1 semana) se observa mal estado general, descenso importante de peso; supuración en tejidos adyacentes periarticulares y musculares; abundante pannus. Al abrir el hueso: canal medular pálido, edematizado y desestructurado.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu\text{L}$	$6,59 \cdot 10^6$	$6,24 \cdot 10^6$	$6,69 \cdot 10^6$	n.d.
Hto (%)	39,5	35,3	37,6	n.d.
Hg (g/dL)	13,2	12,2	12,6	n.d.
Leucocitos/ $\mu\text{L}$	$9 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^3$	n.d.
NE (%)	23,9	35	37,9	n.d.
LY (%)	70,6	52,1	54,1	n.d.
Plaquetas/ $\mu\text{L}$	$125 \cdot 10^3$	$1366 \cdot 10^3$	$857 \cdot 10^3$	n.d.
PCR (mg/l)	6 - 12	96-192	24-48	n.d.

**C-1-c**

**a) Peso y temperatura**

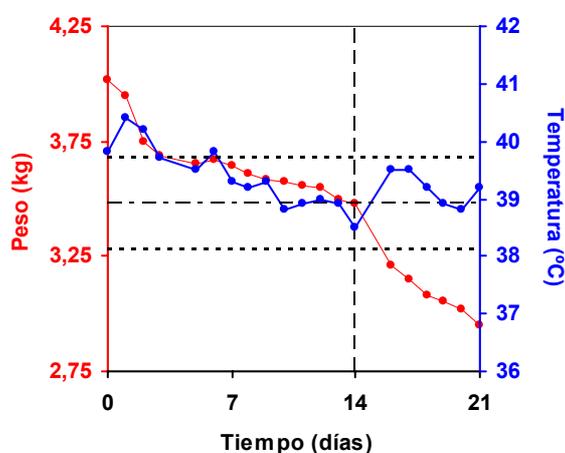


Figura I-7.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 21 d
Artritis	2	3
Herida	0	4
Fístula	0	3
Supuración articular	2	3
Sinovitis	2	3
Afectación articular	0	1

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: signos clínicos de osteomielitis en fémur, hueso osteoporótico.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,67 \cdot 10^6$	$5,49 \cdot 10^6$	$5,28 \cdot 10^6$	$4,93 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,7	33,5	31,1	27,6
Hg (g/dL)	12,3	11,5	10,3	9,1
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,2 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^3$	$10,5 \cdot 10^3$	$10,4 \cdot 10^3$
NE (%)	25,2	34,3	36,1	49,5
LY (%)	70,3	41,1	48,2	37,4
Plaquetas/ $\mu$ L	$441 \cdot 10^3$	$980 \cdot 10^3$	$1040 \cdot 10^3$	$1038 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

## C-2-a

## a) Peso y temperatura

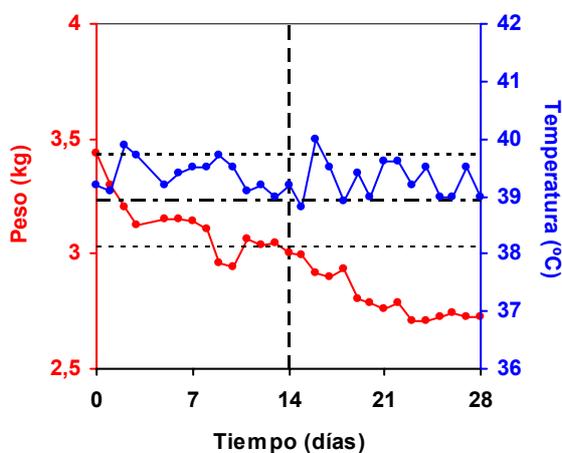


Figura I-8.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 28 d
Artritis	4	4
Herida	2	3
Fístula	0	4
Supuración articular	4	4
Sinovitis	3	4
Afectación articular	0	4

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: al extraer el hueso la zona distal esta destruida con abundante tejido de granulación, supurante, grave afectación articular; al abrir se aprecia gran cantidad de pus en canal medular.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hemáties/ $\mu$ L	$5,51 \cdot 10^6$	$4,97 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	n.d.	$4,11 \cdot 10^6$
Hto (%)	34	30,1	30,2	n.d.	22,1
Hg (g/dL)	11,8	10,3	10,3	n.d.	7,4
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,9 \cdot 10^3$	$24,5 \cdot 10^3$	$11,7 \cdot 10^3$	n.d.	$24,1 \cdot 10^3$
NE (%)	23,4	44,3	52,6	n.d.	70,2
LY (%)	67,4	34,5	30,6	n.d.	16,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$448 \cdot 10^3$	$1333 \cdot 10^3$	$1262 \cdot 10^3$	n.d.	$1048 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

**C-2-b**

**a) Peso y temperatura**

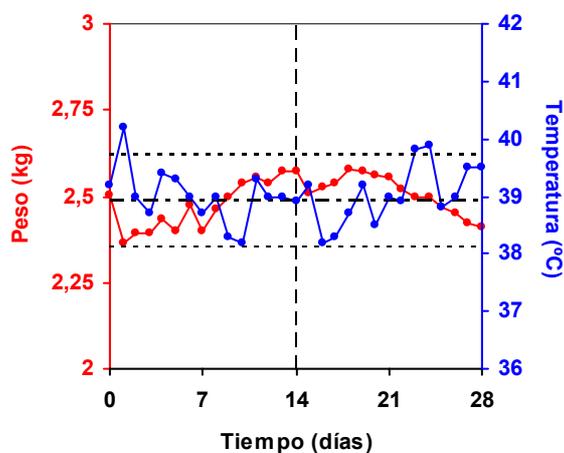


Figura I-9.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 28 d
Artritis	2	3
Herida	0	3
Fístula	0	2
Supuración articular	2	3
Sinovitis	2	0
Afectación articular	2	4

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: t=14 d: focos de osteocondritis en troclea femoral. A los 28 días se observa rigidez articular, movilidad de la pata anulada. Signos clínicos de afectación generalizada del conejo.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,78 \cdot 10^6$	$5,54 \cdot 10^6$	$5,84 \cdot 10^6$	$5,58 \cdot 10^6$	$4,83 \cdot 10^6$
Hto (%)	36,2	33,7	35	32,2	26,8
Hg (g/dL)	12	11,2	11,7	11,1	9
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,6 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^3$	$15,6 \cdot 10^3$
NE (%)	34,9	37,9	38,1	58,2	65,1
LY (%)	59,2	51,3	57,8	24,6	16,2
Plaquetas/ $\mu$ L	$188 \cdot 10^3$	$903 \cdot 10^3$	$592 \cdot 10^3$	$652 \cdot 10^3$	$1452 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6 - 12	24-48	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

## C-2-c

## a) Peso y temperatura

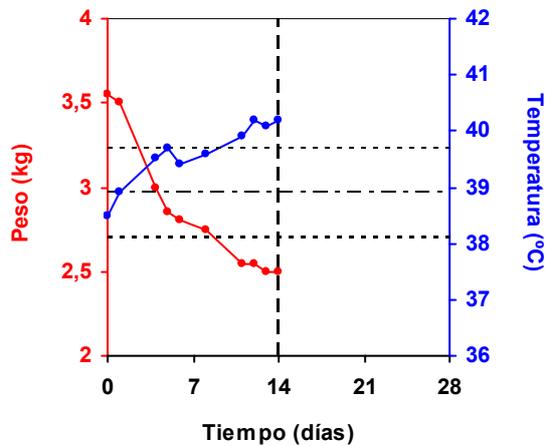


Figura I-10.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d
Artritis	4
Herida	4
Fístula	4
Supuración articular	4
Sinovitis	4
Afectación articular	3

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: infección de partes blandas extraarticulares, destrucción de la articulación, orificio de inoculación abierto, secreción de pus desde distintas zonas del fémur y tejidos adyacentes. En la cara posterior de la metafisis - diáfisis distal del fémur se observa salida de pus a través de un nuevo orificio. Exitus a las pocas horas de la 2ª intervención.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,44 \cdot 10^6$	n.d.	n.d.
Hto (%)	38,6	n.d.	n.d.
Hg (g/dL)	12,2	n.d.	n.d.
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,5 \cdot 10^3$	n.d.	n.d.
NE (%)	40,9	n.d.	n.d.
LY (%)	53,2	n.d.	n.d.
Plaquetas/ $\mu$ L	$556 \cdot 10^3$	n.d.	n.d.
PCR (mg/l)	< 6	n.d.	n.d.

**C-2-d**

**a) Peso y temperatura**

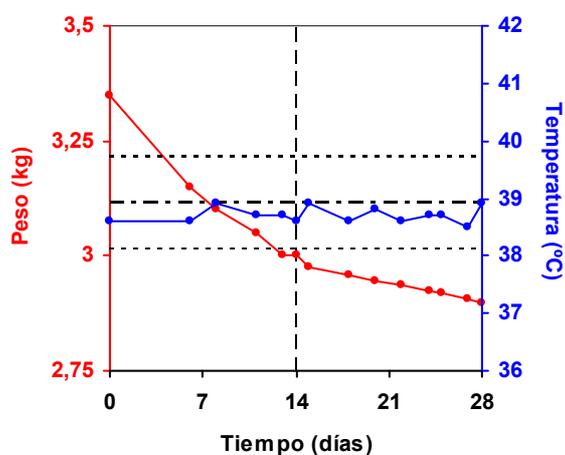


Figura I-11.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 28 d
Artritis	2	2
Herida	1	0
Fístula	0	1
Supuración articular	2	2
Sinovitis	1	2
Afectación articular	0	2

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,05 \cdot 10^6$	$5,93 \cdot 10^6$	$6,09 \cdot 10^6$	$6,16 \cdot 10^6$	$6,38 \cdot 10^6$
Hto (%)	37,8	36,2	37	36,9	38,7
Hg (g/dL)	12,6	12,2	12,6	12,5	12,7
Leucocitos/ $\mu$ L	$7 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$
NE (%)	20,8	33,5	37,7	29,2	28,6
LY (%)	72,2	54,3	54,4	65,9	67,2
Plaquetas/ $\mu$ L	$323 \cdot 10^3$	$914 \cdot 10^3$	$1702 \cdot 10^3$	$1608 \cdot 10^3$	$1537 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	48-96	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

## C-3-a

## a) Peso y temperatura

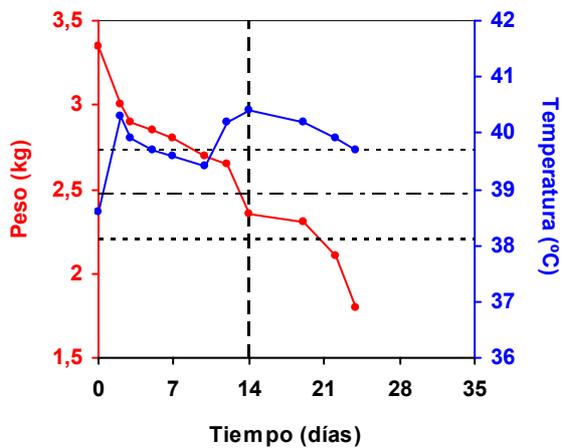


Figura I-12.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 25 d
Artritis	4	4
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	4	4
Sinovitis	3	4
Afectación articular	4	4

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: t = 14 d: mal estado general, pérdida de peso, inmovilidad de la articulación, calor local. Gran destrucción articular, gran supuración periarticular y pérdida de referencias anatómicas, con esfacelos. Exitus por septicemia, a los 11 días de la 2ª intervención.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,26 \cdot 10^6$	$5,48 \cdot 10^6$	$4,72 \cdot 10^6$	$2,91 \cdot 10^6$
Hto (%)	37,9	32,7	28	17,4
Hg (g/dL)	12,7	10,9	9,5	5,7
Leucocitos/ $\mu$ L	$9 \cdot 10^3$	$12,8 \cdot 10^3$	$16,6 \cdot 10^3$	$13,6 \cdot 10^3$
NE (%)	26,8	37,3	37,1	40,7
LY (%)	69,7	21,6	28	24,4
Plaquetas/ $\mu$ L	$529 \cdot 10^3$	$712 \cdot 10^3$	$1088 \cdot 10^3$	$1095 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**C-3-b**

**a) Peso y temperatura**

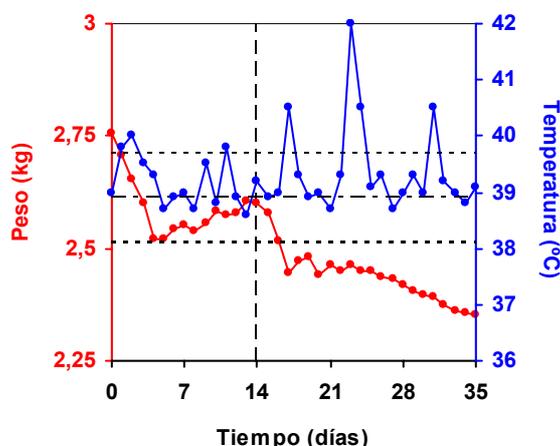


Figura I-13.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 35 d
Artritis	2	4
Herida	0	3
Fístula	0	4
Supuración articular	2	4
Sinovitis	2	4
Afectación articular	0	3

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: a tiempo final (35 días) presenta dos fístulas, una en la herida quirúrgica y otra en la región pretibial. Articulación femoral muy afectada.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,06 \cdot 10^6$	$5,77 \cdot 10^6$	$4,29 \cdot 10^6$	$4,77 \cdot 10^6$	$4,96 \cdot 10^6$
Hto (%)	36,9	33,7	23	24,4	24,1
Hg (g/dL)	12,3	11,1	7,8	8	7,8
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,6 \cdot 10^3$	$12,9 \cdot 10^3$	$33,4 \cdot 10^3$	$38,2 \cdot 10^3$	$33,8 \cdot 10^3$
NE (%)	28,9	43,5	60,8	67,8	66,1
LY (%)	64,4	30,1	14,5	10,2	6,9
Plaquetas/ $\mu$ L	$243 \cdot 10^3$	$1470 \cdot 10^3$	$1060 \cdot 10^3$	$1596 \cdot 10^3$	$1616 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

(Datos correspondientes a 7 días pos-inoculación, no disponibles)

## C-3-c

## a) Peso y temperatura

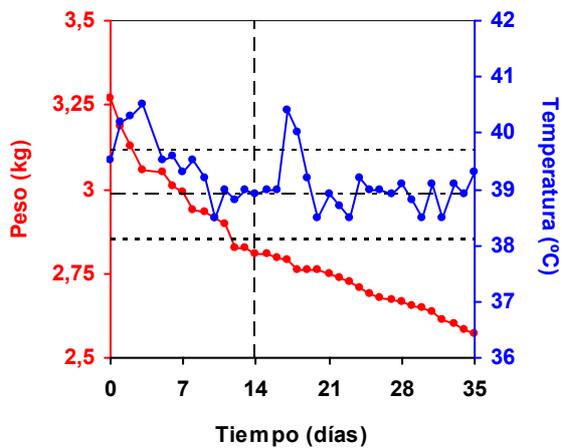


Figura I-14.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 35 d
Artritis	3	3
Herida	2	3
Fístula	2	3
Supuración articular	3	3
Sinovitis	2	3
Afectación articular	0	4

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: a tiempo final (35 d) se observa al extraer el hueso, pus acumulado en tendón rotuliano, calcificaciones paraarticulares y fístula en la cara posterior del fémur a nivel de la cresta zona metafisaria.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hematíes/ $\mu$ L	$4,89 \cdot 10^6$	$5,75 \cdot 10^6$	$6,03 \cdot 10^6$	$5,31 \cdot 10^6$	$5,85 \cdot 10^6$	$6,39 \cdot 10^6$
Hto (%)	34	33,7	33,9	28,2	30,6	34,3
Hg (g/dL)	13,2	11,3	11,2	9,2	10,2	11,5
Leucocitosd/ $\mu$ L	$9 \cdot 10^3$	$13 \cdot 10^3$	$12,7 \cdot 10^3$	$21,2 \cdot 10^3$	$15,3 \cdot 10^3$	$12,7 \cdot 10^3$
NE (%)	54,8	55,1	55,1	67,2	58,7	59,3
LY (%)	31,3	28,2	33,3	21,6	34,2	38,6
Plaquetas/ $\mu$ L	$453 \cdot 10^3$	$1704 \cdot 10^3$	$996 \cdot 10^3$	$1336 \cdot 10^3$	$1058 \cdot 10^3$	$830 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$	96-192	48-96

**C-4-a**

**a) Peso y temperatura**

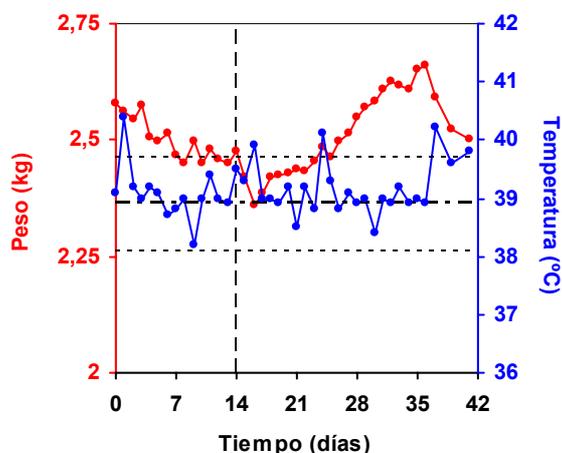


Figura I-15.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 42 d
Artritis	3	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	1
Sinovitis	2	1
Afectación articular	0	3

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: t = 42 días: rigidez articular. Tras un periodo de mala evolución clínica se produce una mejoría hasta la aparente resolución espontánea del proceso. Aumento del líquido sinovial.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponibles)**

	basal (T=0)	T = 14 d	T = 28 d	T = 35 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,5 \cdot 10^6$	n.d.	$5,64 \cdot 10^6$	$5,03 \cdot 10^6$	$4,51 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,1	n.d.	30,5	26,8	23,1
Hg (g/dL)	11,6	n.d.	10,2	8,9	7,6
Leucocitos/ $\mu$ L	$5 \cdot 10^3$	n.d.	$6,5 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^3$	$10,7 \cdot 10^3$
NE (%)	19,1	n.d.	50,4	60,9	56,2
LY (%)	75,1	n.d.	41,7	26,8	27,8
Plaquetas/ $\mu$ L	$127 \cdot 10^3$	n.d.	$1152 \cdot 10^3$	$1130 \cdot 10^3$	$1280 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	48-96	96-192	96-192	96-192

(Datos correspondientes a 7 y 21 días, no disponibles)

## C-4-b

## a) Peso y temperatura

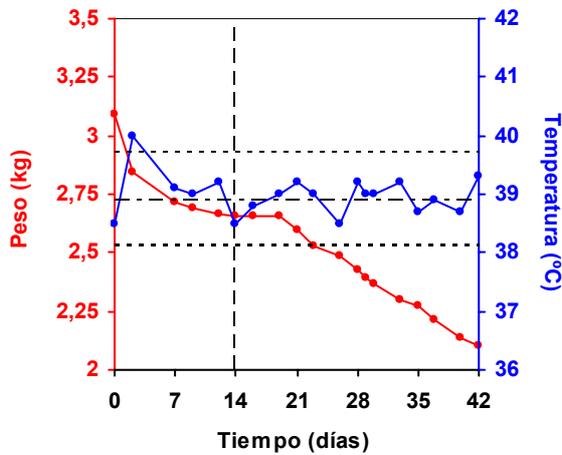


Figura I-16.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 42 d
Artritis	3	1
Herida	0	1
Fístula	0	2
Supuración articular	3	3
Sinovitis	3	2
Afectación articular	0	3

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: mala evolución clínica con fístula y elevada supuración de pus. Aumento de líquido sinovial.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu\text{L}$	$6,44 \cdot 10^6$	$5,65 \cdot 10^6$	$5,99 \cdot 10^6$	$5,81 \cdot 10^6$	$6,03 \cdot 10^6$
Hto (%)	38,3	32,9	34,1	32	33,4
Hg (g/dL)	13	11,4	11,6	10,9	11,2
Leucocitos/ $\mu\text{L}$	$7,2 \cdot 10^3$	$10,3 \cdot 10^3$	$8,7 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^3$	$11,1 \cdot 10^3$
NE (%)	24,2	40,4	41,8	39,2	36,4
LY (%)	66,2	35,4	42,8	50,7	46,7
PLaquetas/ $\mu\text{L}$	$541 \cdot 10^3$	$1180 \cdot 10^3$	$1320 \cdot 10^3$	$844 \cdot 10^3$	$1115 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	96-192	$\geq 192$

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,43 \cdot 10^6$	$5,97 \cdot 10^6$
Hto (%)	34,3	33,2
Hg (g/dL)	11,6	11,2
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,5 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^3$
NE (%)	32,7	32,9
LY (%)	52	60,5
Plaquetas/ $\mu$ L	$885 \cdot 10^3$	$1560 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	48-96	$\geq 192$

## C-4-c

## a) Peso y temperatura

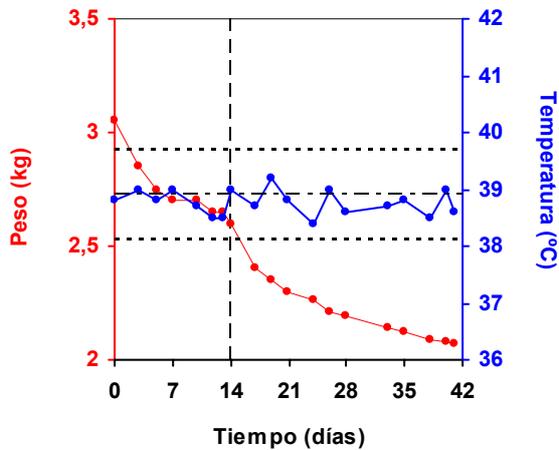


Figura I-17.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 42 d
Artritis	3	3
Herida	0	1
Fístula	0	2
Supuración articular	2	2
Sinovitis	2	3
Afectación articular	0	3

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: a tiempo final presenta una fístula en herida quirúrgica con supuración y articulación femoral muy afectada. Aumento de líquido sinovial.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$7,09 \cdot 10^6$	$6,14 \cdot 10^6$	$6,66 \cdot 10^6$	$6,47 \cdot 10^6$	$6,38 \cdot 10^6$
Hto (%)	42,4	36,2	38,8	37,1	35,8
Hg (g/dL)	14,5	12,3	13,1	12,7	12
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,8 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$
NE (%)	13,7	32,7	28	28,1	30,3
LY (%)	79,3	44,9	53,5	60,3	53,6
Plaquetas/ $\mu$ L	$423 \cdot 10^3$	$1134 \cdot 10^3$	$972 \cdot 10^3$	$814 \cdot 10^3$	$1144 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,82 \cdot 10^6$	$7,11 \cdot 10^6$
Hto (%)	38,3	39,8
Hg (g/dL)	13	13,3
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,7 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^3$
NE (%)	30	37,9
LY (%)	57,4	54,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$828 \cdot 10^3$	$1420 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	n.d.	n.d.

## C-6-a

## a) Peso y temperatura

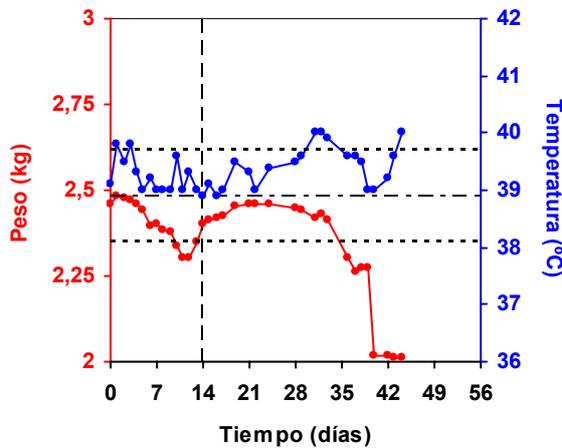


Figura I-18.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 44 d
Artritis	3	4
Herida	1	0
Fístula	1	0
Supuración articular	3	4
Sinovitis	3	4
Afectación articular	0	4

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: mala evolución clínica, precisó sueroterapia. Exitus a los 30 días de la 2ª intervención.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,05 \cdot 10^6$	$5,91 \cdot 10^6$	$6,56 \cdot 10^6$	$4,84 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,8	33,7	36,9	23,7
Hg (g/dL)	12,5	11,4	12,2	8,1
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,3 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^3$	$27,5 \cdot 10^3$
NE (%)	18	30,5	35,8	64,2
LY (%)	72	39,4	58,5	8,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$368 \cdot 10^3$	$1300 \cdot 10^3$	$1402 \cdot 10^3$	$1300 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

(Datos correspondientes a 21, 28 y 35 días, no disponibles)

**C-6-b**

**a) Peso y temperatura**

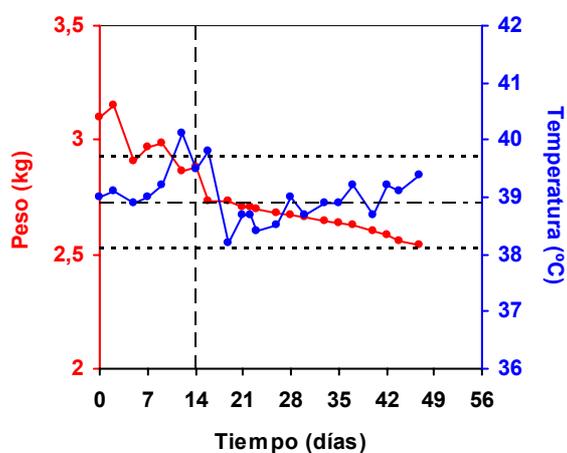


Figura I-19.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 47 d
Artritis	2	2
Herida	0	0
Fístula	0	1
Supuración articular	3	3
Sinovitis	3	3
Afectación articular	0	4

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: mal estado general con aumento de líquido sinovial y gran afectación articular. Se sacrifica a los 33 días de la 2ª intervención.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,4 \cdot 10^6$	$5,97 \cdot 10^6$	$7,27 \cdot 10^6$	$6,06 \cdot 10^6$	$6,21 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,6	32,5	38,6	30,9	30,7
Hg (g/dL)	12,6	11,3	13,7	10,6	10,1
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,3 \cdot 10^3$	$11,1 \cdot 10^3$	$11 \cdot 10^3$	$11,6 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^3$
NE (%)	22,9	33,7	32,5	34,1	33,6
LY (%)	70	39,6	44,8	43	39,1
Plaquetas/ $\mu$ L	$311 \cdot 10^3$	$1342 \cdot 10^3$	$908 \cdot 10^3$	$1135 \cdot 10^3$	$1230 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,19 \cdot 10^6$	$6,55 \cdot 10^6$
Hto (%)	30,7	32,7
Hg (g/dL)	10,4	10,9
Leucocitos/ $\mu$ L	$10,4 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^3$
NE (%)	34,4	49,2
LY (%)	43,4	33,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$951 \cdot 10^3$	$1438 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	$\geq 192$	$\geq 192$

**C-6-c**

**a) Peso y temperatura**

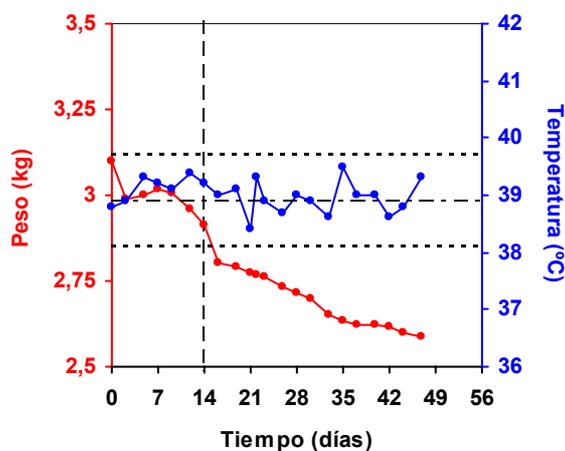


Figura I-20.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 47 d
Artritis	2	2
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	2	4
Sinovitis	2	3
Afectación articular	0	3

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: mala evolución clínica; precisó sueroterapia. Exitus a los 33 días de la 2ª intervención. Al abrir destaca aumento del líquido sinovial y gran deterioro articular con elevada supuración.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,36 \cdot 10^6$	$5,24 \cdot 10^6$	$6,06 \cdot 10^6$	$5,33 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$
Hto (%)	32,9	29,7	33,7	28,2	27,8
Hg (g/dL)	11,6	10,2	11,7	9,3	9,2
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,6 \cdot 10^3$	$12,8 \cdot 10^3$	$11,5 \cdot 10^3$	$19,9 \cdot 10^3$	$12 \cdot 10^3$
NE (%)	19	33	29,8	38,7	35,4
LY (%)	75	40,9	52	40,9	44
Plaquetas/ $\mu$ L	$592 \cdot 10^3$	$929 \cdot 10^3$	$1288 \cdot 10^3$	$1354 \cdot 10^3$	$1442 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,65 \cdot 10^6$	$5,83 \cdot 10^6$
Hto (%)	28,4	28,9
Hg (g/dL)	9,4	9,6
Leucocitos/ $\mu$ L	$11,6 \cdot 10^3$	$11,9 \cdot 10^3$
NE (%)	38,3	37,4
LY (%)	48,2	42,5
Plaquetas/ $\mu$ L	$999 \cdot 10^3$	$1200 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	$\geq 192$	$\geq 192$

## **APÉNDICE II**

**CFX-0,4-a**

**a) Peso y temperatura**

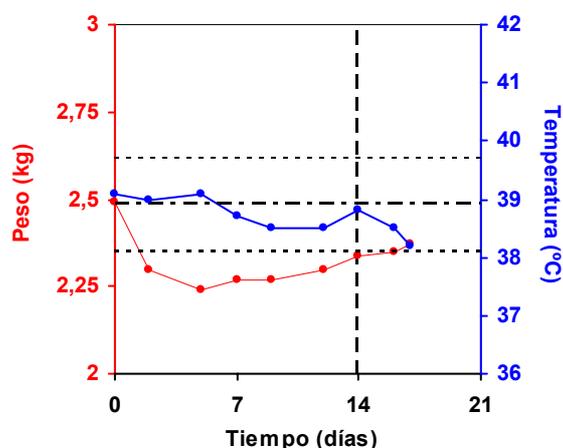


Figura II-1.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 17 d
Artritis	1	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	1	1
Sinovitis	1	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T= 0)	T = 7 d	T = 14 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,47 \cdot 10^6$	$5,84 \cdot 10^6$	$6,98 \cdot 10^6$
Hto (%)	38,8	34	39,1
Hg (g/dL)	12,8	11,7	13
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,4 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$
NE (%)	32,2	48,4	48,6
LY (%)	61,1	50,0	48,1
Plaquetas/ $\mu$ L	$770 \cdot 10^3$	$1200 \cdot 10^3$	$924 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	12-24	$\geq 192$	96-192

## CFX-0,4-b

## a) Peso y temperatura

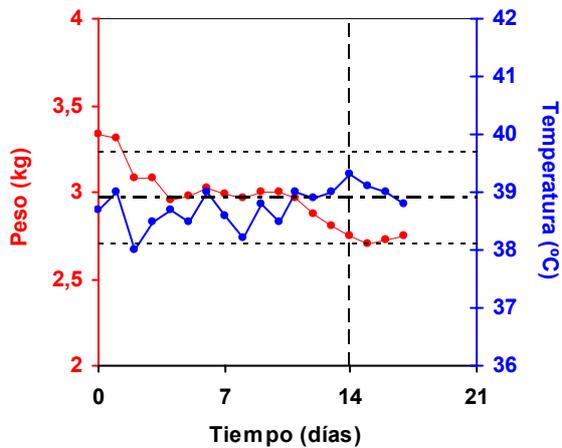


Figura II-2.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 17 d
Artritis	3	1
Herida	3	0
Fístula	3	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T= 0)	T = 7 d	T = 14 d
Hematíes/ $\mu$ L	n.d.	$5,33 \cdot 10^6$	$5,55 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d.	31,6	32,1
Hg (g/dL)	n.d.	10,8	10,8
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	$10,5 \cdot 10^3$	$8,3 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	42,8	35
LY (%)	n.d.	39,8	48
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d.	$1160 \cdot 10^3$	$990 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	$\geq 192$	$\geq 192$

**CFX-0,4-c**

**a) Peso y temperatura**

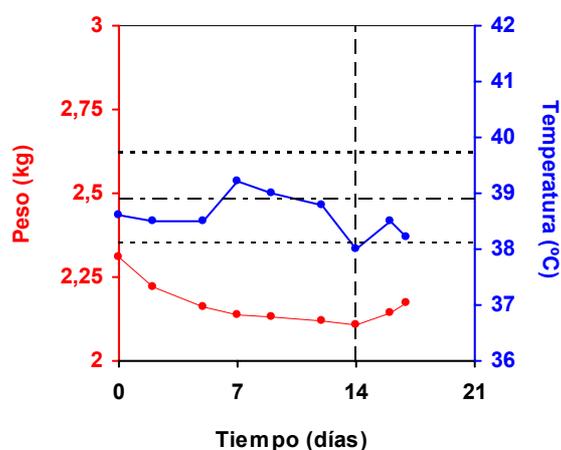


Figura II-3.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 17 d
Artritis	3	1
Herida	1	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: falsa vía en cara posterior del fémur.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,03 \cdot 10^6$	n.d.	$6,46 \cdot 10^6$
Hto (%)	37,1	n.d.	36,8
Hg (g/dL)	12,8	n.d.	12,2
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,0 \cdot 10^3$	n.d.	$8,4 \cdot 10^3$
NE (%)	37,4	n.d.	42
LY (%)	55	n.d.	36,6
Plaquetas/ $\mu$ L	$575 \cdot 10^3$	n.d.	$1044 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	n.d.	48-96

## CFX-0,4-RxH

## a) Peso y temperatura

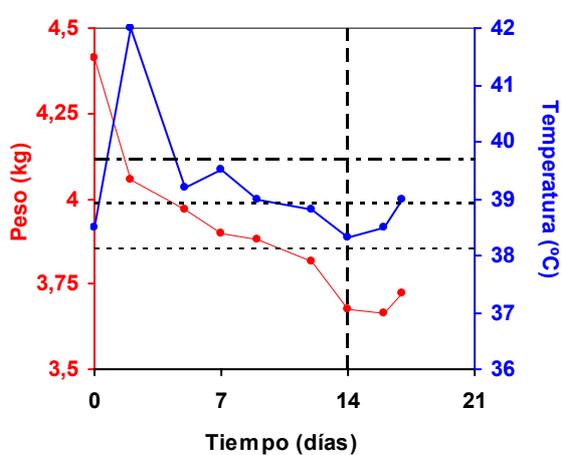


Figura II-4.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 17 d
Artritis	3	1
Herida	1	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: hematoma periarticular.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d
Hemáties/ $\mu$ L	$6,15 \cdot 10^6$	$5,18 \cdot 10^6$	$5,61 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,1	29,9	31,61
Hg (g/dL)	11,9	10,3	10,5
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,7 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^3$
NE (%)	27,9	34,4	36,6
LY (%)	66,9	52,4	49,5
Plaquetas/ $\mu$ L	$540 \cdot 10^3$	$1210 \cdot 10^3$	$1358 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	$\geq 192$	$\geq 192$

**CFX-1-a**

**a) Peso y temperatura**

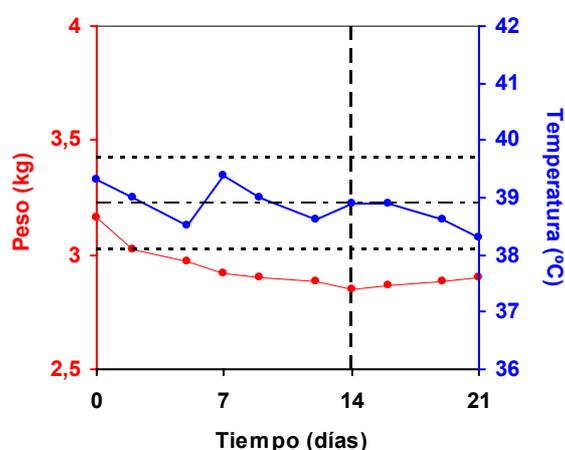


Figura II-5.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 21 d
Artritis	3	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,11 \cdot 10^6$	$6,27 \cdot 10^6$	$6,43 \cdot 10^6$	$5,86 \cdot 10^6$
Hto (%)	34,9	34,8	36,1	31,9
Hg (g/dL)	12	11,5	12,3	10,7
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,3 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^3$
NE (%)	29,6	33,4	32,3	42,4
LY (%)	66,8	47,7	55,7	45,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$355 \cdot 10^3$	$778 \cdot 10^3$	$833 \cdot 10^3$	$724 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	96-192	24-48	6-12

## CFX-1-b

## a) Peso y temperatura

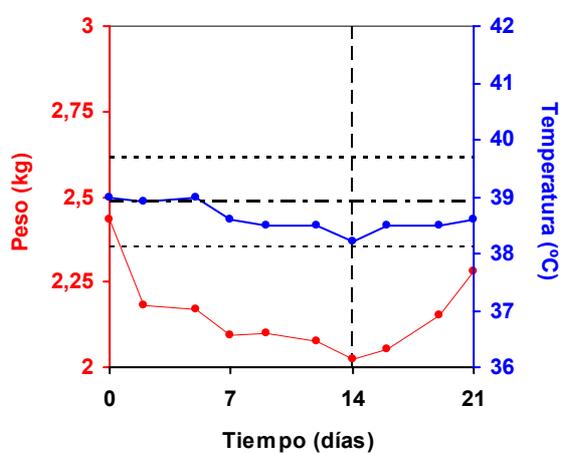


Figura II-6.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 21d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu\text{L}$	$5,56 \cdot 10^6$	$4,83 \cdot 10^6$	$5,84 \cdot 10^6$	$5,35 \cdot 10^6$
Hto (%)	33,8	28,9	33,3	29,8
Hg (g/dL)	11,4	9,7	10,9	10,0
Leucocitos/ $\mu\text{L}$	$4,2 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	40,3	48,5	37,0
LY (%)	n.d.	33,5	37,8	52,5
Plaquetas/ $\mu\text{L}$	$421 \cdot 10^3$	$1010 \cdot 10^3$	$918 \cdot 10^3$	$653 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	96-192	12-24	12-24

**CFX-1-c**

**a) Peso y temperatura**

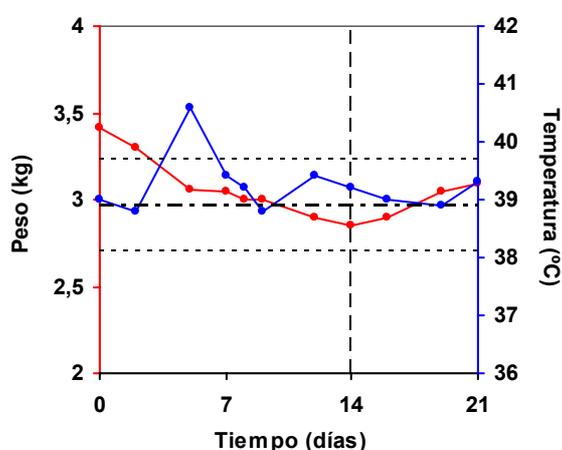


Figura II-7.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 21 d
Artritis	3	0
Herida	0	4
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	2	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: herida abierta por dehiscencia de sutura. Líquido sinovial.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,39 \cdot 10^6$	$5,70 \cdot 10^6$	$5,72 \cdot 10^6$	$5,51 \cdot 10^6$
Hto (%)	39,4	34,3	34,3	34,1
Hg (g/dL)	13,7	11,6	11,6	12,2
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,8 \cdot 10^3$	$11,6 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^3$	$9,9 \cdot 10^3$
NE (%)	20,9	45,6	29,1	38,6
LY (%)	75,1	37,3	61	44,6
Plaquetas/ $\mu$ L	$561 \cdot 10^3$	$1082 \cdot 10^3$	$1420 \cdot 10^3$	$1092 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	$\geq 192$	$\geq 192$	48-96

## CFX-1-RxH

## a) Peso y temperatura

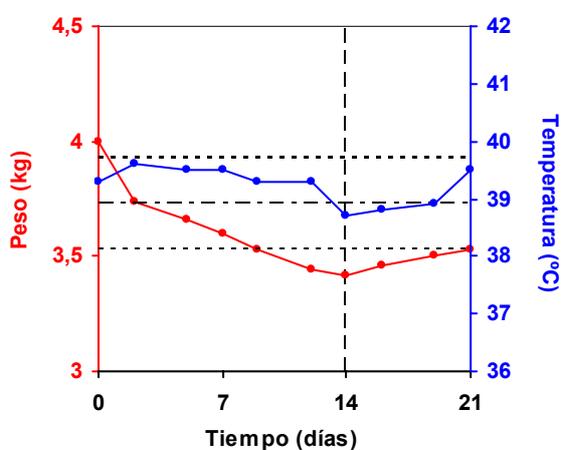


Figura II-8.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 21 d
Artritis	4	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	4	0
Sinovitis	3	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,24 \cdot 10^6$	$5,98 \cdot 10^6$	$5,95 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$
Hto (%)	38,9	36,1	34,7	40,1
Hg (g/dL)	13,3	12,6	11,8	14,4
Leucocitos/ $\mu$ L	$9,3 \cdot 10^3$	$10,7 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^3$
NE (%)	23,6	46,4	50,8	48,5
LY (%)	67,7	36,1	35	40,6
Plaquetas/ $\mu$ L	$379 \cdot 10^3$	$1212 \cdot 10^3$	$1080 \cdot 10^3$	$328 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	96-192	48-96

**CFX-2-a**

**a) Peso y temperatura**

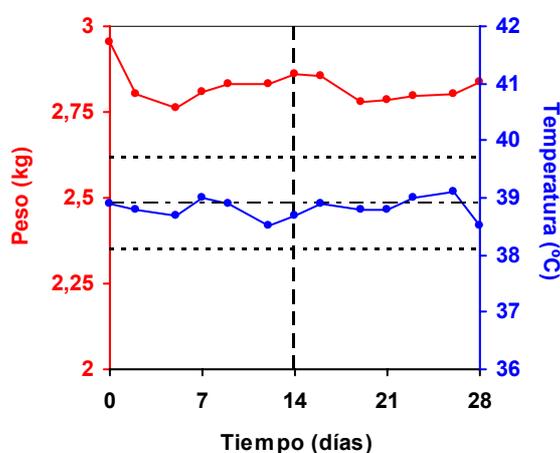


Figura II-9.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 28 d
Artritis	1	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	1	0
Sinovitis	1	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: fractura en fémur no consolidada a las 2 semanas.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,25 \cdot 10^6$	$5,66 \cdot 10^6$	$5,83 \cdot 10^6$	$5,23 \cdot 10^6$	$5,90 \cdot 10^6$
Hto (%)	38,9	34,5	35,5	30,5	34,7
Hg (g/dL)	13,4	11,7	12,4	10,5	11,4
Leucocitos/ $\mu$ L	$4,0 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^3$	$9,9 \cdot 10^3$	$6,3 \cdot 10^3$
NE (%)	50,4	37,9	44,4	48,5	64,3
LY (%)	46,8	46,1	50	32,7	33,5
Plaquetas/ $\mu$ L	$364 \cdot 10^3$	$632 \cdot 10^3$	$880 \cdot 10^3$	$951 \cdot 10^3$	$945 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	96-192	24-48	96-192	24-48

## CFX-2-b

## a) Peso y temperatura

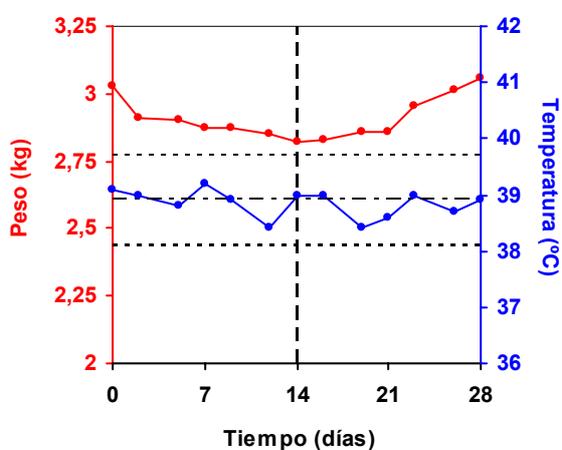


Figura II-10.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 28 d
Artritis	3	1
Herida	2	0
Fístula	2	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu\text{L}$	$6,41 \cdot 10^6$	$6,32 \cdot 10^6$	n.d.	$6,27 \cdot 10^6$	$7,04 \cdot 10^6$
Hto (%)	37,5	36,8	n.d.	34,4	38,6
Hg (g/dL)	13,2	12,1	n.d.	11,4	12,8
Leucocitos/ $\mu\text{L}$	$8,5 \cdot 10^3$	$10,9 \cdot 10^3$	n.d.	$6,9 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$
NE (%)	39,2	33,3	n.d.	36,6	55,5
LY (%)	55,6	44,6	n.d.	47,8	34,6
Plaquetas/ $\mu\text{L}$	$501 \cdot 10^3$	$1040 \cdot 10^3$	n.d.	$555 \cdot 10^3$	$530 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	96-192	n.d.	n.d.	n.d.

**CFX-2-c**

**a) Peso y temperatura**

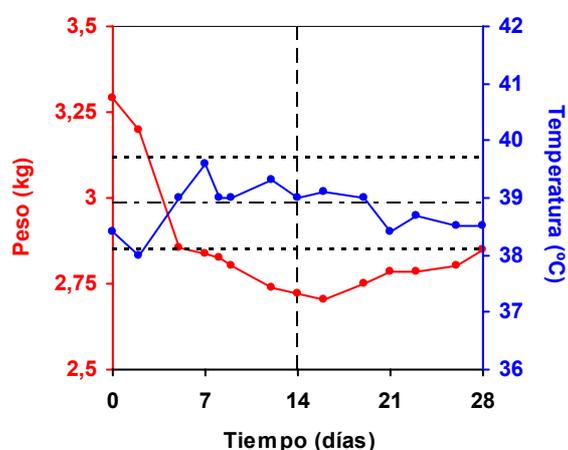


Figura II-11.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 28 d
Artritis	2	1
Herida	0	2
Fístula	0	1
Supuración articular	3	0
Sinovitis	2	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: Herida con evolución tórpida.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,81 \cdot 10^6$	$5,74 \cdot 10^6$	$6,14 \cdot 10^6$	n.d.	$6,68 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,2	33,8	33,7	n.d.	35,9
Hg (g/dL)	12	11,6	11	n.d.	13,4
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,7 \cdot 10^3$	$10,8 \cdot 10^3$	$8,9 \cdot 10^3$	n.d.	$6,4 \cdot 10^3$
NE (%)	25,4	55,7	51,4	n.d.	54,9
LY (%)	71	25,3	33	n.d.	32,7
Plaquetas/ $\mu$ L	$438 \cdot 10^3$	$1020 \cdot 10^3$	$1086 \cdot 10^3$	n.d.	$974 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	96-192	n.d.	96-192

## CFX-2-RxH

## a) Peso y temperatura

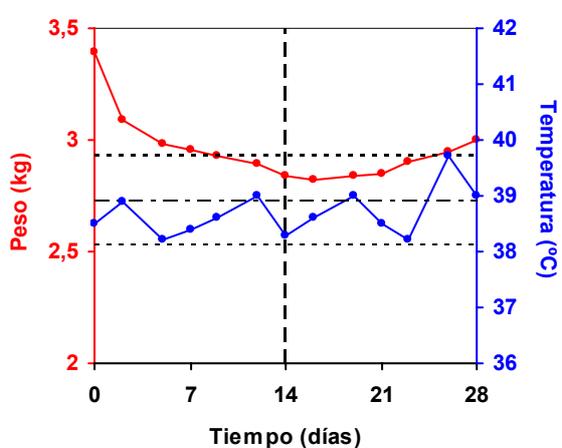


Figura II-12.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 28 d
Artritis	4	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	4	0
Sinovitis	4	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,87 \cdot 10^6$	n.d.	$6,17 \cdot 10^6$	n.d.	$6,43 \cdot 10^6$
Hto (%)	40,4	n.d.	34,8	n.d.	33,9
Hg (g/dL)	13,9	n.d.	11,8	n.d.	11,5
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,2 \cdot 10^3$	n.d.	$9,1 \cdot 10^3$	n.d.	$9,2 \cdot 10^3$
NE (%)	24	n.d.	47,7	n.d.	35,5
LY (%)	67,8	n.d.	31,6	n.d.	52,2
Plaquetas/ $\mu$ L	$416 \cdot 10^3$	n.d.	$868 \cdot 10^3$	n.d.	$340 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	n.d.	$\geq 192$	n.d.	48-96

**CFX-3-a**

**a) Peso y temperatura**

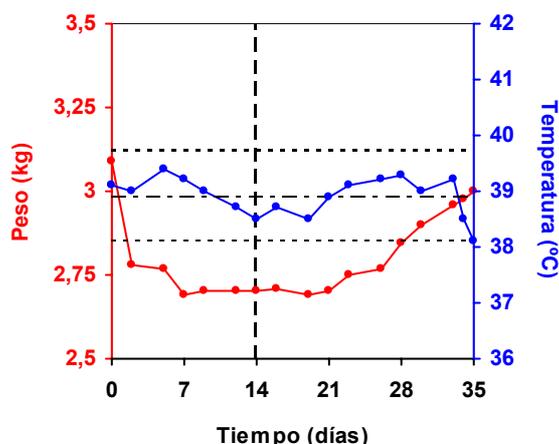


Figura II-13.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 35 d
Artritis	2	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	2	0
Sinovitis	1	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: al abrir el hueso se observa en ambos extremos del implante formación de hueso trabecular; alrededor del implante se aprecia engrosamiento de la cortical, médula normal, salvo una zona de osteolisis en el extremo distal del implante, con pequeña cantidad de líquido que sale por el orificio de implantación.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21d	T = 28 d	T = 35 d
Hemáties/ $\mu$ L	$6,28 \cdot 10^6$	$5,85 \cdot 10^6$	$6,02 \cdot 10^6$	$6,01 \cdot 10^6$	$6,57 \cdot 10^6$	$6,69 \cdot 10^6$
Hto (%)	38	33,8	34,2	32,5	35,4	40,3
Hg (g/dL)	13,3	11,3	11,8	10,8	11,5	13,5
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,5 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^3$
NE (%)	31,6	40,2	38,9	45,3	54	32
LY (%)	57,7	31,6	42,1	38,8	26,5	64,5
Plaquetas/ $\mu$ L	$200 \cdot 10^3$	$1394 \cdot 10^3$	$838 \cdot 10^3$	$905 \cdot 10^3$	$631 \cdot 10^3$	$410 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	48-96	48-96	6-12	6-12

## CFX-3-b

## a) Peso y temperatura

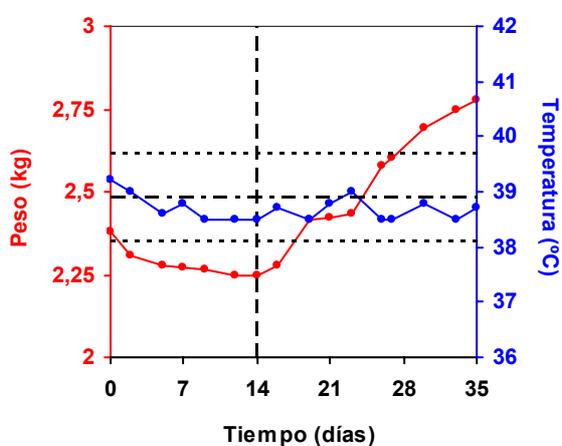


Figura II-14.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 35 d
Artritis	2	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	2	0
Sinovitis	2	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,71 \cdot 10^6$	$4,97 \cdot 10^6$	$6,08 \cdot 10^6$	n.d.	$5,76 \cdot 10^6$	n.d.
Hto (%)	33,6	29,3	35,6	n.d.	33	n.d.
Hg (g/dL)	11,4	9,9	11,6	n.d.	11,4	n.d.
Leucocitos/ $\mu$ L	$7 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^3$	n.d.	$8,1 \cdot 10^3$	n.d.
NE (%)	36,3	52	42,4	n.d.	45	n.d.
LY (%)	60,1	37,6	54,9	n.d.	47,5	n.d.
Plaquetas/ $\mu$ L	$559 \cdot 10^3$	$1022 \cdot 10^3$	$705 \cdot 10^3$	n.d.	$691 \cdot 10^3$	n.d.
PCR (mg/l)	< 6	96-192	24-48	12-24	6-12	< 6

**CFX-3-c**

**a) Peso y temperatura**

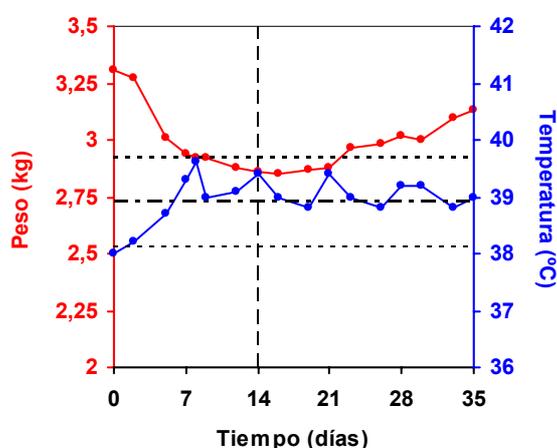


Figura II-15.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 35 d
Artritis	2	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	2	0
Sinovitis	2	0
Afectación articular	1	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,11 \cdot 10^6$	$5,11 \cdot 10^6$	$5,28 \cdot 10^6$	$5,25 \cdot 10^6$	$6,05 \cdot 10^6$	$5,68 \cdot 10^6$
Hto (%)	37	31	30,5	29,9	33,3	31
Hg (g/dL)	12,5	10,6	10,5	10	10,9	10,8
Leucocitos/ $\mu$ L	$4,1 \cdot 10^3$	$16 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^3$
NE (%)	23,8	29,6	43,1	40	41,6	37,6
LY (%)	70,5	57,9	35,7	36	36,7	48,9
Plaquetas/ $\mu$ L	$306 \cdot 10^3$	$1045 \cdot 10^3$	$1200 \cdot 10^3$	$909 \cdot 10^3$	$905 \cdot 10^3$	$437 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$	24-48	12-24

## CFX-3-RxH

## a) Peso y temperatura

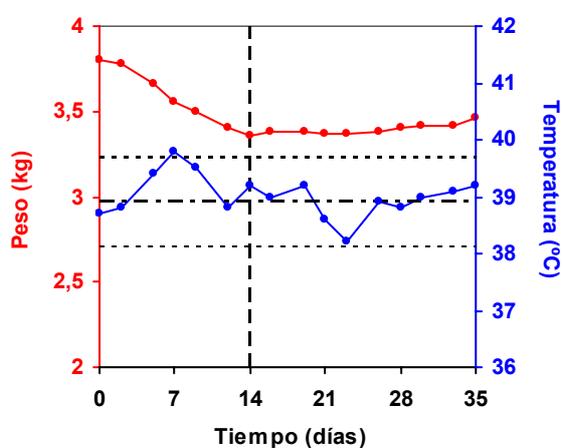


Figura II-16.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 35 d
Artritis	4	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	4	0
Sinovitis	4	1
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hematíes/ $\mu\text{L}$	$5,93 \cdot 10^6$	$5,11 \cdot 10^6$	$5,70 \cdot 10^6$	$5,46 \cdot 10^6$	$6,53 \cdot 10^6$	$6,40 \cdot 10^6$
Hto (%)	36,4	30,9	33,3	30,7	35,3	33,5
Hg (g/dL)	12,5	10,8	10,8	10,2	11,4	11,3
Leucocitos/ $\mu\text{L}$	$6,7 \cdot 10^3$	$8,7 \cdot 10^3$	$16,4 \cdot 10^3$	$12,3 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^3$
NE (%)	21,3	25,7	43,1	41,3	36,3	42,4
LY (%)	74,6	47,6	31,4	43,4	55,1	46,4
Plaquetas/ $\mu\text{L}$	$288 \cdot 10^3$	$1074 \cdot 10^3$	$1120 \cdot 10^3$	$752 \cdot 10^3$	$125 \cdot 10^3$	$667 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	12-24	$\geq 192$	$\geq 192$	96-192	96-192	48-96

**CFX-4-a**

**a) Peso y temperatura**

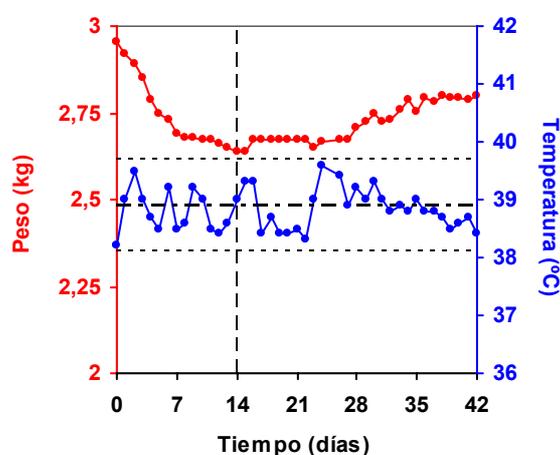


Figura II-17.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 42 d
Artritis	3	1
Herida	0	0
Fístula	0	1
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	2

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: absceso subcutáneo con fístula a las 4 semanas.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	n.d.	$5,85 \cdot 10^6$	n.d.	$5,26 \cdot 10^6$	$7,30 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d.	34	n.d.	34,9	40,6
Hg (g/dL)	n.d.	11	n.d.	12,1	14,4
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	$13 \cdot 10^3$	n.d.	n.d.	n.d.
NE (%)	n.d.	42,5	n.d.	n.d.	n.d.
LY (%)	n.d.	37,4	n.d.	n.d.	n.d.
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d.	$1144 \cdot 10^3$	n.d.	$966 \cdot 10^3$	$570 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	$\geq 192$	96-192	$\geq 192$	24-48

(continuación)

	T = 35 d	T =42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,25 \cdot 10^6$	$6,96 \cdot 10^6$
Hto (%)	34,5	38,4
Hg (g/dL)	11,3	12,8
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	$7,1 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	56,9
LY (%)	n.d.	36,2
Plaquetas/ $\mu$ L	$771 \cdot 10^3$	$590 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	12-24	12-24

**CFX-4-b**

**a) Peso y temperatura**

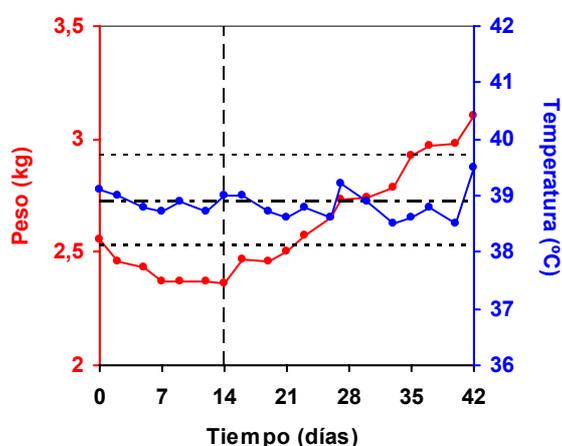


Figura II-18.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 42 d
Artritis	1	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	1	0
Sinovitis	1	0
Afectación articular	1	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,59 \cdot 10^6$	$4,92 \cdot 10^6$	$7,77 \cdot 10^6$	$5,34 \cdot 10^6$	$5,49 \cdot 10^6$
Hto (%)	34,7	29,8	33	29,5	30,6
Hg (g/dL)	11,7	10,1	10,9	10	10,4
Leucocitos/ $\mu$ L	$5,2 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^3$
NE (%)	26,8	31,9	36,2	33,5	36,5
LY (%)	67	44,3	59,1	54,1	49,2
Plaquetas/ $\mu$ L	$664 \cdot 10^3$	$1086 \cdot 10^3$	$901 \cdot 10^3$	$879 \cdot 10^3$	$686 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	12-24	12-24	6-12

(continuación)

	T = 35 d	T =42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,02 \cdot 10^6$	$5,89 \cdot 10^6$
Hto (%)	33,5	33,6
Hg (g/dL)	11	11,4
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,5 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^3$
NE (%)	39,4	37
LY (%)	50,6	56,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$713 \cdot 10^3$	$578 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	< 6

**CFX-4-c**

**a) Peso y temperatura**

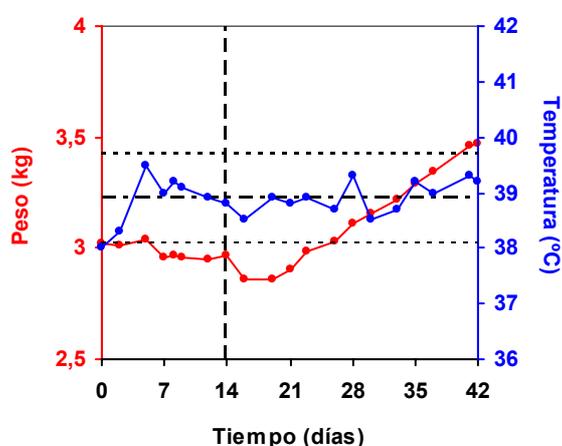


Figura II-19.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 42 d
Artritis	4	0
Herida	0	0
Fístula	4	0
Supuración articular	4	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: al abrir longitudinalmente el fémur se observa en el polo proximal del implante un acúmulo con aspecto de pus. Se coge una muestra y se realiza el recuento de células viables, con resultado negativo.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	n.d.	$5,38 \cdot 10^6$	$6,25 \cdot 10^6$	$5,44 \cdot 10^6$	$5,96 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d.	32,4	36,2	30,9	32,7
Hg (g/dL)	n.d.	11	12,3	10,4	10,9
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	n.d.	$7,2 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	n.d.	37,6	33,9	31,6
LY (%)	n.d.	n.d.	44,2	43,8	66
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d.	$1092 \cdot 10^3$	$983 \cdot 10^3$	$1064 \cdot 10^3$	$821 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	96-192	96-192	6-12

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,83 \cdot 10^6$	$5,71 \cdot 10^6$
Hto (%)	33	32,8
Hg (g/dL)	11,2	11,6
Leucocitos/ $\mu$ L	$6,1 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^3$
NE (%)	28,4	26,1
LY (%)	60,6	56,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$644 \cdot 10^3$	$478 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	< 6

**CFX-4-RxH**

**a) Peso y temperatura**

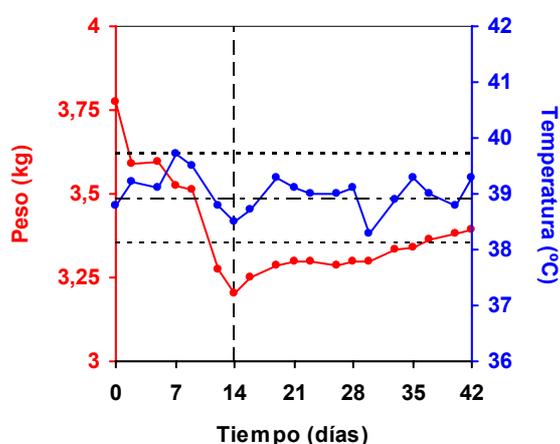


Figura II-20.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 42 d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	1
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,89 \cdot 10^6$	$5,18 \cdot 10^6$	$5,86 \cdot 10^6$	$6,09 \cdot 10^6$	$6,43 \cdot 10^6$
Hto (%)	36,2	31,3	33,9	34,1	34,7
Hg (g/dL)	12,7	11,2	11,3	11,3	11,6
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,7 \cdot 10^3$	$10,4 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^3$	$10,8 \cdot 10^3$	$10,2 \cdot 10^3$
NE (%)	26,8	30,5	43	41,4	39,4
LY (%)	70,1	44,6	37	45,2	49,6
Plaquetas/ $\mu$ L	$320 \cdot 10^3$	$1218 \cdot 10^3$	$1020 \cdot 10^3$	$948 \cdot 10^3$	$904 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	96-192	96-192

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,44 \cdot 10^6$	$5,71 \cdot 10^6$
Hto (%)	33,6	32,8
Hg (g/dL)	11,3	11,6
Leucocitos/ $\mu$ L	$9,6 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^3$
NE (%)	32,8	26,1
LY (%)	55,1	56,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$852 \cdot 10^3$	$478 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	48-96	12-24

**CFX-6-a**

**a) Peso y temperatura**

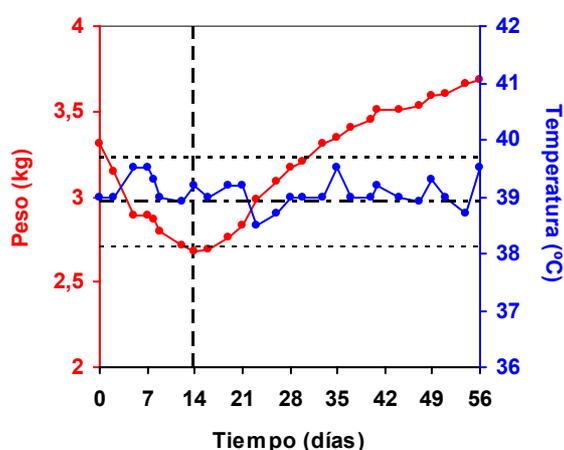


Figura II-21.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 56 d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	2	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	n.d	$5,95 \cdot 10^6$	$6,09 \cdot 10^6$	$5,59 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d	35,4	34,8	32	33
Hg (g/dL)	n.d	12	11,8	10,5	10,8
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d	$19,3 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d	29,1	33,7	33,5	38,8
LY (%)	n.d	55,1	53,1	50,7	55
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d	$1084 \cdot 10^3$	$952 \cdot 10^3$	$594 \cdot 10^3$	$570 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	48-96	48-96	6-12

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d	T = 49 d	T = 56 d
Hemáties/ $\mu$ L	$6,13 \cdot 10^6$	$6,09 \cdot 10^6$	$6,59 \cdot 10^6$	$6,26 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,3	35,5	38,6	37,8
Hg (g/dL)	12,1	12,2	12,9	13
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,1 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^3$	$8,3 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$
NE (%)	24,1	24,2	28,6	27,3
LY (%)	70,3	62,2	66,8	67,8
Plaquetas/ $\mu$ L	$608 \cdot 10^3$	$617 \cdot 10^3$	$575 \cdot 10^3$	$503 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	< 6	< 6	< 6

**CFX-6-b**

**a) Peso y temperatura**

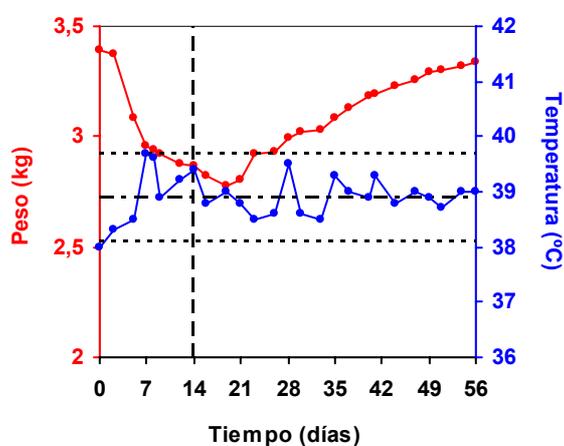


Figura II-22.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 56 d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$5,87 \cdot 10^6$	$5,97 \cdot 10^6$	$5,88 \cdot 10^6$	$5,79 \cdot 10^6$	$5,97 \cdot 10^6$
Hto (%)	41,2	35,9	34,5	32,6	32,8
Hg (g/dL)	14,3	12	11,5	11,1	11
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,7 \cdot 10^3$	$19,9 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^3$	$10,3 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^3$
NE (%)	26,8	29,2	43,4	34,1	35,7
LY (%)	55,9	50,4	35,7	45,9	50,9
Plaquetas/ $\mu$ L	$481 \cdot 10^3$	$1080 \cdot 10^3$	$1198 \cdot 10^3$	$932 \cdot 10^3$	$888 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	96-192	24-48

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d	T = 49 d	T = 56 d
Hemáties/ $\mu$ L	$6,14 \cdot 10^6$	$6,61 \cdot 10^6$	$6,76 \cdot 10^6$	$6,65 \cdot 10^6$
Hto (%)	33,9	36,8	37,4	38,3
Hg (g/dL)	11,6	12,5	12,4	13,1
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,6 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^3$	$8,4 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$
NE (%)	35,9	35,4	27,9	26,8
LY (%)	53,7	52,2	66	69
Plaquetas/ $\mu$ L	$732 \cdot 10^3$	$785 \cdot 10^3$	$541 \cdot 10^3$	$403 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	6-12	< 6	< 6

**CFX-6-c**

**a) Peso y temperatura**

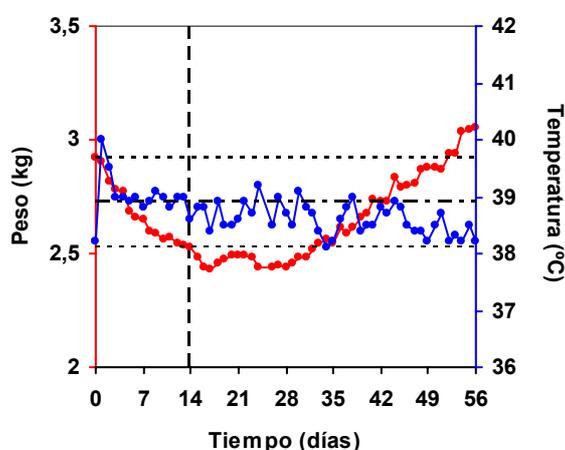


Figura II-23.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm$  2 desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 56 d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	4	0
Sinovitis	2	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: pequeña cantidad de líquido sinovial perirrotuliano.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	n.d.	$6,17 \cdot 10^6$	$6,45 \cdot 10^6$	$4,97 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d.	35,9	35,8	27	37,5
Hg (g/dL)	n.d.	11,6	12	9	12,9
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	$10,2 \cdot 10^3$	$10,1 \cdot 10^3$	$10,4 \cdot 10^3$	$10,3 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	39,5	42,8	46,9	46,6
LY (%)	n.d.	36,4	39,2	38,4	49,5
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d.	$1140 \cdot 10^3$	$1334 \cdot 10^3$	$1198 \cdot 10^3$	$841 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	48-96	24-48

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d	T = 49 d	T = 56 d
Hemáties/ $\mu$ L	$6,97 \cdot 10^6$	$6,87 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$	$6,82 \cdot 10^6$
Hto (%)	36,9	37,2	37,2	38
Hg (g/dL)	12,3	12,3	12,4	12,8
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,1 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^3$
NE (%)	41,6	32,7	38	26,7
LY (%)	52	62,4	55	67,1
Plaquetas/ $\mu$ L	$620 \cdot 10^3$	$559 \cdot 10^3$	$555 \cdot 10^3$	$472 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	< 6	< 6	< 6

**CFX-6-RxH**

**a) Peso y temperatura**

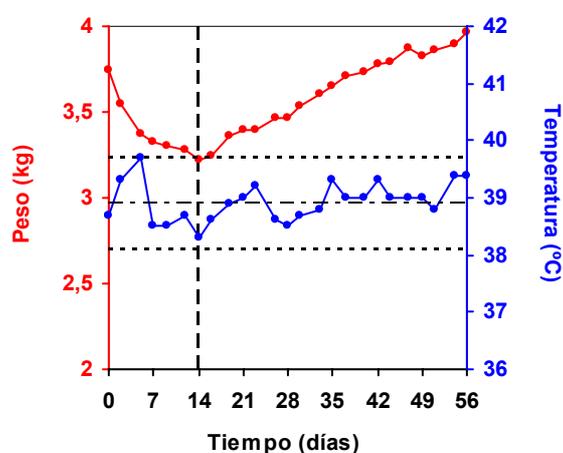


Figura II-24.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 56 d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	0

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,28 \cdot 10^6$	$6,04 \cdot 10^6$	$6,59 \cdot 10^6$	$5,76 \cdot 10^6$	$6,15 \cdot 10^6$
Hto (%)	37,9	36,8	39,4	35,3	37
Hg (g/dL)	13,2	12,8	13,5	12,1	13,3
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,8 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^3$
NE (%)	21,3	28,6	33,3	27,1	24,1
LY (%)	73	60,9	58,4	66	68,1
Plaquetas/ $\mu$ L	$410 \cdot 10^3$	$1272 \cdot 10^3$	$731 \cdot 10^3$	$603 \cdot 10^3$	$451 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	96- 192	24-48	12-24	< 6

(continuación)

	T = 35 d	T = 42 d	T = 49 d	T = 56 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,3 \cdot 10^6$	$6,17 \cdot 10^6$	$6,49 \cdot 10^6$	$5,37 \cdot 10^6$
Hto (%)	38,4	38,2	40,1	33,3
Hg (g/dL)	13	12,9	13,3	11,5
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,4 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$
NE (%)	24,8	23,2	22,8	18,5
LY (%)	67,1	71,8	73,3	71,9
Plaquetas/ $\mu$ L	$553 \cdot 10^3$	$435 \cdot 10^3$	$577 \cdot 10^3$	$395 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	< 6	< 6	< 6

**CFX-12-a**

**a) Peso y temperatura**

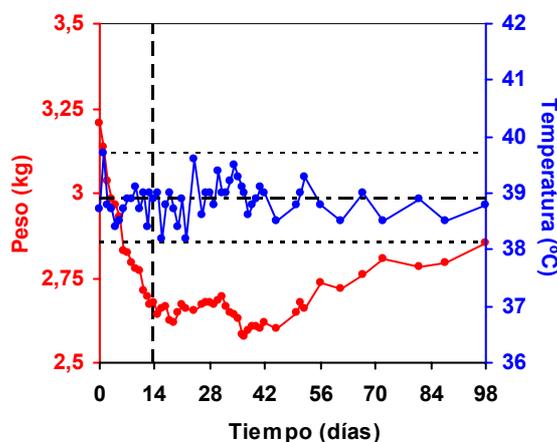


Figura II-25.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

**b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida**

	T = 14 d	T = 98 d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	1
Afectación articular	0	2

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: herida en pata izquierda pretibial con pérdida cutánea a las 8 y 12 semanas; a pesar de las curas locales, se isquemizó dicha pata, hasta el sacrificio. A las 12 semanas se observa engrosamiento de la cortical periimplante, sinovitis reactiva. Procesos degenerativos articulares.

**c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)**

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 42 d	T = 56 d	T = 98 d
Hematíes/ $\mu$ L	n.d.	$6,17 \cdot 10^6$	$6,92 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^6$	$6,94 \cdot 10^6$	$6,31 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d.	36,9	39,7	37,3	36,7	34,4
Hg (g/dL)	n.d.	12,4	13,3	12,6	12,5	11,4
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	$8,3 \cdot 10^3$	$13 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	39,5	45,4	40	47,9	55
LY (%)	n.d.	48,5	47,7	52	46,4	36,3
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d.	$1350 \cdot 10^3$	$1698 \cdot 10^3$	$849 \cdot 10^3$	$692 \cdot 10^3$	$320 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	$\geq 192$	$\geq 192$	24-48	12-24	< 6

## CFX-12-b

## a) Peso y temperatura

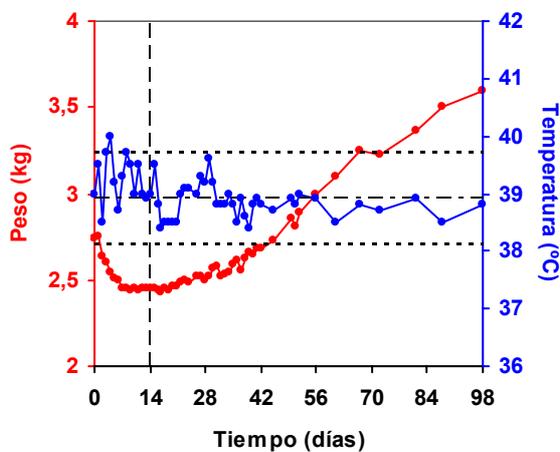


Figura II-26.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 98 d
Artritis	2	0
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	2	0
Sinovitis	2	0
Afectación articular	0	3

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

Incidencias: engrosamiento de la cortical periimplante. Proceso degenerativo: Artrosis.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hemáties/ $\mu$ L	n.d.	$5,77 \cdot 10^6$	$5,79 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$	n.d.	$7,08 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d.	33,2	31	18,5	n.d.	33,3
Hg (g/dL)	n.d.	11,1	10,4	6,3	n.d.	11,1
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	$12,8 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	n.d.	$8,5 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	57	57,6	49,2	n.d.	46,5
LY (%)	n.d.	23	25,7	27,5	n.d.	36,5
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d.	$1176 \cdot 10^3$	$1580 \cdot 10^3$	$990 \cdot 10^3$	n.d.	$718 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	$\geq 192$	n.d.	48-96

(continuación)

	T = 42 d	T = 49 d	T = 56 d	T = 70 d	T = 98 d
Hemáties/ $\mu\text{L}$	$6,55 \cdot 10^6$	$6,31 \cdot 10^6$	$6,45 \cdot 10^6$	$6,58 \cdot 10^6$	$6,74 \cdot 10^6$
Hto (%)	31,7	31,8	33,7	35	39,3
Hg (g/dL)	11	11,2	11,6	12	13,6
Leucocitos/ $\mu\text{L}$	$8,4 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^3$	$9,9 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$
NE (%)	40,8	40	32,9	31,4	41,2
LY (%)	46,7	54	65,4	58,3	50,4
Plaquetas/ $\mu\text{L}$	$596 \cdot 10^3$	$537 \cdot 10^3$	$487 \cdot 10^3$	$387 \cdot 10^3$	$220 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	48-96	24-48	12-24	12-24	< 6

## CFX-12-c

## a) Peso y temperatura

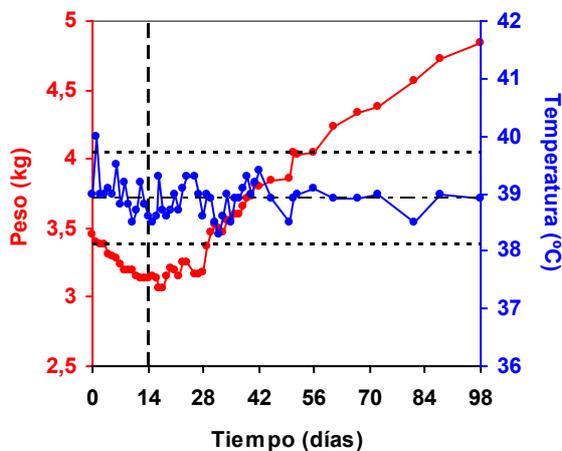


Figura II-27.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 98 d
Artritis	3	0
Herida	0	0
Fístula	3	0
Supuración articular	3	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	1

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2= moderado; 3 = grave; 4 = muy grave  
 Incidencias: engrosamiento cortical periimplante.

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR) (n.d.: no disponible)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hemáties/ $\mu$ L	n.d.	$5,6 \cdot 10^6$	$5,73 \cdot 10^6$	$5,35 \cdot 10^6$	$6,35 \cdot 10^6$	$6,01 \cdot 10^6$
Hto (%)	n.d.	35,1	34,5	31,6	37,9	36,2
Hg (g/dL)	n.d.	11,6	11,8	10,8	12,6	12,1
Leucocitos/ $\mu$ L	n.d.	$6,9 \cdot 10^3$	$6,3 \cdot 10^3$	$6,3 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^3$
NE (%)	n.d.	35,8	32,5	32,5	33,2	28,5
LY (%)	n.d.	59	50,7	56,8	61,6	67
Plaquetas/ $\mu$ L	n.d.	$1165 \cdot 10^3$	$1148 \cdot 10^3$	$994 \cdot 10^3$	$612 \cdot 10^3$	$553 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	48-96	6-12	6-12

(continuación)

	T = 42 d	T = 49 d	T = 56 d	T = 70 d	T = 98 d
Hematíes/ $\mu\text{L}$	$6,46 \cdot 10^6$	$6,12 \cdot 10^6$	$6,34 \cdot 10^6$	$5,97 \cdot 10^6$	$6,02 \cdot 10^6$
Hto (%)	39	37,1	38,8	36,5	38,4
Hg (g/dL)	13,2	12,8	13,2	12,4	13,5
Leucocitos/ $\mu\text{L}$	$5,1 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$
NE (%)	22,3	39	28,5	24	20,1
LY (%)	65,6	55	70	70,6	75,8
Plaquetas/ $\mu\text{L}$	$378 \cdot 10^3$	$539 \cdot 10^3$	$502 \cdot 10^3$	$405 \cdot 10^3$	$350 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6

## CFX-12-RxH

## a) Peso y temperatura

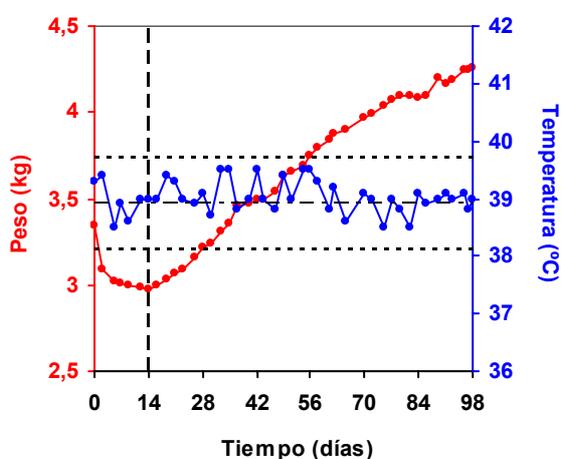


Figura II-28.- Evolución temporal del peso y la temperatura. La línea vertical discontinua indica el momento de la segunda intervención. Las líneas horizontales discontinuas indican el valor medio de la temperatura basal de todos los animales  $\pm 2$  desviaciones típicas.

## b) Observaciones clínicas en la articulación intervenida

	T = 14 d	T = 98 d
Artritis	4	1
Herida	0	0
Fístula	0	0
Supuración articular	4	0
Sinovitis	3	0
Afectación articular	0	2

0 = negativo / normal; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave; 4 = muy grave

## c) Hemograma y Proteína C-Reactiva (PCR)

	basal (T=0)	T = 7 d	T = 14 d	T = 21 d	T = 28 d	T = 35 d
Hemáties/ $\mu$ L	$6,12 \cdot 10^6$	$5,93 \cdot 10^6$	$6,71 \cdot 10^6$	$6,38 \cdot 10^6$	$6,73 \cdot 10^6$	$6,74 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,8	33,5	34,5	34,1	35,2	36,2
Hg (g/dL)	12,2	11,8	11,5	12,5	11,9	11,8
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,9 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$
NE (%)	27,9	40,8	42,7	49	30,8	30,9
LY (%)	66,8	37,8	38,8	43,8	63,6	64,7
Plaquetas/ $\mu$ L	$393 \cdot 10^3$	$1371 \cdot 10^3$	$1047 \cdot 10^3$	$772 \cdot 10^3$	$783 \cdot 10^3$	$730 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	$\geq 192$	$\geq 192$	48-96	6-12	< 6

(continuación)

	T = 42 d	T = 49 d	T = 56 d	T = 63 d	T = 70 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,51 \cdot 10^6$	$6,97 \cdot 10^6$	$6,82 \cdot 10^6$	$6,66 \cdot 10^6$	$6,99 \cdot 10^6$
Hto (%)	35,4	39	38,6	38,1	40
Hg (g/dL)	12	12,9	13,2	12,2	13,3
Leucocitos/ $\mu$ L	$8,3 \cdot 10^3$	$10,2 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$
NE (%)	35,9	36,7	27,2	29,3	30,4
LY (%)	60,8	56,2	66	58,5	65,3
Plaquetas/ $\mu$ L	$519 \cdot 10^3$	$548 \cdot 10^3$	$485 \cdot 10^3$	$493 \cdot 10^3$	$520 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	< 6	6-12	< 6	< 6	< 6

(continuación)

	T = 77 d	T = 84 d	T = 98 d
Hematíes/ $\mu$ L	$6,74 \cdot 10^6$	$6,68 \cdot 10^6$	$6,71 \cdot 10^6$
Hto (%)	39,6	39,2	39,5
Hg (g/dL)	13,7	13,2	13,2
Leucocitos/ $\mu$ L	$7,9 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^3$
NE (%)	31,7	28,7	38,8
LY (%)	60,1	63	56,2
Plaquetas/ $\mu$ L	$423 \cdot 10^3$	$522 \cdot 10^3$	$380 \cdot 10^3$
PCR (mg/l)	6-12	< 6	< 6