

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Desarrollo y optimización de implantes osteointegrables  
de cesión controlada de ciprofloxacino para  
el tratamiento local de infecciones óseas**

**Autor: Castro Pertíñez, Concepción**

**Directores: Carmen María Évora García  
y Esther Sánchez Sánchez**

**Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica**



**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**  
**Departamento de Ingeniería Química**  
**y Tecnología Farmacéutica**  
Facultad de Farmacia. 38200 - Tenerife (Spain)

CARMEN MARÍA ÉVORA GARCÍA Y ESTHER SÁNCHEZ SÁNCHEZ,  
CATEDRÁTICA Y PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍA  
FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,

CERTIFICAN: Que la presente memoria experimental titulada  
**“DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE IMPLANTES  
OSTEOINTEGRABLES DE CESIÓN CONTROLADA DE  
CIPROFLOXACINO PARA EL TRATAMIENTO LOCAL  
DE INFECCIONES ÓSEAS”**, elaborada por la  
Licenciada en Farmacia Dña. Concepción Castro  
Pertiñez, ha sido realizada bajo su dirección conjunta, en  
el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología  
Farmacéutica y, hallándose concluida, autorizan su  
presentación a fin de que pueda ser juzgada por el  
Tribunal correspondiente.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación en La  
Laguna a siete de octubre de dos mil dos.

Fdo.: Carmen M<sup>a</sup> Evora García

Fdo.: Esther Sánchez Sánchez

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:  
a los que les debo cuanto soy .....

A mis hermanos:  
por estar siempre a mi lado .....

Después de recorrer un largo y duro camino, de hacer miles de litros de tampón fosfato y de citrato, de lavar miles de tubos de ensayo, de hacer un número incontable de implantes, y de perder todos mis escrúpulos con los conejitos, creo que ha llegado el momento de dar las gracias y de expresar mi más sincero agradecimiento a toda la gente que de una u otra forma han colaborado, vivido, y ¿ por qué no? que han sufrido y padecido esta tesis, pero que al final han hecho posible que este proyecto se llevase a cabo.

Doy las gracias a todos y cada una de las personas que componen el Departamento de Ingeniería y Tecnología Farmacéutica, a los profesores: Dr. Lladrés, Dra. Munguía, Dr. Fariña, Dr. Oliva y Dra. Dorta, como al personal administrativo, Margarita de la Rosa, y al personal técnico, Diego Molina.

A mis compañeras y amigas Carmen y Ana, por las horas que hemos compartido durante estos años, así como por las experiencias vividas, gracias por las lecciones magistrales de compañerismo.

A mi amiga M<sup>a</sup> José, además compañera del departamento, gracias por estar en lo bueno y en lo malo, no olvidaré los gratos momentos vividos durante estos años y ¡ánimo!, te deseo que tengas mucha suerte en la vida.

Al Dr. Nuñez y al doctorando Diego Lozano, del Dpto. de Química Inorgánica, por su valiosa ayuda en la realización y análisis de los Rayos X.

A los profesores Laila Moujir y Miguel Angel Falcón, del Dpto. de Microbiología, por su magnífica dirección de la parte microbiológica de esta tesis.

Al Dr. Perera, del Servicio de Anatomía Patológica, por la realización de forma desinteresada de los estudios histológicos.

A la Dra. M<sup>a</sup> Rosa Arnau y a todo su equipo del estabulario, por el cuidado de los “conejitos” así como, por facilitarnos los equipos y medios necesarios para la realización de intervenciones quirúrgicas.

Al Dr. Enrique Martínez, del Dpto. de Parasitología por la realización de forma desinteresada de las determinaciones de creatinina.

Al Dr. Alvarez, compañero del proyecto, gracias por tu ayuda y ¡ánimo! el siguiente eres tú.

A la Dra. Araceli Delgado, y a la Dra. Isabel Soriano, gracias por todo lo que me habéis enseñado y por la ayuda que me habéis prestado en todo momento.

Al Dr. Baro, “compañero de fatigas”, le doy las gracias en mi nombre, y en el de los cientos de conejitos que dieron su vida en “pro” de la ciencia, así como, por tus lecciones magistrales de anatomía, por tu paciencia infinita, y por poner un toque de humor en las interminables tardes de quirófano. Gracias por todo.

A mis directoras de tesis, por ser más que directoras, amigas, quiero darles mi más sincero agradecimiento por su gran ayuda, por ser para mí un ejemplo, de constancia, de esfuerzo, de trabajo y de profesionalidad. A la Dra. Carmen Évora por su magnífica dirección en este trabajo, y por todo lo que me ha enseñado y ayudado; y a la Dra. Esther Sánchez, porque empezaste siendo mi directora y terminaste siendo para mí, una hermana, gracias por ayudarme en tantos sábados y domingos de trabajo en el laboratorio, por los muchos momentos de confidencialidad que hemos compartido, de risas y también por los momentos de desesperación y por animarme a no abandonar. Perdóname, por mis descuidos y olvidos, y por las muchas veces que te hice perder la paciencia. Gracias por enseñarme como trabajar en un laboratorio con disciplina y rigurosidad y por todos los buenos consejos que me has dado. Sin tu ayuda y dirección, no hubiese sido posible finalizar esta tesis.

Por último a mis padres, hermanos, cuñada y sobrina, así como a mis amigos y compañeros de trabajo de todos los servicios por los que he pasado, gracias por estar siempre ahí.

*“estos años de doctorando serán inolvidables para mí”*

## INDICE

### I. INTRODUCCIÓN

- Osteomielitis ..... 1
- Estado actual de la terapia antiinfecciosa local ..... 4
  - Sistemas no biodegradables ..... 5
  - Sistemas biodegradables ..... 6
- Ciprofloxacino ..... 20

### II. OBJETIVOS ..... 31

### III. I. MATERIAL Y MÉTODOS

- Materias primas ..... 33
- Caracterización de materias primas ..... 33
- Preparación de los implantes ..... 36
- Estudio *in vitro* ..... 36
  - Métodos analíticos de valoración de ciprofloxacino ..... 36
  - Ensayos de cesión *in vitro* ..... 38
  - Estudios de adsorción ..... 39

▪ Evolución temporal de las características de los implantes ...	40
▪ Evolución temporal de los componentes del implante .....	42
• Estudio <i>in vivo</i> .....	43
▪ Técnica quirúrgica .....	44
▪ Protocolo de muestreo .....	48
▪ Método analítico para la valoración de ciprofloxacino .....	51
▪ Control de la función renal .....	52
▪ Análisis radiológicos .....	53
▪ Análisis histopatológicos .....	53
 IV. RESULTADOS	
• Estudio <i>in vitro</i> .....	55
• Estudio <i>in vivo</i> .....	107
 V. DISCUSIÓN	
• Ensayos <i>in vitro</i> .....	133
• Ensayos <i>in vivo</i> .....	156
 VI. CONCLUSIONES .....	171
 VII. BIBLIOGRAFÍA .....	175



## **INTRODUCCIÓN**



La osteomielitis es una inflamación de causa infecciosa tanto de la cortical como de la médula ósea. Generalmente es de origen bacteriano, aunque cualquier otro agente patógeno (hongos, virus y parásitos) puede producirla. Su frecuencia ha aumentado en los últimos años debido por un lado a causas sociales como el incremento del consumo de drogas ilegales por vía intravenosa y el aumento de fracturas abiertas por accidentes de tráfico, laborales o de otra índole y por otro a los avances de la medicina moderna que se refleja en el aumento de la supervivencia de ciertas poblaciones entre las que podemos citar pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis, enfermos oncológicos e inmunodeprimidos, la utilización de técnicas quirúrgicas cada vez más agresivas y el uso de implantes ortopédicos. La infección ósea es una de las complicaciones más graves y la mayor causa de fracaso de las sustituciones articulares. Además, una infección ósea, tras la osteosíntesis de una fractura, implica la posibilidad de una falta de unión de la misma, con el consiguiente riesgo e incertidumbre en lo que respecta al futuro del miembro fracturado. Por todo ello, se ha suscitado un gran interés en su estudio a lo largo de los últimos 20 años que ha dado lugar a grandes avances en la epidemiología, etiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento.

La osteomielitis se puede clasificar según distintos criterios:

- 1.- Localización: De huesos largos, vertebral, púbrica, esternal, etc.
- 2.- Características del huésped: Neonato, diabético, adicto a drogas por vía parenteral, inmunodeprimido, etc.
- 3.- Patógenos que la produce: Estafilocócica, pseudomónica, tuberculosa, anaerobia, polimicrobiana, etc.
- 4.- Tiempo de evolución: Aguda (< 2 semanas), subaguda (2 - 4 semanas) y crónica (> 4 semanas). También hemos de incluir en este apartado las osteomielitis de primer brote y las reinfecciones.

5.- Patogenia: Primaria considerada cuando existe una inoculación directa del agente patógeno en el hueso; es el caso de las fracturas abiertas, o las producidas tras cirugía. Por continuidad el germen alcanza el hueso a partir de un foco infeccioso vecino; es la más frecuente en los pacientes de edad avanzada, diabéticos o con alteraciones vasculares. Hematógena el germen alcanza el tejido óseo por vía sanguínea, ya sea consecutivamente a una sepsis, en donde el foco osteomielítico sería secundario o metastásico ( el caso menos frecuente), o a partir de un foco séptico, generalmente cutáneo o del área oronasal.

La osteomielitis aguda hematógena es la forma de presentación más frecuente, se localiza fundamentalmente en las zonas metafisarias cercanas a la rodilla, es decir, metáfisis distal del fémur y proximal de la tibia, y las más lejanas del codo, como la superior del húmero y la distal del radio. Es llamada también osteomielitis de los adolescentes, por su presentación frecuente en jóvenes, generalmente varones, atribuible posiblemente a la influencia de los traumatismos en la aparición del cuadro. Una infección ósea aguda mal curada puede desembocar en una osteomielitis crónica.

Actualmente, se cuenta con un amplio abanico de agentes antiinfecciosos que son activos frente a la mayoría de los microorganismos causantes de la infección ósea. Sin embargo, sigue presentando una elevada morbilidad por su tendencia a la cronicidad y recurrencia. Para que la antibioterapia sea eficaz hay que tener en cuenta no sólo que el fármaco sea activo frente al patógeno, debe alcanzar y mantener niveles eficaces, por encima de las concentraciones mínimas bactericidas en el foco de infección y, ser bien tolerados, ya que es necesario utilizar dosis elevadas durante largos periodos de tiempo (Korkusuz et al., 1993). Para el tratamiento de este tipo de infecciones se prefiere emplear agentes bactericidas por las deficiencias de los mecanismos de defensa en la zona y además deben tener propiedades antiadherentes y ser capaces de atravesar la biopelícula de glucocálices. En

el hueso sano, las concentraciones séricas son reflejo de los niveles que se alcanzan en tejido óseo. Por el contrario, esto no ocurre en el hueso enfermo y más concretamente en el foco de infección, donde la presencia, en particular en las de evolución crónica, de necrosis, "slime" y un pH ácido dificultan el acceso y la acción de los agentes antiinfecciosos.

Con respecto a las infecciones crónicas, hasta nuestros días, el tratamiento ha sido largo, engorroso, molesto para el paciente, que se ve sometido en ocasiones a numerosas intervenciones quirúrgicas, y decepcionante en lo que a resultados se refiere, pues la existencia de graves secuelas relativas a la movilidad, dolor, longitud del miembro, etc., están casi aseguradas. Las dos principales características de la osteomielitis crónica son supuración purulenta desde el foco de infección y presencia de tejido necrosado o isquémico, cavidades y fragmentos óseos desvitalizados (secuestros). La osteomielitis crónica requiere inicialmente un tratamiento quirúrgico. Los secuestros no se encuentran irrigados y las bacterias localizadas en el centro de la zona muerta de tejido óseo no pueden ser erradicadas con antibioterapia solamente. Para su tratamiento se requiere un desbridamiento radical de todos los fragmentos óseos muertos y sustitución con implantes aloplásticos complementado, evidentemente, por una terapia antiinfecciosa agresiva y prolongada (Klemm, 2001).

Hasta aquí hemos pretendido presentar brevemente las características de la osteomielitis y poner de manifiesto la dificultad de su tratamiento, pues aún disponiendo de fármacos activos, se requieren dosis muy elevadas por vía sistémica para asegurar niveles eficaces en el foco de infección, lo que lleva consigo el riesgo de desarrollo de resistencia por parte de los patógenos causantes de la enfermedad sin olvidar los efectos secundarios que puede sufrir el paciente sometido a este tratamiento.

Con el fin de paliar estos inconvenientes y aumentar la eficacia de los tratamientos, se ha intentado desarrollar nuevas técnicas y sistemas para la

administración directa de antibióticos en el sitio de la infección, que permitan alcanzar altas concentraciones locales, y bajos niveles sistémicos (Schmidt et al., 1995). Además, estos sistemas locales debe estimular o al menos actuar como soporte para la regeneración del tejido óseo perdido.

### **ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA ANTIINFECCIOSA LOCAL**

Según Rushton (1997), la elección de un agente antimicrobiano para ser formulado en un sistema de cesión local debe basarse en los siguientes criterios:

- Ser activo frente a los patógenos más frecuentes en la osteomielitis crónica.
- Alcanzar y mantener concentraciones locales que excedan varias veces (generalmente 10 veces) la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente al patógeno causante de la infección.
- No producir efectos adversos.
- No pasar a circulación general
- 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 osteomielitis crónica son estafilococos y bacterias G(-), particularmente *Enterobacter* spp., y *Pseudomonas aeruginosa* (Rissing, 1997 y Galanakis et al., 1997). Por tanto, basándose en los criterios previamente señalados y en los hallazgos bacteriológicos, los agentes antibacterianos más empleados en la elaboración de sistemas de cesión local son los aminoglucósidos y con menor frecuencia algunos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas. Y atendiendo al material empleado para la elaboración de estas preparaciones, los sistemas de cesión local de antibióticos se pueden dividir en no biodegradables y biodegradables. Evidentemente el mayor inconveniente de los sistemas elaborados con

materiales no biodegradables es la necesidad de una segunda intervención para retirarlos, una vez han sido liberada la totalidad del antibiótico (Rushton, 1997).

### **Sistemas no biodegradables**

Los materiales que más se han utilizado como vehículos de antibióticos son los cementos de polimetilmetacrilato (PMMA), en concreto en forma de perlas de PMMA que se pueden encontrar comercializadas o como preparaciones no comercializadas. En el mercado europeo el PMMA impregnado con gentamicina se encuentra disponible en cemento (Palacos<sup>®</sup>-Rebofacin) de aplicación en artroplastias; y en forma de cadenas de 10, 30 ó 60 perlas de PMMA conteniendo cada una de ellas 7,5 mg de sulfato de gentamicina (Septopal<sup>®</sup>) para infecciones en tejido muscular y óseo (Henry y Galloway, 1995). La eficacia de este último sistema ha sido ampliamente demostrada en clínica, tiene la ventaja de ceder las dosis adecuadas para mantener elevadas concentraciones de antibiótico en la zona afectada y niveles sistémicos mínimos. Además, no se requiere, en general, la administración de antibióticos por vía sistémica reduciéndose así el personal sanitario por enfermo y disminuyendo el tiempo de hospitalización. Desdichadamente este tipo de terapia presenta una serie de limitaciones e inconvenientes. Éstas incluyen total inmovilización del paciente, la introducción de un material extraño que puede desarrollar una reacción inflamatoria local y la posibilidad de reinfección y, por último, es necesaria una segunda intervención para retirar el material ya que el PMMA no es biodegradable ni bioabsorbible.

Las no comercializadas son preparadas in situ por los cirujanos, por lo que evidentemente se caracterizan por una falta de uniformidad tanto en la distribución del antibiótico como en su tamaño lo que da lugar a una liberación irregular y no predecible del fármaco (Nelson et al., 1992).

## **Sistemas biodegradables**

La ventaja principal de estos sistemas es que no es necesaria una segunda intervención para retirarlos una vez que han cumplido su función.

### **1.- Sales de calcio**

El empleo de sales cálcicas para la reparación ósea es una técnica relativamente antigua. Los materiales más empleados han sido la hidroxiapatita de coral, bovina o sintética, el fosfato tricálcico y el sulfato cálcico. En el caso de la hidroxiapatita se han observado ciertas diferencias según su origen. La hidroxiapatita sintética se reabsorbe más lentamente que la obtenida de coral (Braye et al., 1996). Además la hidroxiapatita bovina se ha empleado con éxito como sustitutivo del injerto óseo (Levai y Boisgard 1996). También se ha comprobado que algunas cerámicas sintéticas, como la constituida por una mezcla de fosfato tricálcico e hidroxiapatita es capaz de inducir osteogénesis en distintas especies animales tras su implantación en tejido subcutáneo y muscular (Yang et al., 1996). Recientemente, se ha demostrado la eficacia del cemento de hidroxiapatita en la reconstrucción craneofacial secundaria en una muestra de niños entre 2 y 18 años (Burstein et al., 1999)

Estas propiedades hicieron que ya desde los años cincuenta se intentara la utilización de estos materiales como soporte de antibióticos para el tratamiento de la osteomielitis (Kovacevic 1953). Sin embargo, es a partir de la década de los noventa cuando se empieza a estudiar la capacidad de las sales de calcio como transportadoras de antibióticos y a la vez, sustitutas del tejido óseo.

Así, Shinto et al. (1992) estudian el comportamiento de bloques porosos (30-40%) de hidroxiapatita cálcica, como sistema de liberación controlada de gentamicina, cefoperazona y flomoxef . Los resultados indicaron que la gentamicina presenta una cesión más controlada por lo que los ensayos *in vivo* fueron llevados a cabo con este antibiótico detectándose



niveles en hueso superiores a las CMI para *S. aureus* durante aproximadamente 90 días. Los estudios histológicos mostraron que la regeneración ósea se acelera debido a la ocupación de los poros del implante por tejido óseo. Resultados similares desde el punto de vista radiológico, como histopatológico y antiinfeccioso encuentran Korkusuz et al. (1993), en un estudio similar.

La arbekacina en bloques de hidroxiapatita también resultó ser más eficaz que la administración subcutánea del mismo antibiótico para el tratamiento de osteomielitis provocada en tibia de ratas, siendo a su vez la evolución radiológica e histológica satisfactoria (Itokazu et al., 1997). Estos implantes fueron empleados posteriormente (Itokazu et al., 1998) en quince pacientes con osteomielitis, en combinación con antibioterapia intravenosa. Todos los pacientes evolucionaron satisfactoriamente, excepto uno de ellos, en un periodo que varió entre 13 y 71 meses.

La eficacia de implantes de hidroxiapatita impregnados en antibiótico ha sido también probada para el tratamiento de osteomielitis crónicas en humanos, demostrándose la erradicación de la infección así como la incorporación total del implante, comprobado radiológicamente (Yamashita et al., 1998).

La hidroxiapatita como soporte de antibióticos también ha sido estudiada en pasta para rellenar la cavidad ósea y erradicar la infección ósea (Martins et al., 1998, Solberg et al., 1999). Los resultados obtenidos para el tratamiento de osteomielitis provocadas en animales de experimentación, fueron similares en el grupo de animales tratados con la pasta y los tratados con las perlas de PMMA sí bien, hay que tener en cuenta, que en este último caso es necesario retirar el sistema una vez liberada la dosis que contiene (Solberg et al., 1999).

Paralelamente se han estudiado otros fosfatos, como el fosfato tricálcico. La liberación de gentamicina y vancomicina desde sistemas

elaborados con cerámica macroporosa de fosfato tricálcico, y su relación con la porosidad (20 y 40%) y la geometría del implante, esférica o paralelepípeda ha sido estudiada (Thomazeau y Langlais, 1996). La incorporación del antibiótico se realiza por inmersión y observan que tanto la tasa de incorporación, como los perfiles de cesión *in vitro* e *in vivo* dependen no sólo de la forma geométrica sino también de la porosidad del sistema. Los resultados indicaron que es necesario una porosidad mínima para que el antibiótico penetre en el implante y no quede solamente adsorbido en su superficie lo que lleva consigo una liberación muy rápida del mismo. Otros autores elaboran esferas de tricálcico con gentamicina (3-4 mm y 45% de porosidad) que son valoradas para tratar una osteomielitis en tibia de conejos, sin embargo, la liberación total del antibiótico se produce en 48 horas aunque comprueban que el antibiótico permanece en el compartimento intraóseo durante diez días (Lambotte et al., 1998).

Otra de las cerámicas que se ha investigado es el sulfato de calcio. El sulfato cálcico ha sido utilizado para la preparación de implantes con gentamicina (Morales de Cano et al., 1995), que fueron valorados en animales de experimentación (conejos) observándose la reabsorción completa del implante y la regeneración ósea de la cavidad. De hecho el yeso de Paris fue uno de los primeros materiales que se mezcló con antibióticos para erradicar o prevenir infecciones óseas. Si bien, Benoit et al., 1997 indica que para retrasar la liberación de vancomicina contenida en implantes de sulfato de calcio se requiere un recubrimiento con PLGA (90:10).

Recientemente Nijhof et al. (2000a, 2000b) ponen de manifiesto la eficacia del cemento óseo conteniendo tobramicina para tratar la infección ósea provocada en conejos por *S.aureus* o *S.epidermidis*. Si bien estos autores, posteriormente indican que la eficacia del tratamiento es mayor cuando la terapia local con cemento óseo impregnado con tobramicina se refuerza con la administración sistémica de cefazolina.

El sulfato cálcico es un material que se ha empleado para rellenar cavidades óseas desde finales del siglo XIX, siendo su bio y osteocompatibilidad claramente probada, además es un material osteoconductor por lo que actúa como soporte para el crecimiento de nuevo tejido óseo. Actualmente se ha introducido en el mercado español, una preparación a base de sulfato cálcico, conocido como yeso de Paris, mezclado con gentamicina para el tratamiento de la osteomielitis. Esta especialidad presenta a priori la ventaja de que se coloca en el defecto óseo en forma líquida y se endurece *in situ*. Sin embargo, la información de la que se dispone hasta el momento no parece justificar el uso de este producto como sustitutivo de la terapia parenteral.

## **2.- Polímeros**

### **A.- Poliláctico, poliglicólico y sus copolímeros**

En este campo se han empleado tanto polímeros naturales como polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos que más se han estudiado para la regeneración ósea son los poli (alfa-hidroxiésteres) como el ácido poli-L-láctico (PLLA), el ácido poli-D-L-láctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), así como sus copolímeros poli-L-láctico-coglicólico (L-PLGA) y el poli-D-L-láctico-coglicólico (PLGA), todos aprobados por la FDA (Boyan et al., 1998) para múltiples usos. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* su biocompatibilidad y su cierta capacidad osteoconductor. Son numerosos los trabajos de investigación orientados a estudiar la capacidad de estos polímeros para estimular la formación ósea cuando se emplean como material de relleno en distintos defectos óseos.

La capacidad de osteogénesis del poliláctico y sus copolímeros ha sido ampliamente demostrada en cultivos *in vitro* que posteriormente son utilizados como relleno de defectos osteocondriales (Freed et al., 1993; Chu-CR et al., 1995 y Otto et al. 1996).

En cuanto a estos polímeros hemos de indicar que son varias las estructuras geométricas que se han empleado para inducir la reparación ósea. Las agujas de PGA recubiertas con n-butil-2-cianoacrilato, polidioxanona (PDS), poli-beta-hidroxibutirato (PHBA) y PLLA favorecen la consolidación ósea en la fijación de osteotomías en fémur de conejos (Vasenius et al., 1990). Así mismo se han utilizado fibras de PLGA para rellenar defectos corticales en la tibia de conejos, produciéndose neoformación vascular y crecimiento óseo (Winet et al., 1995), resultados similares se han obtenido con membranas de PGA (Ashammakhi et al., 1995). Thomson et al. (1995), emplean PLGA 50:50 para elaborar una espuma que actúa como soporte para inducir el crecimiento celular, los resultados pusieron de manifiesto que sus propiedades mecánicas dependen: del peso molecular y de la degradación del polímero utilizado y, de la porosidad del sistema, indicando que el PLGA 50:50 empleado no es un material adecuado como sustitutivo trabecular óseo. Sin embargo, implantes cilíndricos de PLGA de distinta composición (García et al., 1996); inducen formación osteoide que va ocupando el espacio que se forma como consecuencia de la degradación del polímero y transformándose en hueso maduro normal.

Las propiedades mecánicas del PLA y PGA se han aprovechado para la fabricación de placas y tornillos para su utilización en el tratamiento de fracturas (Losken et al. 1994; Springer et al., 1998; Abate et al., 1998; Yoneda et al., 1999).

El uso de polímeros como sustitutos del tejido óseo está lo suficientemente probado, así como su biodegradación en metabolitos no tóxicos. Debido precisamente a estas propiedades han sido considerados como materiales potencialmente óptimos para la elaboración de sistemas de cesión de fármacos en hueso.

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. Se han estudiado implantes de PLA con dideoxikanamicina B (Wei et al., 1991), implantes de PLGA con gentamicina (Garvin et al., 1994), implantes elaborados por compresión de L-PLA y de mezcla de PLGA y dl-PLA, conteniendo un 10% de gentamicina (Schmidt et al., 1995) y microesferas de PLA con gentamicina (Meyer et al., 1998). En general en los estudios mencionados se compara la cesión *in vitro* de las formulaciones elaboradas con las perlas de PMMA comerciales y se estudian *in vivo* las formulaciones de polímero elaboradas para demostrar su biocompatibilidad y capacidad osteoconductora, valorándose así mismo la eficacia del sistema para tratar una infección previamente provocada. Los autores indican que estos sistemas son unos buenos candidatos para la administración de antibióticos *in situ* en infecciones óseas. Sin embargo, hay que mencionar que estos estudios adolecen de una buena caracterización de estas formulaciones.

Aunque llama la atención el gran número de publicaciones en las que se elaboran distintos sistemas para cesión ósea local de gentamicina, también se han estudiado otros antibióticos. Así la tetraciclina, incorporada en finas películas de PLGA, ha sido empleada para el tratamiento de la enfermedad periodontal; su aplicación en humanos proporciona concentraciones terapéuticas en el foco de infección a lo largo de 10 días (Maze et al., 1995)

La bleomicina, antibiótico anticancerígeno, también ha sido formulada en matrices de PLA de diferente peso molecular o mezclas de polímeros de distinto peso molecular. La cesión de este antibiótico se puede prolongar entre tres y seis semanas según la composición del sistema (Nakamura et al., 1995).

El PLA y PLGA han sido utilizados para la fabricación de implantes con vancomicina, en el estudio se lleva a cabo la caracterización de la cinética de cesión *in vitro*. Mientras que *in vivo* (tibia de conejos) se comprueba la eficacia de estos implantes para el tratamiento de osteomielitis, provocadas con *Staphylococcus aureus*, valorando la evolución de la infección. Los resultados indicaron que la disminución del número de colonias fue significativamente mayor en el grupo de animales tratados con desbridamiento quirúrgico e implantes con antibiótico, que en los grupos no tratados o tratados mediante terapias antiinfecciosas convencionales (Calhoun y Mader, 1997).

Uno de los grupos de antibióticos más ampliamente estudiados como posibles candidatos para el tratamiento de osteomielitis incorporados en matrices de polímeros biodegradables son las fluorquinolonas. Cabe destacar la publicación de Overbeck et al., 1995, el estudio se lleva a cabo *in vivo* con implantes elaborados con PGA conteniendo ciprofloxacino. Se comprueba la difusión del antibiótico a lo largo del fémur de conejos. Los resultados indican que los niveles iniciales son muy elevados, lo que significa una liberación importante de antibiótico, seguida de una cesión más lenta que permite mantener niveles de ciprofloxacino por encima de la concentración mínima inhibitoria para el *S. aureus* durante la primera semana a lo largo de la zona que se encuentra a 30 mm del implante. Los autores concluyen que los niveles de antibiótico pueden ser suficientes para erradicar una infección (Overbeck et al., 1995). Posteriormente Ramchandani et al. (1998) encuentran que se mantienen concentraciones superiores a las mínimas inhibitorias durante un periodo de seis semanas a lo largo de 70 mm en fémur de conejos con implantes elaborados por compresión de microesferas de PLGA con ciprofloxacino.

Otro antibiótico, de este mismo grupo, que ha sido ensayado para comprobar su eficacia en infección ósea es el ofloxacino incluido en una

matriz de PLGA. Este sistema resultó ser eficaz tanto en el tratamiento de osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa* como por *Staphylococcus aureus* inducidas en animales de experimentación. Los resultados indicaron una tasa de curación superior con el sistema de liberación local que con el mismo antibiótico por vía sistémica. El estudio radiológico e histopatológico demuestra que dicho polímero es un excelente vehículo para obtener concentraciones altas de antibiótico en el lugar de infección (Nie et al, 1998; Nicolau et al. 1998).

Habib et al. (1999) llevan a cabo el desarrollo y caracterización de microesferas de PLGA conteniendo ofloxacino, elaboradas por la técnica de emulsión- evaporación del disolvente. En este trabajo se estudia la influencia de ciertas variables tecnológicas (volumen de fases, concentración de alcohol polivinílico y viscosidad de la fase interna) sobre la eficacia de encapsulación y la cinética de cesión de ofloxacino en estas microesferas *in vitro*. La importancia de este estudio radica, como los propios autores ponen de manifiesto, que se pueden conseguir distintas cinéticas de cesión del ofloxacino variando los parámetros tecnológicos y que por lo tanto este tipo de sistemas puede ser adecuado para el tratamiento de infecciones óseas.

Otro sistema diseñado como vehículo de fluorquinolonas es el propuesto por Kanellakopoulou et al. (1999), que consiste en la preparación de implantes de L-PLA de 2 kD y dl-PLA de 26 y 100 kD con ciprofloxacino o perfloxacino mezclando polímero y antibiótico a alta temperatura y posterior enfriamiento. Se estudia la cesión de estos antibióticos *in vitro* así como la degradación de los polímeros. Los autores señalan que las concentraciones alcanzadas en el medio de cesión son superiores a las mínimas inhibitorias para los microorganismos más frecuentemente causantes de infecciones ósea; si bien indican que los implantes de dl-PLA, de mayor peso molecular, pueden ser más convenientes para ensayarlos *in vivo*, pues tanto la cesión como la degradación de los polímeros es más lenta y cabe esperar que

ambos procesos sean más rápidos *in vivo*. Sin embargo, el pico de cesión se produce a tiempos más cortos *in vitro* con el polímero de mayor peso molecular. De hecho, posteriormente Kanellakopoulou et al., 2000 prueban la eficacia de los implantes de L-PLA de menor peso molecular (2 kD) con perfloxacino frente a *Staphylococcus aureus* metilcilina resistentes en conejos. La evaluación de la eficacia del sistema se lleva a cabo valorando la reducción del número de colonias de bacterias a lo largo del tiempo, observándose una disminución muy importante después de 33 días y no produciéndose ninguna recidiva, lo que a juicio de los autores supone que este sistema es eficaz para erradicar la infección.

## **B.- Otros polímeros**

Otros polímeros que también se han estudiado en este sentido son los copolímeros del óxido de polietileno/tereftalato de polibutileno (PEO/PBT) para la elaboración de implantes porosos cilíndricos, observándose que tras su implantación en fémur de cabras, se inicia en los poros del implante un cierto crecimiento de tejido óseo (Radder et al., 1996). Paralelamente, Bennet et al. (1996) desarrollaron un sistema que consiste en un copolímero de polidioxanona- co-glicolida que se endurece *in situ* por la adición de un catalizador y además, durante la reacción de polimerización se desprende dióxido de carbono que da lugar a la formación de una estructura porosa. Los resultados indican que este material crea una interfaz perfecta con el hueso y que permite el crecimiento de éste en su interior y por lo tanto pueden ser potencialmente empleados como vehículos de antibióticos para el tratamiento local de la infección ósea.

Las polianhidridas (bis-carboxifenoxipropano y ácido sebáico 50:50) han sido también empleada para la elaboración de implantes con gentamicina, comparándose su eficacia frente a implantes de PMMA-gentamicina e implantes blancos de ambos polímeros en ratas infectadas. Los



resultados mostraron una reducción del número de colonias significativamente mayor con polianhidrida-gentamicina, pero persiste un cierto número de colonias tras tres semanas de la implantación. Los autores indican que, para optimizar la eficacia de este sistema, es necesario optimizar la carga de gentamicina y caracterizar la cinética de cesión y de degradación del polímero (Laurencin et al., 1993).

El quitosán es otro polímero de origen natural que se ha estudiado como material de elaboración de sistemas cilíndricos para la liberación de antibióticos en el lugar de infección, en concreto la gentamicina es cedida de forma gradual consiguiendo mantener concentraciones superiores a las CMI durante unas 8 semanas, siendo el material totalmente osteocompatible (Aimin et al. 1999).

Otro tipo de polímeros que se ha venido investigando como posibles candidatos para la formación de sistemas de liberación local de antibióticos en hueso son los polímeros de origen microbiano en concreto el polihidroxi-butilato-co-hidroxi-valerato que se considera biodegradable y osteoconductor debido a sus propiedades piezoeléctricas, y además conteniendo sulbactam-cefoperazona resultó ser eficaz para el tratamiento de la infección ósea (Yagmurlu, et al.1999).

Recientemente los polihidroxi-alcatoatos se han utilizado para la fabricación sistemas conteniendo sulperazona y duocid. Los resultados obtenidos indican que estos nuevos sistemas son eficaces en el tratamiento de la infección ósea y además también presentan una cierta capacidad osteoconductor que estimula la regeneración ósea (Gursel et al. 2001, Korkusuz et al. 2001). Sin embargo, es sorprendente la eficacia de este tratamiento cuando el antibiótico es completamente cedido durante la primera semana. Estos autores llevan a cabo el estudio y caracterización morfológica de los implantes *in vivo* e *in vitro*, indicando que tanto las modificaciones sufridas por el sistema como la cesión de los antibióticos son más rápidas y

más acusadas *in vivo* que *in vitro*. Los autores apuntan que estos materiales pueden ser mejores que el PLGA, sin embargo observan que deben ser estudiados en las mismas condiciones para llegar a resultados definitivos.

### **C.- Mezclas polímeros y compuestos inorgánicos**

En este apartado hemos recogido las publicaciones más relevante en lo que respecta a implantes elaborados con mezclas de polímeros tanto naturales como sintéticos y fosfatos cálcicos.

Thoma et al. (1992) elaboran implantes de fosfato tricálcico con una cierta proporción de palmitoilestearilglicerilo (Precirol) y gentamicina como sistemas de administración *in situ*. Estos implantes fueron evaluados *in vivo* e *in vitro*, estudiando la liberación del antibiótico, la biocompatibilidad, así como la influencia de la porosidad en la velocidad de liberación, y la reacción histológica en tejido óseo de ratas y conejos. Los autores concluyen que la velocidad de cesión de gentamicina depende de las características de la matriz hidrofílica de cerámica, que vienen dadas por el tamaño y estructura de los poros y por la cantidad de excipiente incorporado en la matriz. La cesión *in vivo*, determinada a través de los niveles de antibiótico en orina, fue más lenta en ratas que *in vitro*; si bien ocurre lo contrario en conejos, atribuyendo estas diferencias a distintos flujos sanguíneos según la especie animal. Histológicamente los implantes son bien tolerados y se comprueba que la degradación de los mismos se retrasa con la presencia de precirol en la formulación debido a una disminución del volumen libre de los poros.

Actualmente la utilidad de los cementos óseos como base para la aplicación local de antibióticos se sigue investigando, así composites formados por fosfato cálcico y gelatina se han estudiado como sustitutos óseos y sistemas de cesión de antibióticos, los resultados indican que la liberación de la gentamicina es más rápida *in vivo* que *in vitro* posiblemente debido, según los autores, a una mayor degradación de la gelatina. Además,

estos implantes permiten la formación de hueso nuevo ya que histológicamente se observa la penetración de tejido conectivo en la matriz, indican también que se aprecia una moderada reacción a cuerpo extraño, particularmente a la gelatina. Aunque se apunta la posible utilidad de estos sistemas, hemos de poner de manifiesto que la liberación inicial de la gentamicina es realmente elevada tanto *in vivo* como *in vitro* (Yaylaoglu et al. 1999).

Se han estudiado también implantes que consisten en un bloque de fosfato cálcico que lleva embutido en su interior otro bloque constituido por L-PLA de 100 kD, fosfato cálcico y gentamicina (Sasaki e Ishii, 1999). Los autores justifican la presencia exterior de fosfato cálcico como un material con mejores propiedades osteoinductores que el PLA y sus copolímeros. Las dosis de gentamicina cedidas *in vitro* e *in vivo* resultaron eficaces para prevenir el desarrollo de osteomielitis e inducir la formación de hueso en un modelo experimental desarrollado en conejos.

En esta misma línea hemos de citar los trabajos elaborados por nuestro equipo de investigación. En Soriano y Évora (2000) se compara 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 de la cinética de degradación de los polímeros formadores 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 puede prolongar más de 8 semanas, mientras que la dosis total de antibiótico contenida en las perlas de PMMA fue liberada totalmente en dos semanas. Posteriormente Sánchez et al. (2000) 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 MIC para el *Staphylococcus aureus* a lo largo de 4 semanas y se prueba 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*, se 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 que sufre el PLA tanto de la matriz como del recubrimiento *in vivo*, consecuencia del crecimiento celular que se observa microscópicamente en el interior del implante (Baro et al., 2002).

Por otro lado, cabe destacar los trabajos llevados a cabo por Martins et al., 1998 y Conceição et al., 2000, en cuanto a la retención de ciprofloxacino y norfloxacino por parte de la hidroxiapatita empleada en la elaboración de composites formados por mezcla de éste fosfato cálcico con colágeno aniónico. Estos autores indican que estas fluorquinolonas se combinan con el calcio de la hidroxiapatita formando un complejo por lo que la liberación de estos antibióticos se encuentra controlada por la velocidad de resorción o de disociación del complejo.

A pesar de los resultados que se acaban de exponer, no se ha conseguido el sistema ideal y se continua investigando para conseguir un sistema que proporcione las concentraciones adecuadas para erradicar la infección y que a la vez se degrade o se reabsorba y no sea necesario retirarlo una vez que se ha liberado la totalidad de la dosis. Desde nuestro punto de vista algunos de estos objetivos han sido alcanzados de forma parcial. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones han ido orientadas a la elaboración de formulaciones de cesión prolongada de antibióticos y a su

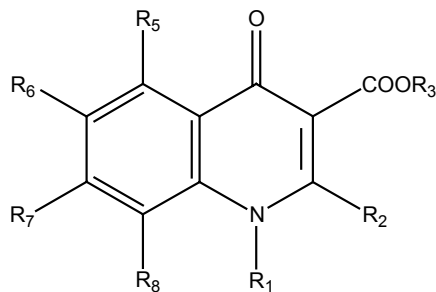
evaluación en cuanto a eficacia, concentraciones o disminución del número de colonias, pero sin estudiar en detalle los factores que pudieran intervenir en el control de la cesión del fármaco.

## CIPROFLOXACINO

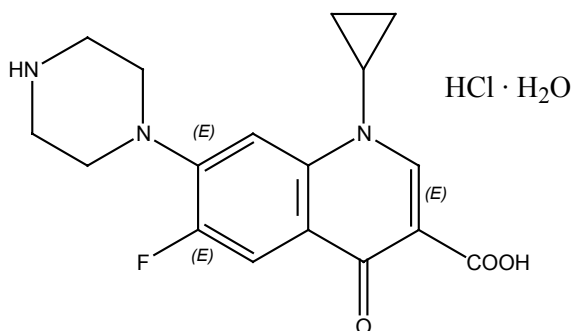
### 1.- Estructura y propiedades fisicoquímicas

El ciprofloxacino, es un antibacteriano, con acción bactericida, que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas.

La estructura general de las 4-quinolonas es:



La estructura química del clorhidrato de ciprofloxacino (hidrocloruro del ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolino-carboxílico) es:

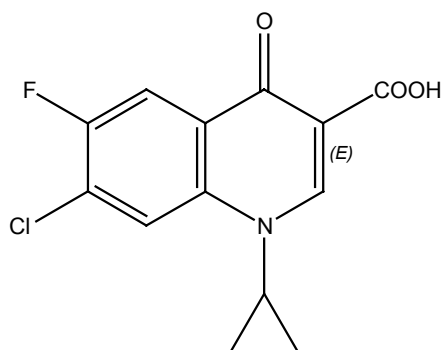


Es un polvo cristalino, amarillo pálido, soluble en agua, poco soluble en metanol, muy poco soluble en etanol, prácticamente insoluble en acetato de etilo, acetona y cloruro de metileno (Real Farmacopea Española, 1ª edición).

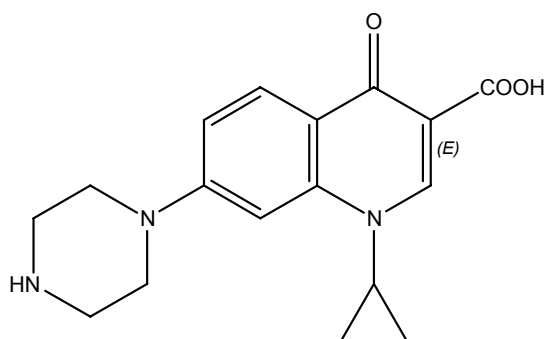
El clorhidrato de ciprofloxacino contiene no menos del 98.0% y no más del equivalente al 102.0% del hidrocloreto del ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolino-carboxílico, calculado con referencia a la sustancia anhidra.

Presenta una serie de impurezas como son:

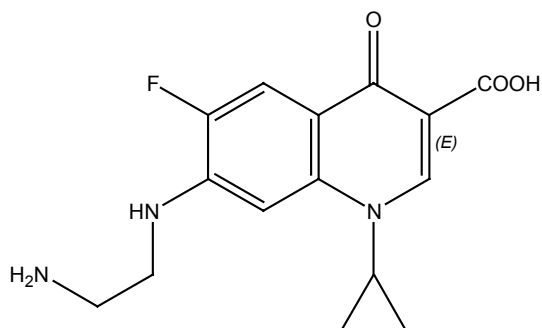
- Ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-quinolina-3-carboxílico (ácido Fluoroquinolónico).



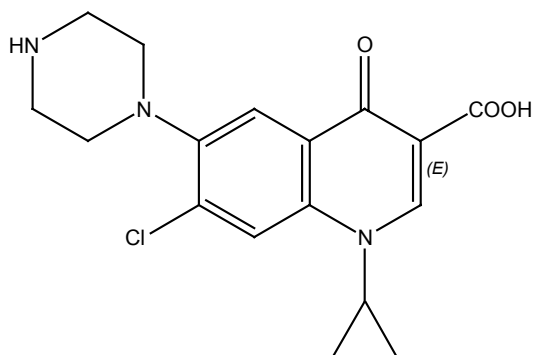
- Ácido 1-ciclopropil-1,4-dihidro-4-oxo-7(piperacina-1-il)-quinolina-3-carboxílico (componente desfluorado).



- Ácido 7 [(2 – aminoetil) amino] - 1 – ciclopropil- 6 – fluoro- 1,4 – dihidro- 4 – oxoquinolina – 3 – carboxílico ( componente etilendiamina ).

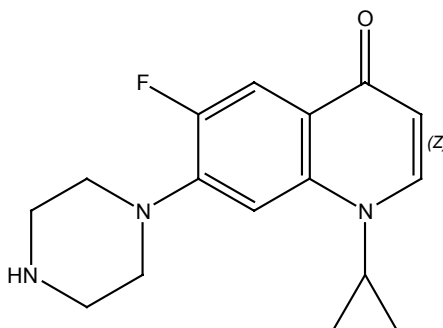


- Ácido 7 – cloro – 1 – ciclopropil – 1,4 –dihidro – 4 – oxo – 6 – ( piperacín – 1 – il ) quinolina – 3 – carboxílico.





- 1 – ciclopropil – 6 – fluoro – 1,4 – dihidro – 4 – oxo- 7 – ( piperacin – 1 –il ) quinolina ( componente descarboxilado).



Existe una clara asociación entre la estructura química, la actividad, y los efectos secundarios de estas sustancias. La mayor actividad antibacteriana y el espectro más amplio corresponden a la incorporación de un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula y también de un grupo piperazina heterocíclico en la posición 7. El átomo de flúor en C<sub>6</sub>, controla la unión y los efectos sobre el complejo DNA-girasa, y la penetración intrabacteriana, aumentando notablemente la potencia. Los sustituyentes en N<sub>1</sub> determinan la estabilidad de la molécula y la potencia antibacteriana; el grupo etil confiere estabilidad, el grupo ciclopropil, de pequeño tamaño y característico de ciprofloxacino, va a aumentar la potencia.

El ácido carboxílico en posición 3 y el cetónico en la 4 no pueden ser modificados, porque son esenciales para la unión a la girasa bacteriana y para el transporte intrabacteriano del antibiótico. Las sustituciones en posición 5 controlan también la potencia y favorecen la acción sobre G(+), siendo los radicales -NH<sub>2</sub>, -OH y -CH<sub>3</sub> los más adecuados. Diferentes radicales en C<sub>7</sub> controlan la potencia, el espectro y la farmacocinética. Los más eficaces son los anillos heterocíclicos de 5 ó 6 elementos, como

piperazina, que aumenta la potencia sobre G(-), y la pirrolidina, que la aumenta sobre G(+). En el grupo piperazínico se pueden incorporar otros adicionalmente, como el metil, mejorando las condiciones farmacocinéticas. Las sustituciones por átomos de flúor, cloro, nitrógeno ó grupos aromáticos en la posición 8 determinan cambios en la farmacocinética y en la actividad, incluyendo anaerobios.

## **2. - Actividad antimicrobiana *in vitro***

La actividad de las quinolonas de primera generación como el ácido nalidíxico está limitada a unos pocos géneros de bacterias Gram (-) aerobias, sobre todo enterobacterias, siendo las CMI  $\geq 2$  mg/l. Las fluoroquinolonas de segunda y tercera generación tienen un espectro y actividad intrínseca mayores, con CMI que pueden llegar a ser mil veces inferiores para los géneros *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*, *Gardnerella*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Vibrio* y *Aeromonas*, siendo también activas sobre *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Yersinia*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia* y *Brucella*, entre otros.

La actividad frente a las bacterias anaerobias es moderada ó nula en el caso concreto de *Bacteroides fragilis*, con excepción de las de última generación como trovafloxacino, moxifloxacino, que con 2 mg/l, inhiben el 90% de estos patógenos, cifra próxima ó superior a la de los anaerobicidas clásicos como clindamicina, metronidazol, cefoxitina, imipenen y meropenem.

## **3.- Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción es bastante complejo y todavía sin resolver completamente.

Las quinolonas van a actuar en cuatro etapas: paso a través de las porinas de la pared bacteriana y de la membrana citoplasmática hasta llegar al citoplasma, inhibición de la enzima DNA-girasa y de la topoisomerasa IV, inhibición de la síntesis de DNA y proteica, e inducción de la respuesta SOS y de autolisinas, lo que conduce a la formación de bacterias filamentosas en el caso de los G(-), y a un rápido efecto bactericida.

Algunos factores pueden afectar a la acción de las quinolonas, aumentando ó disminuyendo su actividad. Está demostrado que el ión  $Mg^{++}$ , el pH bajo y el incremento del inóculo, la disminuyen, mientras que no se modifica por la mayor presencia de suero ni por el ambiente anaerobio o microaerófilo. El pH bajo y la mayor concentración de  $Mg^{++}$  en orina, explican que algunas quinolonas presenten una reducción de la actividad, en este medio.

Existe un sinergismo en el 70% de los casos, en la asociación de las quinolonas con antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos frente a G(-) y con los glucopéptidos sobre G(+); sin embargo presentan antagonismo con la rifampicina frente a *Staphylococcus aureus* y con los aminoglucósidos sobre *Enterococcus faecalis*.

#### **4. - Resistencia**

La tasa de aparición de mutantes es baja, entre  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$ , manifestándose más cuanto menor es la actividad de la quinolona y dependiendo del género y número de bacterias. Cuanto más actividad intrínseca tiene una quinolona más tarda en aparecer la resistencia clínica.

Los mecanismos de adquisición de resistencia son varios: por modificación enzimática de las subunidades de la DNA girasa en la topoisomerasa II, por alteración de la permeabilidad de las porinas de la pared celular y por aumento de la expulsión del antibiótico mediante bombas de flujo. Varios de estos mecanismos pueden coexistir en la misma bacteria.

Como las quinolonas inhiben la DNA-girasa de las bacterias, es poco probable que aparezcan cepas resistentes codificadas por plásmidos, e incluso son capaces de eliminarlos. El ciprofloxacino, puede curar plásmidos de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*.

### **5.- Farmacocinética**

A diferencia de las primeras quinolonas, las fluoroquinolonas se caracterizaron por:

- Rápida absorción por vía oral.
- La concentración en orina excede las CMI de todos los patógenos bacterianos comunes.
- Amplia distribución en los tejidos, el volumen de distribución varía de 2,1 a 5 l/kg. La unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 30%.
- Su eliminación es fundamentalmente renal aunque una pequeña parte se metaboliza en el hígado. Menos de un 1% se puede encontrar en bilis.
- La vida media es lo suficientemente larga como para permitir que la dosificación se realice en intervalos de 12 a 24h.
- Presentan farmacocinética lineal.

### **6. - Toxicidad**

En general son antibióticos bien tolerados. El porcentaje medio de reacciones adversas es inferior al 5%.

Pueden afectar al aparato digestivo (5-15%), manifestándose en forma de náuseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal. Las manifestaciones cutáneas por reacciones alérgicas son poco comunes entre 0.4% a 2.2%, e incluyen eritemas, urticaria, prurito generalizado y erupciones, en general producidas por fotosensibilidad. La fotosensibilidad se relaciona con el tipo de

quinolona, con la dosis y tiempo de exposición a la luz. La incidencia es menos del 1% para el ciprofloxacino. En cuanto al aparato urinario, se ha observado en ocasiones, elevación de los títulos de creatinina en enfermos tratados (incidencia del 0.2% al 1%). Excepcionalmente se ha descrito algún caso de cristaluria, está relacionado con el grado de solubilidad de la quinolona, pH urinario, fallo renal por acción directa ó por reacción de hipersensibilidad en adultos mayores de 60 años.

La terapia con quinolonas origina ocasionalmente alteraciones en parámetros analíticos, tales como elevación moderada de transaminasas (1%-3%), eosinofilia, neutropenias (menos 1%).

En animales de experimentación se ha observado que las quinolonas al ser ácidos orgánicos afectan a los cartílagos de conjunción, produciendo artropatías. Se produce una erosión irreversible del cartílago y derrames no inflamatorios en las articulaciones, causando anomalías esqueléticas en animales jóvenes. En humanos, sólo se ha observado en 1%, describiéndose casos de enfermos con molestias articulares, después de recibir dosis prolongadas. La experiencia en niños es escasa, en algunos casos tratados, han presentado síntomas articulares pero que son reversibles. De momento no es aconsejable el empleo de quinolonas en niños en períodos de crecimiento, gestantes ó madres lactantes salvo en casos de extrema necesidad, siempre valorando el riesgo / beneficio.

Las quinolonas también se han asociado a tendinitis y rotura de tendones de mano, hombros, principalmente del de Aquiles, siendo los enfermos de más riesgo los sometidos a tratamientos largos, con uso concomitante de esteroides.

## **7.- Aplicaciones terapéuticas**

El espectro de la actividad *in vitro* de las quinolonas ha evolucionado considerablemente desde la aparición del primer miembro de este grupo, el

ácido nalidíxico, que posee un espectro esencialmente limitado a algunas especies G(-).

Las 4-quinolonas más recientes, presentan una actividad considerablemente mayor que la mayoría de los agentes más antiguos. Presentan un espectro de actividad que aumenta notablemente frente a ciertos organismos aerobios G(-) y G(+). De ahí su utilidad en el tratamiento de numerosas infecciones. En concreto el ciprofloxacino está indicado para el tratamiento de:

- Infecciones respiratorias: bronconeumonía y neumonía, bronquitis aguda, bronquitis crónica, exacerbación pulmonar aguda de la fibrosis quística asociada a *P. aeruginosa* en adultos y niños de 5-17 años, bronquiectasia, empiema.
- Infecciones genitourinarias: uretritis complicadas y no complicadas, cistitis, anexitis, pielonefritis, prostatitis, epididimitis, gonorrea.
- Infecciones gastrointestinales: fiebre entérica, diarrea infecciosa.
- Infecciones osteoarticulares: osteomielitis, artritis séptica.
- Infecciones cutáneas y de tejidos blandos: úlceras infectadas, quemaduras infectadas.
- Infecciones sistémicas graves: septicemia, bacteriemia, peritonitis, infecciones en inmunodeprimidos con tumores hematológicos o sólidos.
- Infecciones de las vías biliares: colangitis, colecistitis, empiema biliar.
- Infecciones intra-abdominales: peritonitis, abscesos intra-abdominales.
- Infecciones pélvicas: salpingitis, endometritis, enfermedad inflamatoria pélvica.
- Infecciones otorrinolaringológicas: otitis media, sinusitis, mastoiditis.

## 8.- Utilización de ciprofloxacino en infecciones óseas

El tratamiento de pacientes que padecen de osteomielitis, en especial cuando ésta ha sido causada por bacilos aeróbicos G(-), independientemente de que la infección haya sido asociada con un dispositivo protésico o no, el éxito del tratamiento se puede conseguir con un diagnóstico microbiológico correcto, un tratamiento quirúrgico adecuado y una terapia antimicrobiana apropiada y prolongada. La osteomielitis como proceso infeccioso que afecta a la cortical ósea o a la cavidad medular exige que los antimicrobianos que se utilicen abarquen los siguientes aspectos: amplio espectro de actividad, poder de penetración en el hueso, ser relativamente no tóxicos, no inducir resistencia durante la terapia y permitir el tratamiento ambulatorio de la osteomielitis.

Varias fluoroquinolonas han demostrado su utilidad en el tratamiento de la osteomielitis crónicas, postraumáticas y posquirúrgicas, en las que son habituales las infecciones mixtas por *S. aureus*, *Pseudomonas* y otras bacterias G(-). Su administración se inicia por vía intravenosa, sobre todo en los casos más graves y complicados, pasando posteriormente a la vía oral durante un largo tiempo.

Las concentraciones de fluoroquinolonas alcanzadas en humanos en hueso tras la administración de dosis únicas de antibiótico por vía oral o IV son proporcionales a las dosis administradas y se encuentran entre 1 y 2 mg/kg para el ofloxacino y ciprofloxacino. Estos valores superan las MIC frente a *Enterobacteriaceae* y se encuentran en el intervalo de sensibilidad de estafilococos y una cierta proporción de especies de *Pseudomonas* (Lew y Waldvogel, 1995).

De entre las fluoroquinolonas, el ciprofloxacino, ha sido el más estudiado. Los tratamientos con este antibiótico se basan en la administración de 750 mg cada 12 horas por periodos que se prolongan desde 6 semanas a varios meses. La tolerabilidad se puede considerar aceptable: 28% de los

pacientes manifiestan sufrir efectos adversos leves tales como: náuseas, alteración de enzimas hepáticos o rash. En general los valores de respuesta terapéutica para tratamientos de 2 a 21 meses son de 56% (curación), 11% (mejoría) y 32% (fallo) (Lew y Waldvogel, 1999).



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El propósito de este trabajo de investigación es elaborar y caracterizar, tanto *in vivo* como *in vitro*, implantes compuestos de una mezcla de biomateriales y ciprofloxacino, que proporcione las concentraciones mínimas necesarias para erradicar una infección ósea. Para ello la liberación del antibiótico debe ser gradual y sostenida durante al menos 4 - 6 semanas y el sistema debe a su vez ser capaz de favorecer la regeneración del tejido óseo resecaado. Pretendemos por tanto, que la nueva formulación sea eficaz para el tratamiento de la osteomielitis en sus dos vertientes: tratar la infección y sustituir el tejido necrosado por nuevo tejido óseo.

Las etapas a cubrir son:

- 1ª.- Elaboración de implantes de ciprofloxacino con mezclas de fosfatos cálcicos y poliláctico.
- 2ª .- Caracterización de la liberación del antibiótico *in vitro*: estudio de los factores que controlan la cesión del ciprofloxacino desde los implantes elaborados.
- 3ª.- Caracterización de la liberación del antibiótico tras la colocación de implantes en el fémur de conejos: niveles alcanzados en hueso, estudio de los factores que controlan la cesión del ciprofloxacino y valoración de la capacidad osteoconductora del sistema.
- 4ª.- Estudio de la correlación *in vitro* – *in vivo*.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **MATERIAS PRIMAS**

En la elaboración de los implantes se utilizaron los siguientes los productos: hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (HAP) (Osteosynth), fosfato tricálcico,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (FTC) (Panreac), ácido DL-poliláctico (DL-PLA-30, Resomer® R203) (Boehringer Ingelheim KG) y clorhidrato de ciprofloxacino,  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (ciprofloxacino) donado gratuitamente por Laboratorios Bayer (Química Farmacéutica Bayer, S.A.).

## **CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS**

### **Análisis granulométrico de los componentes del implante**

El diámetro medio y la distribución de tamaño de las materias primas empleadas en la elaboración de los implantes: HAP, FTC, ciprofloxacino y DL-PLA-30, se realizó por difracción de luz láser utilizando un equipo Coulter®-LS 100. Se prepara para ello una suspensión diluida del polvo en tampón fosfato pH 7.4 y después de sonicar en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto para favorecer la desagregación del mismo, se realiza la medida. El tiempo de análisis fue de 90 segundos y el aparato se calibra con micropartículas de 500  $\mu\text{m}$ . Los resultados son expresados en diámetro medio en volumen.

### **Determinación del peso molecular medio y polidispersividad del polímero**

El polímero empleado en la elaboración de los implantes, ácido DL-poliláctico (DL-PLA-30, Resomer® R203), suministrado por Boehringer Ingelheim, tiene una viscosidad intrínseca declarada de 0,3 dl/g. Antes de su utilización se analizó por la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC) relativa a patrones de poliestireno monodispersos, de acuerdo con el

método que se detalla a continuación y se determinó su peso molecular medio en peso (Mw) y en número (Mn), así como la polidispersividad (pd) que nos da una medida de la dispersión de la curva de distribución.

La GPC se llevó a cabo utilizando un equipo Waters compuesto por: una bomba Model 510, inyector manual (Rheodyne®), refractómetro diferencial Model 410 que permite el control interno y externo de la temperatura, horno calefactor para el control de la temperatura de las cuatro columnas (Ultrastyrigel®) colocadas en serie y con tamaño de poro de  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  Å, respectivamente. La adquisición y el análisis de datos se realizaron con el programa Máxima 820, v. 3.30.

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron:

- Columnas: Ultrastyrigel.
- Temperatura: 31 °C (detector y columnas).
- Fase móvil: tetrahidrofurano (THF, Merck), filtrado (filtros Millipore FH con tamaño de poro de 0,5  $\mu\text{m}$ ) y desgasificado.
- Flujo: 0,9 ml/min.
- Tiempo de análisis: 50 min.
- Volumen de inyección: 25  $\mu\text{l}$  (patrones y muestras).
- Concentración: 0,05% (m/v) en el caso de los patrones y 0,5% (m/v) en el de las muestras a analizar. Tanto los patrones, como las muestras se disolvieron en THF.
- Número de replicados: 3

Para calibrar el sistema se emplearon patrones monodispersos de poliestireno con pesos moleculares de: 2.800, 5.570, 10.300, 43.900, 102.000, 190.000, 355.000 y 710.000 (Tokio Soda Ltd).



### **Análisis calorimétrico de los componentes del implante**

El PLA-30 y los fosfatos utilizados en la elaboración de los implantes fueron analizados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para su caracterización térmica. Los correspondientes termogramas se obtuvieron depositando las muestras (polvo) en cápsulas de alúmina. El equipo empleado fue un calorímetro diferencial de barrido Mettler (DSC 821<sup>e</sup> Mettler Toledo). Las medidas se realizaron en atmósfera de nitrógeno, empleando una cápsula vacía de referencia.

Se realizaron dos tipos de análisis:

- a) Análisis de posibles interacciones entre los fosfatos y el PLA-30 del implante. Para ello, tanto los componentes aislados como las mezclas se sometieron a un ciclo de temperatura desde 30°C a 250°C.
- b) Análisis para la determinación de la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) del PLA-30. Para ello, las muestras se sometieron a ciclos sucesivos de calentamiento/enfriamiento:  
Primer ciclo: temperaturas desde 30°C a 160°C,  
Segundo ciclo: temperaturas desde 160°C a -60°C  
Tercer ciclo: durante 10 minutos se mantiene el sistema a -60°C  
Cuarto ciclo: temperaturas desde -60°C a 160°C.

Los análisis se hicieron por triplicado, con un caudal de nitrógeno de 100 ml/min, a una velocidad de 10°C/min y una resolución < 7 m $\mu$ W.

### **Determinación de la estructura cristalina de los componentes del implante**

Las muestras de fosfatos, polímero y ciprofloxacino fueron analizadas por difracción de rayos X a temperatura ambiente con un difractor de

polvo (Philips XPERT), equipado con un monocromador secundario y utilizando 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 por paso de 3 s.

## **PREPARACIÓN DE LOS IMPLANTES**

Los implantes fueron preparados por compresión directa siguiendo el método que se describe a continuación.

- Preparación de la mezcla: en un mortero se mezclan en primer lugar, los fosfatos, HAP y FTC. Posteriormente se añade a la mezcla anterior el polímero y finalmente, el ciprofloxacino, en las proporciones adecuadas según la formulación a elaborar.
- Elaboración de los implantes: los implantes fueron preparados por compresión de 500 ó 1000 mg de mezcla utilizando un punzón de 6 mm en el caso de los implantes de 500 mg, y de 12 mm en el caso de los implantes de 1 g. Para ello se utilizó una prensa hidráulica (Carver) a temperatura ambiente, comprimiendo la mezcla durante cinco minutos a una presión determinada, 520 o 312 MPa. Posteriormente los implantes de 12 mm fueron cortados en paralelepípedos de aproximadamente 12 x 4 x 6 mm.

## **ESTUDIO *IN VITRO***

### **Método analítico para la determinación de ciprofloxacino**

El método analítico usado para la determinación de ciprofloxacino en los ensayos *in vitro*, fue el método directo por espectrofotometría (Shimadzu UV-VIS, modelo) a 277 nm.

a) Determinación del contenido de ciprofloxacino en los implantes

Para obtener las rectas de calibrado se utilizaron disoluciones patrones de ciprofloxacino en HCl 0,1 N de concentraciones comprendidas entre 2 y 9 µg/ml, preparadas a partir de una disolución de ciprofloxacino en HCl 0,1 N; El coeficiente de variación del método fue del 2,09%. La relación lineal entre absorbancia y concentración se ajustó a la siguiente ecuación:

$$y = 0,107x - 0,0503 \quad (R^2 = 0,998) \quad (\text{ec.1})$$

b) Determinación de ciprofloxacino en los implantes durante los ensayos de cesión

Las disoluciones patrones de ciprofloxacino, de concentraciones comprendidas entre 2 y 12 µg/ml, fueron preparadas en tampón fosfato pH = 7,4 a partir de una disolución de ciprofloxacino en HCl 0,1 N. El coeficiente de variación del método fue del 1,34%. La relación lineal entre absorbancia y concentración se ajustó a la siguiente ecuación:

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

**Determinación del contenido de ciprofloxacino en los implantes**

El ensayo de uniformidad en contenido de ciprofloxacino se llevó a cabo por triplicado. Se pesan cada uno de los implantes y se pulverizan. Cada implante pulverizado se añade a 100 ml de HCl 0,1 N y se agita durante 24 horas en un agitador magnético a temperatura ambiente y en oscuridad. Al cabo de este tiempo se toma una alícuota y se filtra a través de filtros Gelman GHP Acrodisc de 0,45 µm de diámetro de poro; 3 ml del filtrado fue analizado por el método espectrofotométrico descrito en el apartado anterior. La

eficiencia de contenido fue calculada como porcentaje de ciprofloxacino en la mezcla con respecto a la cantidad inicial empleada.

### **Ensayos de cesión *in vitro***

Para la realización de estos ensayos, los implantes se incubaron en tampón fosfato pH 7,4 (0,066 M) isotónico conteniendo 0,02% de azida-sódica (Merck) como agente bacteriostático. Las muestras se mantuvieron a 37°C sin agitación y protegidos de la luz.

Los ensayos se realizaron por triplicado para cada formulación en matraces Erlenmeyer de color topacio. A tiempos previamente establecidos se tomaba el volumen total de medio de cesión para determinar el ciprofloxacino 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.

### **Comparación de los perfiles de cesión**

Para comparar los perfiles de cesión *in vitro* de dos formulaciones, se utilizó el “factor de similitud”,  $f_2$  propuesto por Moore y Flanner (1996), calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left( 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - P_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{ec.3})$$

donde  $R_t$  y  $P_t$  son los porcentajes de ciprofloxacino 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.

### **Estudio de adsorción de ciprofloxacino a los componentes del implante**

Según varios autores (Overbeck et al., 1995, Conceição et al., 2000) el ciprofloxacino puede ser retenido por la hidroxiapatita. Por ello se llevaron a cabo ensayos de adsorción para poder detectar una posible interacción física o de Van der Waals reversible del ciprofloxacino con los componentes del implante.

Cuando se alcanza el equilibrio de adsorción, la relación existente entre la cantidad de adsorbato adsorbido físicamente por el adsorbente y la concentración de equilibrio, a temperatura constante, conduce a una isoterma de adsorción. Con frecuencia, la isoterma de adsorción de una disolución diluida se asemeja a una curva del tipo I, y puede representarse por la ecuación de Freundlich o por la de Langmuir. Sin embargo, cuando los fármacos son adsorbidos en forma de capas de espesor superior al de una monocapa, las curvas resultantes son de otra naturaleza (Martín, 1967; Glasstone, 1972). La isoterma de Freundlich toma la siguiente forma:

$$y = \frac{x}{m} = kc_{eq}^{1/n} \quad (ec.4)$$

donde,  $C_{eq}$  es la concentración de equilibrio (concentración final);  $x$  es la cantidad de sustancia adsorbida, calculada a partir de las concentraciones inicial y final y del volumen de disolución empleado;  $m$  es la cantidad de adsorbente y por tanto  $y$ , será la masa adsorbida por unidad de masa de adsorbente. Las constantes  $k$  (constante de afinidad) y  $n$  se pueden calcular a partir de los datos experimentales. Esta ecuación se utiliza normalmente en

su forma logarítmica puesto que su representación gráfica conduce a una línea recta siendo  $\log K$ , la ordenada en el origen y  $1/n$ , la pendiente de la recta:

$$\log \frac{x}{m} = \log k + \frac{1}{n} \log c_{eq} \quad (ec.5)$$

Para llevar a cabo este estudio se realizaron tres ensayos, uno por cada componente en las siguientes condiciones: 100 mg de PLA-30, 100 mg de HAP y 100 mg de FTC suspendidos en disoluciones de ciprofloxacino en tampón fosfato pH = 7,4 de 5, 10, 15, 20, 30, 50, 80 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . El sistema se mantuvo a 37°C con agitación durante 2 horas y protegido de la luz.

### **Evolución temporal de las características de los implantes**

Se llevó a cabo mediante el estudio de porosidad, captación de agua, pérdida de masa y microscopía electrónica de barrido (SEM).

#### • **Porosimetría por intrusión de mercurio**

La porosidad de los implantes de cada formulación fue determinada usando un porosímetro por intrusión de mercurio (Micromeritics Pore Sizer 9305). La distribución del volumen de poros (poros  $> 0,1 \mu\text{m}$ ) fue evaluada, a partir de los datos obtenidos, usando la ecuación propuesta por Washburn, asumiendo poros circulares, una tensión superficial de 480 mN/m para el mercurio y un ángulo de contacto entre el mercurio y el material de 130°.

Las condiciones experimentales empleadas fueron las siguientes:

- Penetrómetro de sólidos de 4,5 cm<sup>3</sup> de volumen
- Volumen aproximado ocupado por la muestra: 30%
- Intervalo de presiones de trabajo: 0,8 - 2500 0 psi
- Replicados: 3

- Captación de agua y pérdida de masa

Estos estudios se llevaron a cabo en las mismas condiciones que los ensayos de cesión *in vitro*. Los implantes fueron pesados (peso inicial) y puestos en el medio citado anteriormente. A intervalos predeterminados de tiempo, se retiran los implantes del medio, se elimina el exceso de agua y se pesan (peso húmedo). A continuación se dejan secar durante 7 días a vacío en un desecador con pentóxido de fósforo (Merck) a temperatura ambiente y se vuelven a pesar (peso final). Los porcentajes de captación de agua y de pérdida de masa fueron estimados mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{captación de agua (\%)} = \frac{M_h - M_f}{M_f} \times 100 \quad (\text{ec.6})$$

$$\text{pérdida de masa (\%)} = \frac{(M_i - M_c) - M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{ec.7})$$

donde:  $M_h$  es el peso húmedo;  $M_f$  es el peso final;  $M_i$  es el peso inicial y  $M_c$  es la cantidad cedida de ciprofloxacino. Por tanto, la pérdida de masa de los implantes fueron calculados corrigiendo el peso inicial de éstos por la cantidad de ciprofloxacino cedido a cada tiempo.

- Microscopía electrónica de barrido

Esta técnica fue usada para la caracterización morfológica de la superficie y estructura interna de los implantes, observando tanto las muestras superficiales como los cortes transversales. Para ello, las muestras se recubrieron previamente con una película de oro-paladio bajo una atmósfera de argón y fueron examinadas al SEM (Jeol JSM-632) a 15 kV.

### **Evolución temporal de los componentes del implante**

Este estudio se llevó a cabo mediante la determinación de la estructura cristalina y características térmicas de los componentes del implante y, la degradación del polímero. Para ello los implantes son incubados y a tiempos preestablecidos se retiran del medio de cesión, se elimina el exceso de agua y se mantienen en un desecador con pentóxido de fósforo durante 7 días. Los implantes secos se almacenan en frascos herméticamente cerrados con silicagel (Merck), en nevera a 4°C hasta su posterior análisis.

#### **a) Análisis por Difracción de Rayos X**

Para el estudio de la estructura cristalina se procedió a analizar por difracción de rayos X, en las condiciones previamente detalladas, tanto la mezcla inicial de fosfatos como los implantes recién elaborados y después de un periodo de incubación de 1 y 8 semanas.

#### **b) Análisis de los fosfatos por DSC**

Este análisis se realizó en implantes elaborados sin antibiótico porque el ciprofloxacino a elevadas temperaturas sufre un proceso de descomposición. Los tiempos de incubación seleccionados para determinar los cambios en los fosfatos integrantes de la matriz fueron 0, 1 y 8 semanas.

#### **c) Estudio de la degradación del polímero mediante GPC y DSC**

El seguimiento de la degradación del polímero durante los ensayos de cesión *in vitro*, se llevó a cabo determinando la variación de los pesos moleculares y de la temperatura de transición vítrea después de 0, 1, 2, 4 y 8 semanas en incubación. Se utilizaron dos técnicas: GPC para la determinación de los pesos moleculares y DSC para la temperatura de transición vítrea.



- Tratamiento de muestras para GPC: los implantes son pulverizados y tres alícuotas de cada uno fueron tratadas con tetrahidrofurano (THF, Merck) para disolver el polímero constituyente del implante. La degradación del polímero fue medida determinando los pesos moleculares medios en peso y número y la polidispersividad a lo largo del ensayo.
- Tratamiento de las muestras para DSC: en este caso, el polímero fue analizado por calorimetría diferencial de barrido a lo largo del ensayo de cesión *in vitro* para determinar su temperatura de transición vítrea, empleando las condiciones y el equipo anteriormente descrito. Las muestras son obtenidas por pulverización de los implantes secos, colocando una cierta cantidad (alrededor de 5 mg) en las cápsulas de alúmina.

## **ESTUDIO *IN VIVO***

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

### **Animales de experimentación**

Los ensayos *in vivo* se realizaron en conejos machos de raza Neozelandesa albinos, con pesos comprendidos entre 3 y 4 kg.

Los animales antes y después de someterlos a la intervención quirúrgica que a continuación se describe, se alojaron en el estabulario de la Universidad de La Laguna, en jaulas y condiciones de acuerdo con la normativa europea vigente.

### **Técnica quirúrgica**

En primer lugar se pesa el animal y se anestesia administrando una disolución de ketamina (35 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) por vía intramuscular. Una vez anestesiado, se procede al afeitado de la pata trasera derecha.

Posteriormente se le traslada al área quirúrgica, donde se realiza la limpieza de la zona a intervenir, delimitándola seguidamente con povidona yodada (Betadine®). Los conejos, preoperatoriamente, reciben una dosis de 25 µg/kg de buprenorfina (Buprex®), como analgesia para el postoperatorio.

Tras la colocación de los campos para aislar la zona, se realiza un abordaje de unos 2,5 centímetros, longitudinal, en la región parapatelar externa (Figura 1), 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 (Figura 2) (Wei et al., 1991). 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 (Figura 3), respetando la inserción femoral de los ligamentos cruzados, con una fresa Shanon Burr de 6 mm, idéntica a las empleadas en la cirugía percutánea del pie, adaptadas a un motor eléctrico (Minicraft) que alcanza unas 1.200 rpm. 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 introduce en la cavidad creada (Figura 4).

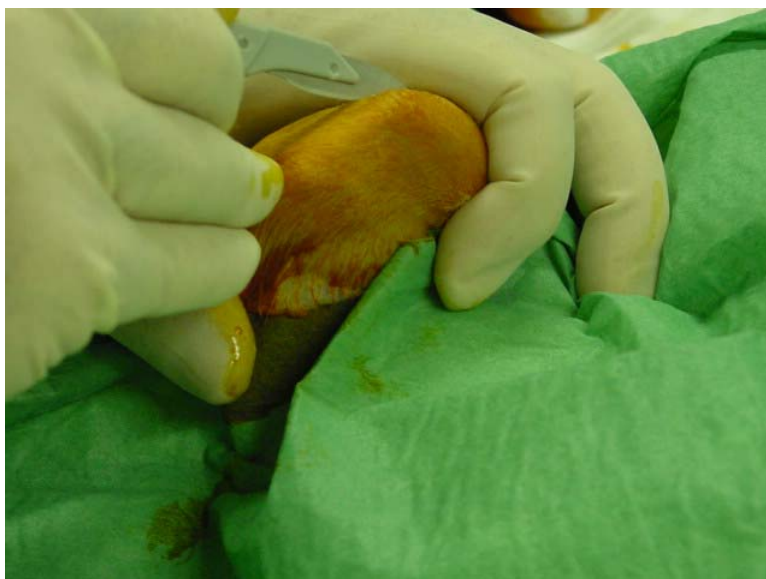
Tras la limpieza meticulosa de la viruta ósea, producto del fresado, para evitar las posibles calcificaciones periarticulares que alterarían los resultados radiológicos, se procede en primer lugar a la reducción de la rótula, para continuar con la sutura por planos, con material reabsorbible del 4/0. La piel se sutura con material no reabsorbible (Figuras 5 y 6).

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 a continuación se coloca cada animal en una jaula independiente, provista de comida y agua, en un ambiente tranquilo y silencioso.

Posteriormente y tras recuperarse de la anestesia, aproximadamente al cabo de 20-30 minutos, se permite que el animal cargue libremente sobre la pata operada.

Los conejos reciben cada 8-12 horas una dosis de buprenorfina de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , durante las 36 primeras horas del periodo postoperatorio y durante los cuatro primeros días del postoperatorio, se aplica Povidona yodada a la herida operatoria y se controla el estado general de animal.



**Figura 1.-** Incisión pararotuliana tras afeitado .



**Figura 2.-** Artrotomía de la rodilla



**Figura 3.-** Preparación del orificio



**Figura 4.-** Introducción del implante



**Figura 5.-** Sutura de la cápsula articular



**Figura 6.-** Cierre de la piel

### **Determinación de ciprofloxacino *in vivo***

La valoración de ciprofloxacino, remanente en el implante y en las muestras biológicas, fue llevada a cabo empleando el método microbiológico que se describirá posteriormente.

### **Protocolo de muestreo**

El estudio en conejos se llevó a cabo con dos formulaciones y 38 animales, divididos en tres grupos:

Grupo I: 3 animales para un estudio control

Grupo II: 9 animales para el estudio de una de las formulaciones.

Grupo III: 26 animales para el estudio de la otra formulación.

- Muestras óseas:

Grupo I: este grupo se utilizó con dos fines: el estudio radiológico e histológico control y por otro lado, el seguimiento de la evolución de las alteraciones del implante. Para ello, se insertó en el fémur derecho del animal un implante blanco elaborado solo con fosfatos y PLA-30, a una presión de 312 MPa y en el izquierdo el implante objeto de estudio. Los conejos fueron sacrificados después de 1, 4 y 8 semanas, con una dosis letal de pentobarbital sódico, previamente anestesiados con la mezcla de ketamina y xilacina. Para asegurar la muerte del animal, tal como se recomienda en estos casos, se procede a la sección del diafragma. Inmediatamente después se realiza la extracción del fémur en el que previamente se le había colocado el implante, desarticulándolo de la rodilla y de la cadera y extrayéndolo con la mínima cantidad posible de tejido muscular.

Para el análisis radiológico e histológico se mantiene la pieza de fémur en una disolución de formaldehído al 10% hasta la realización del mismo.

El implante colocado en la pata izquierda es extraído y dividido en tres secciones, una se reserva para el estudio microscópico (SEM), mientras que las otras dos son pulverizadas para analizarlas por GPC y DSC, con el fin de determinar el peso molecular del polímero y su Tg, respectivamente.

Grupo II: formado por nueve animales, tres para cada tiempo, destinados al estudio de una de las formulaciones elegidas. Los conejos fueron sacrificados después de 1, 2 y 4 semanas siguiendo el método descrito anteriormente. Además del fémur, se les extraía también la tibia. Las muestras se utilizaban para la extracción de ciprofloxacino remanente en tejido óseo y en implante.

Grupo III: en este tercer grupo, destinado al estudio de otra de las formulaciones elegidas, los 26 conejos fueron sacrificados de igual manera

que los anteriores, después de 3 días, 1, 2, 3, 4 y 6 semanas. Después de sacrificados se les extrae el fémur y la tibia. Para cada tiempo se tenían cuatro animales, de los cuales uno se seleccionaba al azar para su estudio radiológico e histológico, procediendo de igual forma que se comentó anteriormente. Además de las muestras correspondientes a los tiempos citados, se reservaron dos animales más para sacrificar a las 12 y 24 semanas de la operación con el objetivo de ampliar el estudio radiológico e histológico a seis meses. Las tres muestras restantes de cada tiempo se emplearon para la extracción de ciprofloxacino remanente en tejido óseo y en implante.

- Muestras de sangre: periódicamente se tomaban muestras de sangre mediante punción de la vena marginal de la oreja, a lo largo del estudio *in vivo*. Las muestras fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , previa centrifugación, hasta el momento de su valoración.

### **Tratamiento de muestras**

- Muestras óseas: una vez extraído el fémur con el implante, el hueso es cortado longitudinalmente con una sierra acoplada a un motor eléctrico para retirar el implante; posteriormente se divide y se corta en cinco secciones: metáfisis distal, tercio diafisario distal, medio y proximal y, metáfisis proximal. A cada una de estas secciones se le extrae la médula y se pesa.

En el caso de la tibia, una vez extraída, se cortaba en tres secciones correspondientes a la metáfisis distal, diáfisis y metáfisis proximal separando así mismo, la médula de cada una de ellas y pesándola.

Cada una de las secciones de fémur y tibia son medidas, pesadas y pulverizadas.



Para extraer el ciprofloxacino de las muestras óseas se utilizó como medio tampón citrato de pH 4, por la mayor solubilidad y estabilidad del antibiótico en este medio, realizando la extracción a temperatura ambiente, en agitación y protegiendo las muestras de la luz.

Cada muestra fue sometida a sucesivas extracciones, de 24 horas cada una, finalizando la extracción en el momento en que los niveles de ciprofloxacino eran indetectables. Después de cada extracción se centrifugaba la muestra y en el sobrenadante resultante se determinaba la concentración de ciprofloxacino.

- Muestras de implantes: para extraer el ciprofloxacino remanente en el implante, se procedía a la extracción durante 24 horas y en agitación, utilizando el mismo medio que en las muestras óseas y con un volumen tal que se cumplieran las condiciones sumidero. Posteriormente se centrifugaba la muestra, se filtraba a través de filtros Gelman GHP Acrodisc de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se determinaba la concentración de ciprofloxacino.
- Muestras de sangre: las muestras de suero se obtenían por centrifugación y se analizaban posteriormente por el método microbiológico que se detalla a continuación.

### **Método analítico para la valoración de ciprofloxacino *in vivo***

Los niveles de ciprofloxacino en las muestras son valorados microbiológicamente por quintuplicado, por el método de difusión en agar utilizando *Bacillus subtilis* (CECT 39).

- Obtención del preinoculo: La preparación del preinoculo de *B. subtilis* se lleva a cabo en caldo nutritivo (Cultimed, Panreac) a 37°C durante 18 horas en agitación basculante.
- Preparación del cultivo bacteriano: Una vez obtenido el preinoculo y tras las diluciones correspondientes, se toman 250 $\mu\text{l}$  de la suspensión

bacteriana ( $10^6$  ufc/ml) y se mezclan con 15 ml de agar Mueller-Hinton (Merck), obteniéndose una concentración final de  $10^4$  ufc/ml

- Valoración del antibiótico: Tras la solidificación del medio de cultivo, se colocan los discos de 12,7 mm de diámetro (Schleider & Schuell) cargados con 100  $\mu$ l de muestra y se incuban a 37°C aproximadamente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se procede a la medida del halo de inhibición, cuantificando la concentración de ciprofloxacino con respecto a una recta de calibrado.
- Control del método: Se lleva a cabo mediante la inclusión de una recta de calibrado en cada valoración. Para obtener las rectas de calibrado se utilizaron disoluciones patrones de ciprofloxacino en tampón citrato pH 4 de concentraciones comprendidas entre 0,6 y 4  $\mu$ g/ml, preparadas a partir de una disolución de ciprofloxacino en tampón citrato pH 4. El coeficiente de variación del método fue del 1,58 %. La relación lineal entre el diámetro medio del halo de inhibición ( $n = 5$ ) y el logaritmo de la concentración, se ajustó a la siguiente ecuación:

$$y = 11,3x + 22,3 \quad (R^2 = 0,982) \quad (\text{ec.8})$$

### **Control de la función renal**

Todas las muestras de sangre extraídas de los animales implantados fueron analizadas para la determinación de la concentración de creatinina en suero, como control de la función renal a lo largo de los ensayos *in vivo*.

Para la determinación de los niveles de creatinina se utilizó un kit de creatinina (Roche-Diagnostics, USA) basado en el método de Jaffé (Bartels et al. , 1972) y un analizador Technicon-1000.

Para establecer los límites fisiológicos en estos animales, se determinó la concentración sérica de creatinina antes de ser implantados.

### **Análisis radiológico**

El estudio radiológico de las piezas se hizo en 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.

En cada radiografía considerábamos los siguientes parámetros:

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

### **Análisis histopatológico**

Una vez obtenida la radiografía del fémur, se procede a su estudio anatomopatológico. Las piezas óseas como ya se ha comentado son conservadas en una disolución de formaldehído al 10% hasta el momento de su análisis histopatológico. Las muestras fijadas fueron 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**



## ESTUDIO *IN VITRO*

### 1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS

Como hemos indicado, los materiales empleados en la elaboración de los implantes fueron caracterizados en cuanto a tamaño de partículas, peso molecular, temperatura de transición vítrea y estructura cristalina.

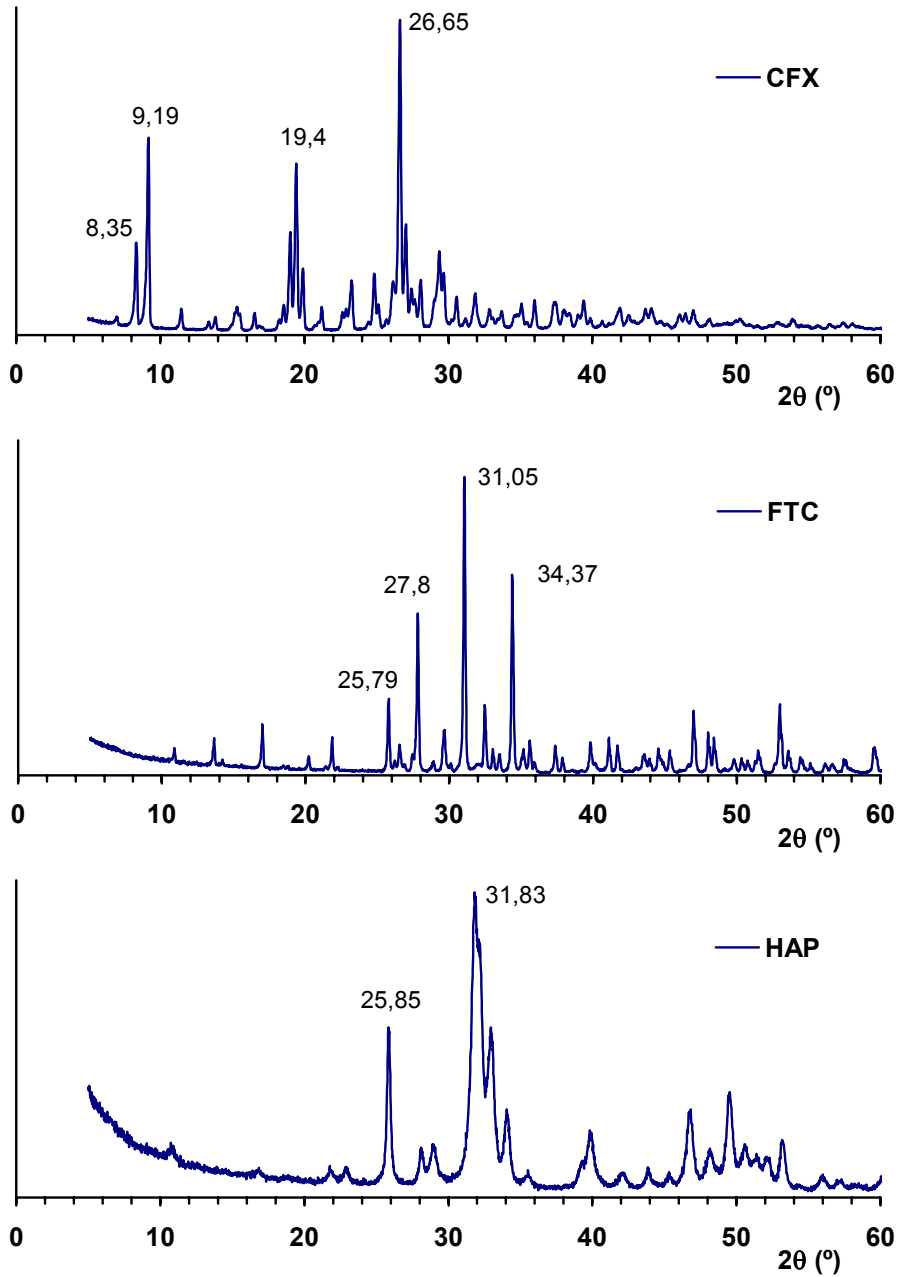
La tabla 1 muestra el diámetro medio en volumen y la distribución de tamaño de partícula de ciprofloxacino, poliláctico y fosfatos.

Muestra	Media ( $\mu\text{m}$ )	Percentil < ( $\mu\text{m}$ )		
		10 %	50 %	90 %
Ciprofloxacino	28,4	4,06	27,7	53,3
PLA-30	41,4	13,1	38,0	74,5
Hidroxiapatita	8,10	1,15	4,53	15,9
Fosfato tricálcico	2,52	0,552	1,30	5,89

**Tabla 1.-** Diámetros medios en volumen correspondientes a la media y porcentajes acumulados del 10%, 50% y 90% para los componentes empleados en la elaboración de los implantes.

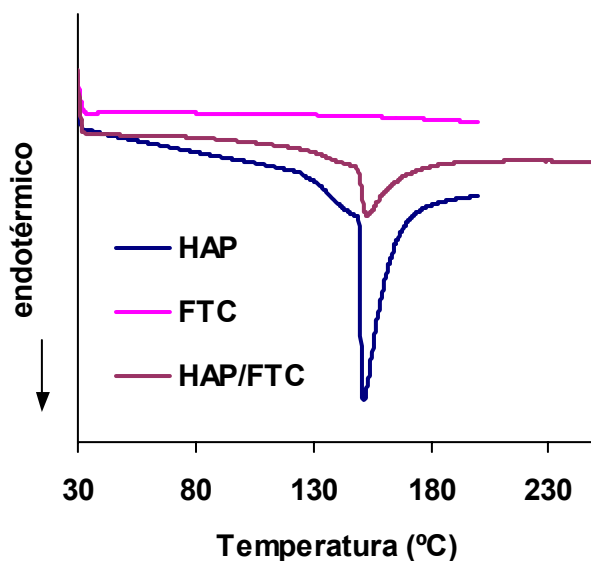
Los pesos moleculares medios y polidispersividad del polímero utilizado en la preparación de los implantes, determinados por GPC, fueron:  $M_w = 26,5 \pm 0,225$  kD;  $M_n = 17,0 \pm 0,296$  kD y  $pd = 1,55 \pm 0,014$ . La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del PLA-30 fue de 43,8°C.

En la figura 7 se muestran los difractogramas de rayos X en polvo de los fosfatos y de ciprofloxacino. Los resultados de DSC de los fosfatos individualmente como de su mezcla en la proporción 25:75 (HAP/FTC) se muestran en la figura 8.



**Figura 7.-** Perfil de difracción de rayos X del clorhidrato de ciprofloxacino (CFX), hidroxiapatita (HAP) y fosfato tricálcico (FTC).





**Figura 8.-** Termogramas correspondientes a la hidroxiapatita (HAP), fosfato tricálcico (FTC) y la mezcla de ambos en la proporción 25/75.

## 2. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE FORMULACIONES DE CIPROFLOXACINO

### A. ESTUDIO PREVIO

Con el fin de determinar la relación de fosfatos óptima para la elaboración de los implantes, procedimos a elaborar dos lotes, F-A y F-B cuyas características y composición se muestran en la tabla 2.

Lote	HAP/FTC (%)	PLA/Fosfatos (%)	Ciprofloxacino (%)	Presión (MPa)	Peso (mg)
F-A	75/25	20/80	20	520	405,2 ± 4,55
F-B	25/75	20/80	20	520	375,4 ± 42,3

**Tabla 2 .-** Composición y características de los implantes F-A y F-B. Peso medio ± desviación estándar (n = 3).

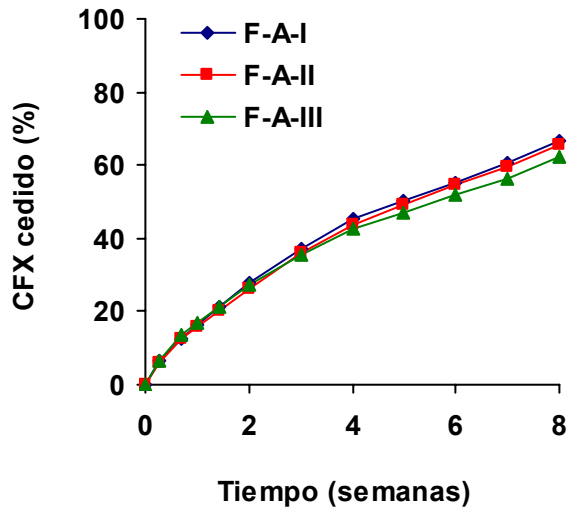
Los resultados de los ensayos de cesión de estos lotes se recogen en las tablas 3 y 4 y en las figuras 9 y 10 se representan los porcentajes medios cedidos para ambas formulaciones.

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0,286	5,06	5,08	5,31	5,15	0,140
0,714	9,88	10,4	11,0	10,4	0,551
1	13,1	13,1	13,8	13,3	0,403
1,43	17,0	16,5	17,2	16,9	0,343
2	22,2	21,5	22,0	21,9	0,370
3	29,8	29,5	28,6	29,3	0,601
4	36,2	35,8	34,3	35,5	0,994
5	40,2	40,4	38,2	39,6	1,20
6	44,4	44,9	41,9	43,7	1,61
7	48,4	48,9	45,5	47,6	1,85
8	53,4	53,5	50,4	52,5	1,79

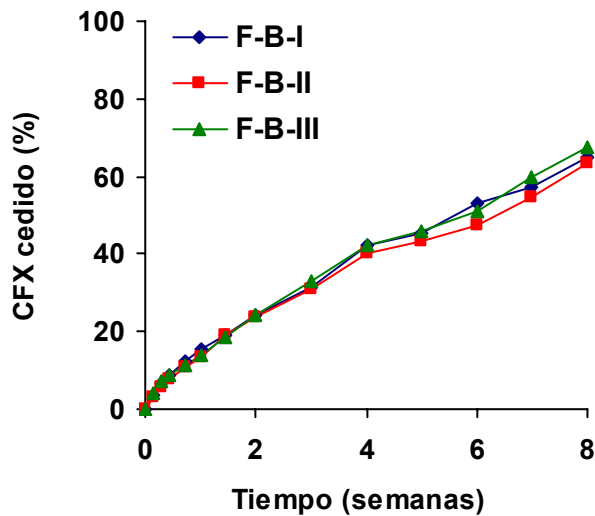
**Tabla 3.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión in vitro con la formulación F-A (80,1, 81,9 y 81,1 mg iniciales de ciprofloxacino para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0,143	2,69	2,44	2,69	2,61	0,145
0,286	5,37	4,59	4,61	4,85	0,444
0,429	6,98	6,27	5,66	6,30	0,663
0,714	9,83	8,80	7,56	8,73	1,14
1	12,4	10,8	9,16	10,8	1,61
1,43	15,2	15,1	12,0	14,1	1,82
2	19,3	18,9	15,9	18,1	1,85
3	25,1	24,4	21,6	23,7	1,85
4	34,1	32,1	27,7	31,3	3,27
5	36,6	34,6	30,0	33,7	3,37
6	42,7	37,9	33,3	38,0	4,71
7	46,1	43,4	39,0	42,9	3,60
8	52,2	50,5	44,0	48,9	4,36

**Tabla 4.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con la formulación F-B (80,3, 79,6 y 65,3 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 9.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-A en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 10.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-B en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

## **B. ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE IMPLANTES**

Las formulaciones se elaboraron según se describió en el apartado de material y métodos, preparando lotes de 10 g; para ello se preparó una mezcla física de los fosfatos, polímero y ciprofloxacino y se comprimieron a 520 MPa y 312 MPa.

Para simplificar la nomenclatura, los lotes se designaron de la siguiente forma: F-p-PLA-ciprofloxacino, es decir F indica la formulación, seguida de 5 ó 3 según se aplica una presión de 520 ó 312 MPa, seguido de la proporción relativa de PLA con respecto a los fosfatos y finalmente, el porcentaje de ciprofloxacino incluido en el implante.

La composición y características de las diez formulaciones elaboradas se muestran en las tablas 5 y 6.

### **1) Ensayos de cesión *in vitro***

En las tablas 7-16 se recogen las cantidades de ciprofloxacino cedidas desde los implantes de las formulaciones elaboradas y en las figuras 11 - 20 se representan sus correspondientes perfiles de cesión.

Formulación	Presión (MPa)	PLA/fosfatos (%)	Ciprofloxacino (%)
F-5-0-10	520	0/100	10
F-5-0-20	520	0/100	20
F-5-0-40	520	0/100	40
F-5-20-10	520	20/80	10
F-5-50-20	520	50/50	20
F-3-0-10	312	0/100	10
F-3-20-10	312	20/80	10
F-3-20-20	312	20/80	20
F-3-20-40	312	20/80	40
F-3-50-10	312	50/50	10

**Tabla 5.-** Composición y presión de los implantes de las distintas formulaciones elaboradas.

Formulación	Ciprofloxacino Incorporado (%)	Peso (mg)	Dimensiones (mm)
F-5-0-10	10,1 ± 0,07	495,6 ± 0,252	l: 11,9 ± 0,039 a: 3,57 ± 0,080 f: 6,03 ± 0,069
F-5-0-20	19,9 ± 0,14	476,2 ± 58,1	l: 11,5 ± 1,06 a: 3,7 ± 0,109 f: 6,15 ± 0,382
F-5-0-40	39,9 ± 0,41	497,7 ± 19,5	l: 12,1 ± 0,055 a: 3,81 ± 0,2 f: 6,38 ± 0,084
F-5-20-10	10,6 ± 0,006	344,0 ± 23,9	l: 10,3 ± 1,45 a: 4,39 ± 0,026 f: 5,31 ± 0,627
F-5-50-20	20,6 ± 0,304	340,6 ± 32,5	l: 10,3 ± 0,543 a: 4,97 ± 0,125 f: 5,16 ± 0,238
F-3-0-10	9,84 ± 0,12	500,2 ± 0,07	d: 6,05 ± 0,018 a: 7,53 ± 0,027
F-3-20-10	9,55 ± 0,07	499,2 ± 0,129	d: 6,05 ± 0,0006 a: 8,67 ± 0,006
F-3-20-20	19,6 ± 0,14	499,1 ± 0,265	d: 6,04 ± 0,0006 a: 8,87 ± 0,024
F-3-20-40	40,3 ± 0,41	499 ± 0,503	d: 6,04 ± 0,005 a: 9,4 ± 0,034
F-3-50-10	9,4 ± 0,051	497,5 ± 2,02	d: 6,01 ± 0,006 a: 10,3 ± 0,024

**Tabla 6.-** Composición, peso y dimensiones de los implantes elaborados; l: longitud; a: altura; f: fondo; d: diámetro (n = 3).

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	a	b	c		
0,286	3,14	3,34	3,29	3,25	0,10
0,714	7,74	7,89	8,01	7,88	0,139
1	10,7	11,1	10,8	10,9	0,209
1,43	15,8	16,5	16,4	16,2	0,387
2	20,1	20,9	20,8	20,6	0,415
3	30,6	31,7	31,6	31,3	0,614
4	41,3	42,4	42,3	42,0	0,60
5	45,4	46,6	46,2	46,1	0,636
6	48,9	49,7	49,9	49,5	0,513

**Tabla 7.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con la formulación F-5-0-10 (50,05, 50,1 y 50,0 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	s.d.
	a	b	c		
0,286	4,95	5,63	6,02	5,53	0,541
0,714	11,5	13,9	12,6	12,7	1,20
1	15,3	19,3	17,2	17,3	1,98
1,43	25,2	29,7	28,6	27,8	2,33
2	32,7	36,8	35,0	34,8	2,07
3	43,3	48,3	46,1	45,9	2,51
4	51,2	55,8	57,5	54,8	3,28
5	56,8	62,8	63,5	61,0	3,72
6	61,5	69,2	70,6	67,1	4,89
7	66,6	76,8	78,1	73,8	6,32
8	73,4	84,6	85,7	81,2	6,79
9	82,1	92,8	94,3	89,7	6,64

**Tabla 8.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con la formulación F-5-0-20 (82,6, 103,5 y 99,2 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	s.d.
	a	b	c		
0,286	8,20	7,94	7,27	7,81	0,478
0,714	21,1	20,3	16,9	19,4	2,23
1	28,8	27,4	22,7	26,3	3,18
1,43	47,5	43,1	35,5	42,1	6,05
2	59,0	50,3	44,2	51,2	7,44
3	82,5	75,3	70,0	75,9	6,30
4	106,8	98,4	92,5	99,2	7,18
5	125,3	117,0	108,7	117,0	8,30
6	146,0	135,5	125,6	135,7	10,2
7	164,6	153,1	141,5	153,1	11,6

**Tabla 9.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión in vitro con la formulación F-5-0-40 (205,5 200,1 y 190,1 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	s.d.
	a	b	c		
0,143	2,11	2,08	2,54	2,24	0,256
0,286	3,42	3,28	3,96	3,55	0,362
0,429	4,16	4,38	4,99	4,51	0,427
0,714	5,83	5,74	6,53	6,03	0,431
1	6,79	6,99	7,91	7,23	0,597
1,43	8,49	8,30	9,54	8,78	0,668
2	9,79	9,79	11,6	10,4	1,05
3	11,4	12,0	14,4	12,6	1,59
4	12,8	14,1	16,3	14,4	1,78
5	14,5	16,1	18,1	16,2	1,84
6	15,8	17,8	19,8	17,8	1,97
7	16,9	19,3	21,4	19,2	2,27
9	18,9	23,2	23,9	22,0	2,73
11	20,7	25,2	26,2	24,0	2,94
13	22,0	26,9	28,0	25,6	3,19

**Tabla 10.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con la formulación F-5-20-10 (32,2, 36,3 y 39,9 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	s.d.
	a	b	c		
0,143	1,21	1,29	1,46	1,32	1,29
0,286	2,76	2,56	5,06	3,46	1,39
0,429	4,06	3,44	7,52	5,0	2,20
0,714	6,11	5,98	10,3	7,46	2,50
1	8,08	8,16	12,4	9,55	2,47
1,43	11,2	10,7	15,8	12,6	2,81
2	14,3	14,0	19,2	15,8	2,93
3	18,6	18,5	24,3	20,5	3,33
4	23,5	22,4	28,7	24,8	3,37
5	27,2	26,0	33,5	28,9	4,0
6	30,3	28,9	37,2	32,2	4,41
7	33,2	32,0	42,9	36,0	5,96
9	41,3	40,0	51,1	44,1	6,08
11	50,0	47,8	57,9	51,9	5,32
13	55,0	53,0	63,0	57,0	5,28

**Tabla 11.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión in vitro con la formulación F-5-50-20 (72,1, 71,6 y 81,9 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	s.d.
	a	b	c		
0,143	2,84	3,05	3,07	2,99	0,128
0,286	6,03	5,60	5,45	5,69	0,30
0,429	9,35	8,09	9,68	9,04	0,841
0,714	19,1	19,9	19,1	19,4	0,495
1	30,4	31,5	27,5	29,8	2,03
1,43	41,5	42,7	37,1	40,4	2,94
2	46,5	48,4	43,1	46,0	2,65
3	50,1	49,8	48,6	49,5	0,826
4	50,6	49,8	52,3	50,9	1,26

**Tabla 12.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con la formulación F-3-0-10 (50,8, 49,8 y 53,5 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	s.d.
	a	b	c		
0,143	2,26	2,33	2,19	2,26	0,072
0,286	4,41	4,33	4,26	4,33	0,074
0,429	5,65	5,68	5,58	5,64	0,055
0,714	8,79	9,28	8,64	8,90	0,337
1	12,3	12,7	12,0	12,3	0,336
1,43	14,9	15,3	15,3	15,2	0,269
2	21,0	21,1	21,5	21,2	0,279
3	28,5	27,2	27,8	27,8	0,658
4	32,9	32,2	31,7	32,3	0,572
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	45,5	46,8	1,37
12	48,9	47,7	47,2	47,9	0,894
14	49,5	48,9	48,7	49,0	0,416
16	49,6	49,4	49,1	49,3	0,195

**Tabla 13.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión in vitro con la formulación F-3-20-10 (49,9, 49,8 y 49,9 mg iniciales de ciprofloxacino para cada uno de los replicados) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	a	b	c		
0,143	2,67	2,47	2,54	2,56	0,101
0,286	6,54	5,5	5,32	5,79	0,655
0,429	8,90	7,59	7,27	7,92	0,862
0,714	12,9	12,7	12,0	12,5	0,455
1	17,5	18,5	17,5	17,8	0,565
1,43	21,3	23,4	21,9	22,2	1,06
2	29,3	32,9	30,2	30,8	1,91
3	43,7	48,6	45,9	46,1	2,44
4	52,1	59,9	55,9	56,0	3,91
5	60,5	68,7	64,4	64,5	4,09
6	67,9	75,0	71,9	71,6	3,60
7	73,5	80,3	78,4	77,4	3,49
8	77,8	84,4	83,2	81,8	3,52
9	82,0	88,3	87,2	85,9	3,39
10	85,4	91,7	91,4	89,5	3,57
11	90,0	94,3	94,0	92,8	2,37
12	93,0	96,5	96,4	95,3	2,01
14	96,5	98,3	98,6	97,8	1,17
16	97,8	98,4	99,0	98,4	0,601

**Tabla 14.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión *in vitro* con la formulación F-3-20-20 (97,9, 97,8 y 97,8 mg iniciales de ciprofloxacino para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

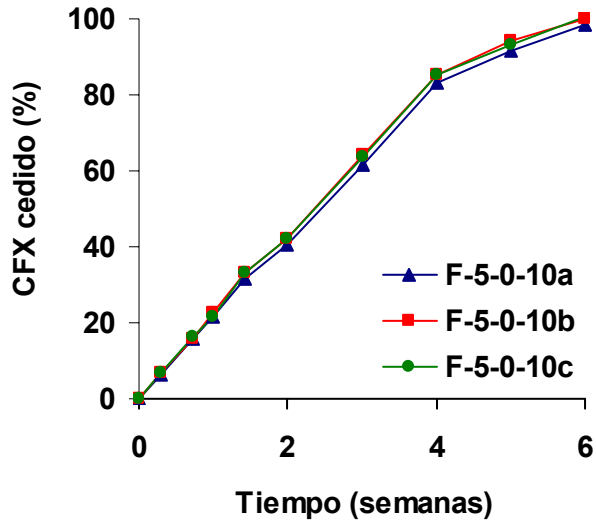
Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	a	b	c		
0,143	3,07	2,95	3,24	3,09	0,143
0,286	7,22	6,85	7,77	7,28	0,464
0,429	10,2	9,58	10,6	10,1	0,515
0,714	17,2	16,2	17,5	17,0	0,653
1	22,6	22,3	24,5	23,1	1,21
1,43	28,4	27,5	30,7	28,8	1,65
2	40,1	38,9	44,1	41,0	2,74
3	57,4	59,9	62,3	59,9	2,46
4	72,8	78,0	76,5	75,8	2,72
5	87,6	93,5	93,5	91,6	3,40
6	104,1	108,1	107,6	106,6	2,19
7	117,9	121,9	119,5	119,7	2,02
8	129,7	131,9	129,7	130,4	1,24
9	139,8	142,1	139,4	140,4	1,49
10	149,3	150,6	147,1	149,0	1,74
11	157,3	159,0	154,0	156,8	2,55
12	165,1	166,5	162,7	164,8	1,93
14	176,1	177,0	174,3	175,8	1,35
16	183,3	184,1	181,6	183,0	1,28
18	188,3	189,8	187,2	188,4	1,30
20	192,3	193,6	191,8	192,6	0,919
23	195,5	196,3	194,5	195,5	0,909
25	196,3	196,9	194,8	196,0	1,06

**Tabla 15.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión in vitro con la formulación F-3-20-40 (201,3, 200,9 y 201,1 mg iniciales de ciprofloxacino para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

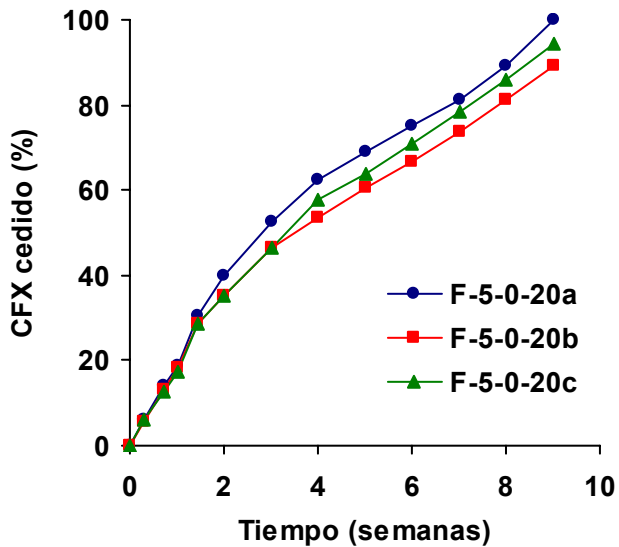
Tiempo (semanas)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	a	b	c		
0,143	3,18	3,20	3,19	3,19	0,006
0,429	6,38	7,63	7,55	7,19	0,696
0,857	11,2	11,9	12,0	11,7	0,461
1	12,5	13,4	13,4	13,1	0,519
1,43	17,7	18,4	18,4	18,2	0,382
2	24,3	22,5	24,2	23,6	1,03
3	29,9	28,1	29,8	29,2	1,00
4	33,7	33,0	34,2	33,7	0,618
5	37,8	36,5	38,0	37,4	0,853
6	39,9	38,2	39,9	39,3	0,944
7	41,3	40,3	41,5	41,0	0,658
8	42,5	41,5	42,8	41,3	0,654

**Tabla 16.-** Cantidad de ciprofloxacino cedido (mg) en los estudios de cesión in vitro con la formulación F-3-50-10 (46,3, 46,0 y 46,1 mg iniciales de ciprofloxacino para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

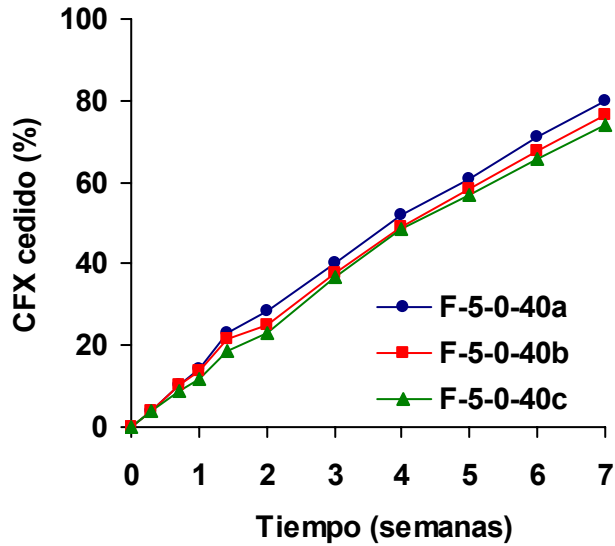




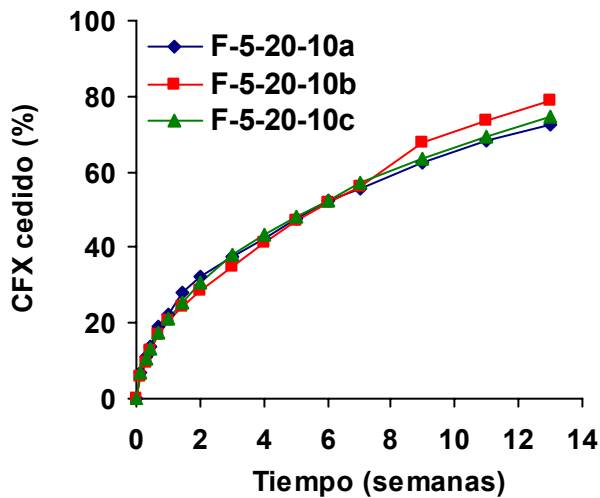
**Figura 11.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-5-0-10 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



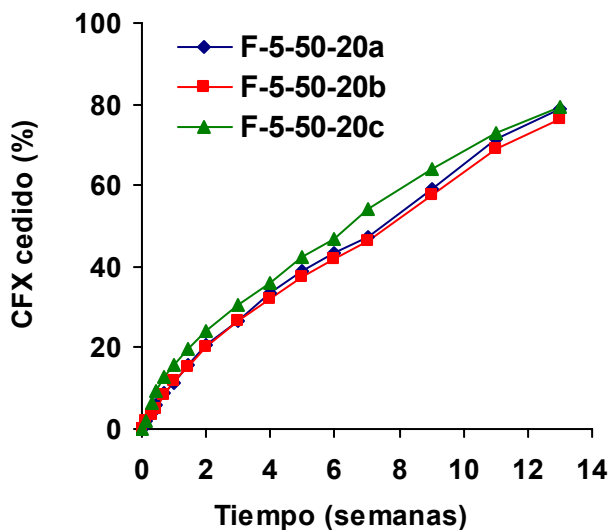
**Figura 12.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-5-0-20 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



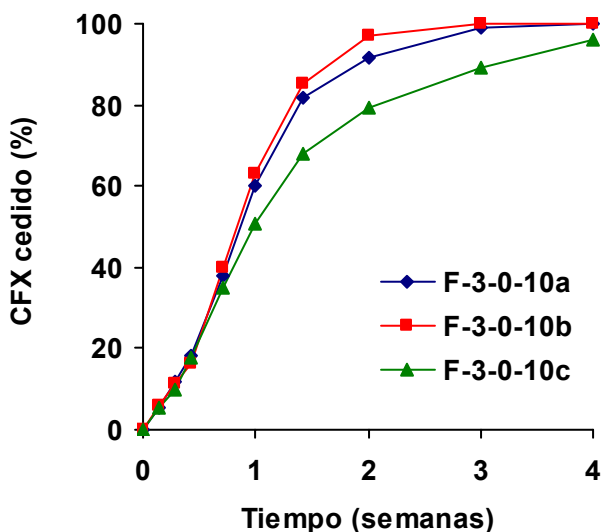
**Figura 13.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-5-0-40 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



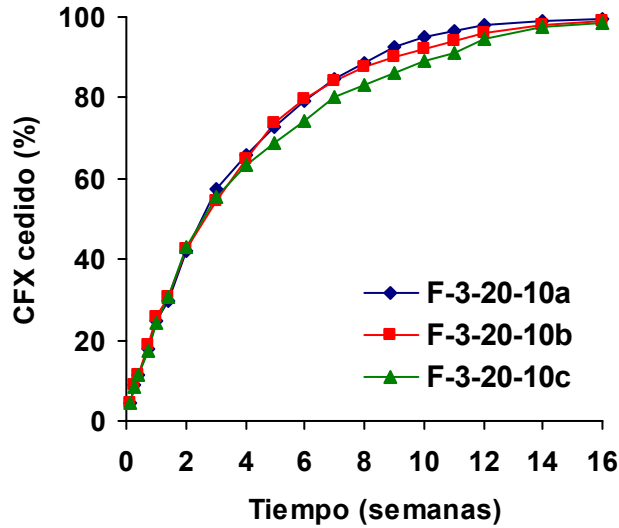
**Figura 14.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) liberado a partir del replicado F-5-20-10 en medio de cesión tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



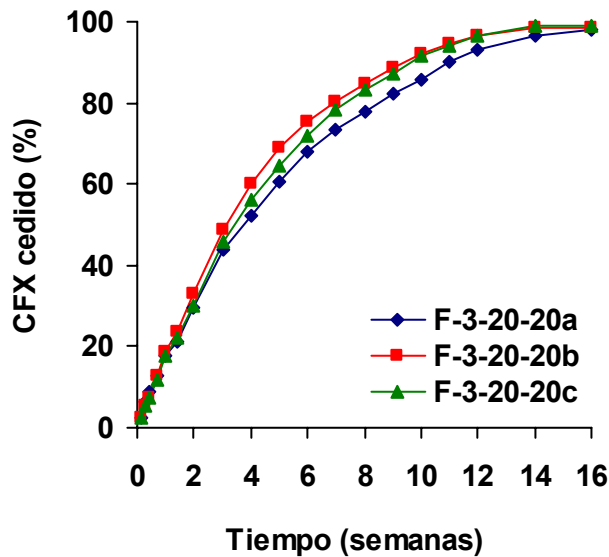
**Figura 15.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) liberado a partir de la formulación F-5-50-20 en medio de cesión tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



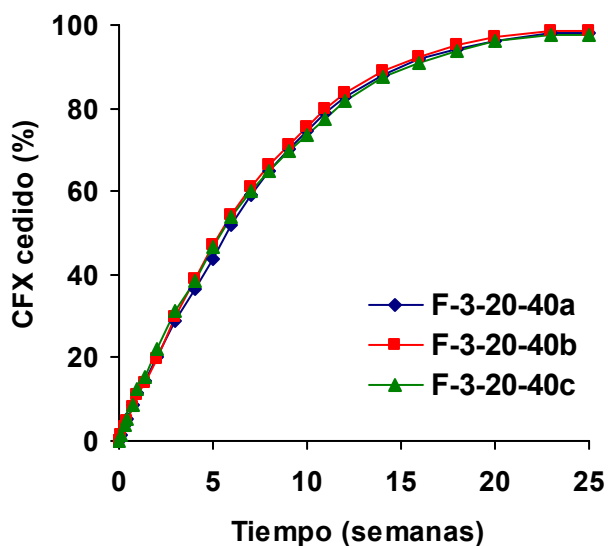
**Figura 16.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-3-0-10 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



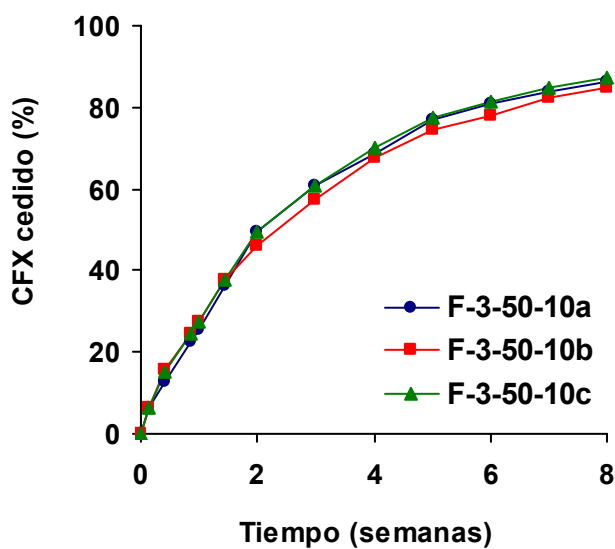
**Figura 17.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-3-20-10 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 18.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-3-20-20 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 19.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-3-20-40 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



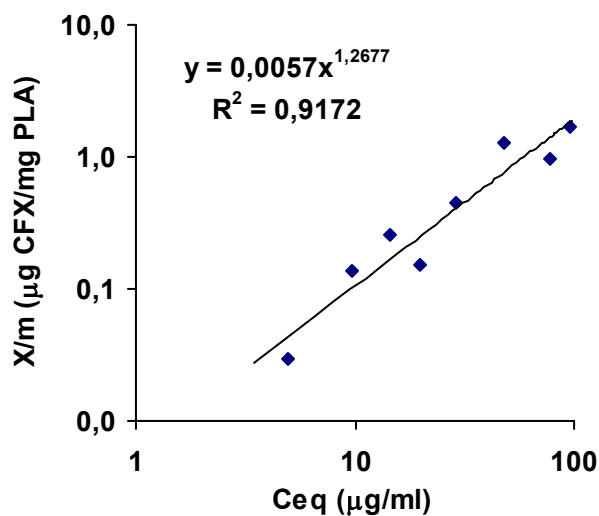
**Figura 20.-** Porcentajes acumulados de ciprofloxacino (CFX) cedido a partir de la formulación F-3-50-10 en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

## **2) Estudio de adsorción de ciprofloxacino a los diferentes componentes de las formulaciones**

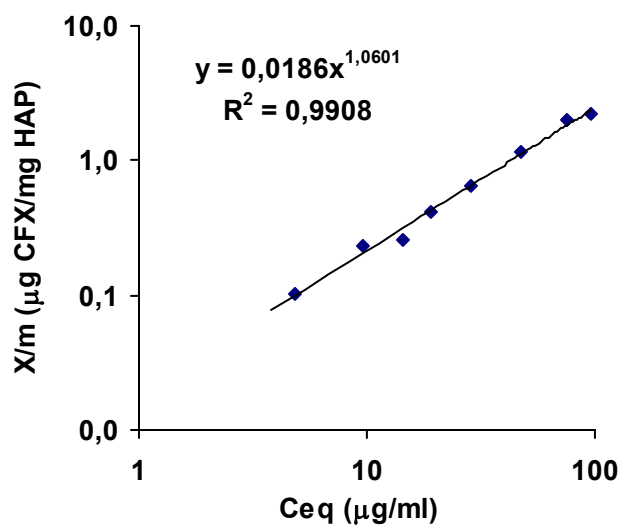
Después de mantener durante dos horas el polímero y los fosfatos en contacto con las distintas disoluciones de ciprofloxacino, en las condiciones especificadas en el apartado de material y métodos, y una vez alcanzada la concentración de equilibrio ( $C_{eq}$ ), se calculó la cantidad de ciprofloxacino adsorbida por unidad de masa del polímero, de HAP y de FTC, cuyos resultados se recogen en la tabla 17 y en las figuras 21 - 23.

CFX ( $\mu\text{g/ml}$ )	X/m ( $\mu\text{g/mg}$ )		
	PLA-30	HAP	FTC
5	0,030	0,103	0,096
10	0,136	0,229	0,156
15	0,255	0,255	0,123
20	0,153	0,418	0,302
30	0,444	0,643	0,312
50	1,29	1,16	0,497
80	0,975	2,04	0,975
100	1,69	2,22	1,23

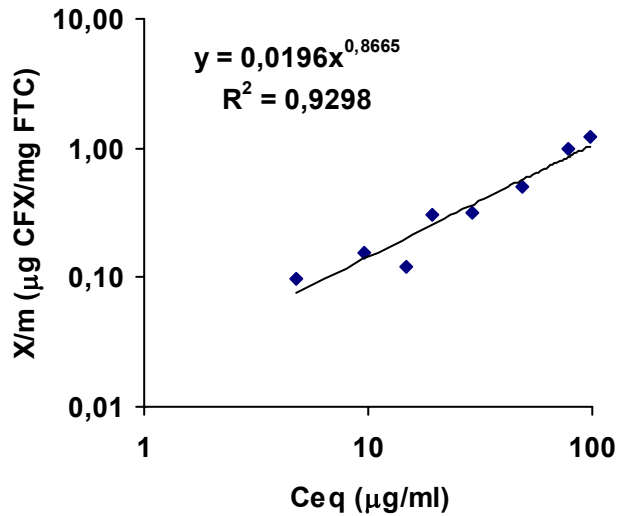
**Tabla 17.-** Resultados de la adsorción de ciprofloxacino (CFX) al polímero (PLA-30), hidroxiapatita (HAP) y fosfato tricálcico (FTC).



**Figura 21.-** Cantidad de ciprofloxacino (CFX) adsorbido por unidad de masa del polímero vs concentración de equilibrio de ciprofloxacino.



**Figura 22.-** Cantidad de ciprofloxacino (CFX) adsorbido por unidad de masa de HAP vs concentración de equilibrio de ciprofloxacino.



**Figura 23.-** Cantidad de ciprofloxacino (CFX) adsorbido por unidad de masa de FTC vs concentración de equilibrio de ciprofloxacino.

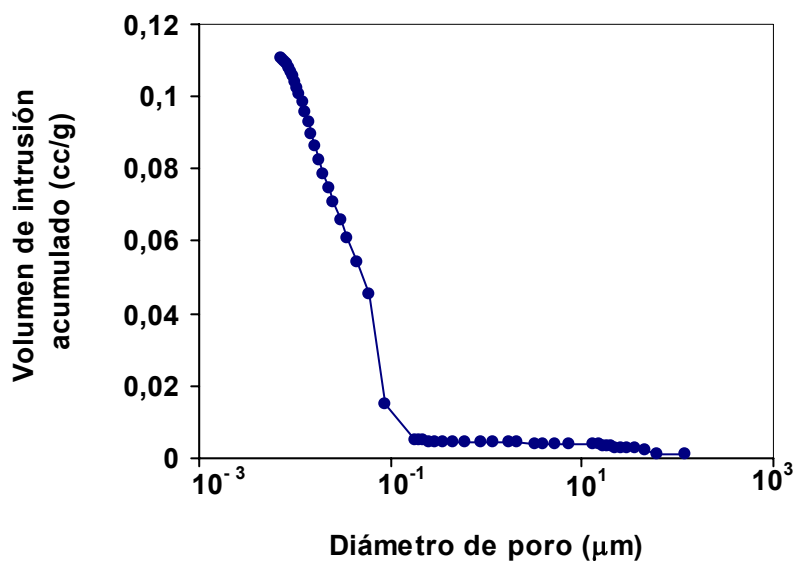
### 3) Porosidad de los implantes

En la tabla 18 se muestran los valores de diámetro medio de poro y porosidad a tiempo cero para las diez formulaciones elaboradas. En las figuras 24 - 33 se recogen las curvas de distribución de tamaño de poro obtenidas para dichas formulaciones.

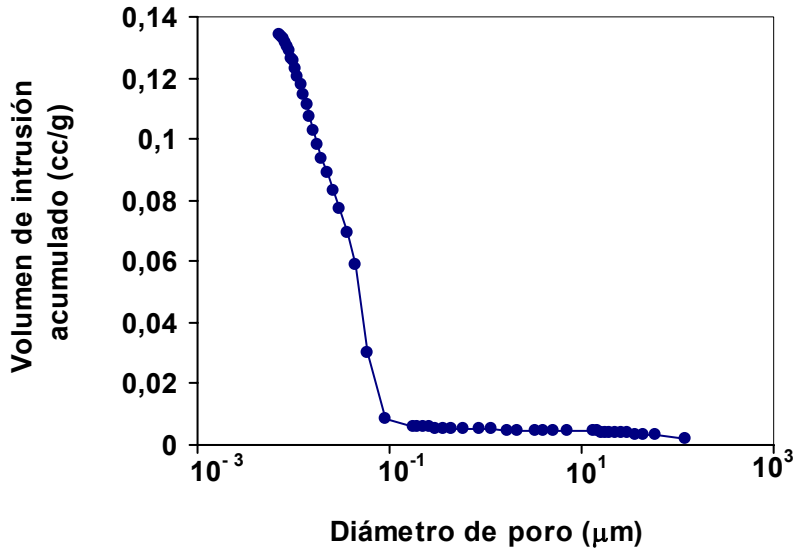


Formulación	Diámetro medio de poro ( $\mu\text{m}$ )	Porosidad (%)
F-5-0-10	0,0266	20,7
F-5-0-20	0,0247	17,5
F-5-0-40	0,0203	9,35
F-5-20-10	0,0226	13,6
F-5-50-20	0,0157	6,04
F-3-0-10	0,0251	21,3
F-3-20-10	0,0236	15,3
F-3-20-20	0,0244	14,0
F-3-20-40	0,0218	9,43
F-3-50-10	0,0165	8,01

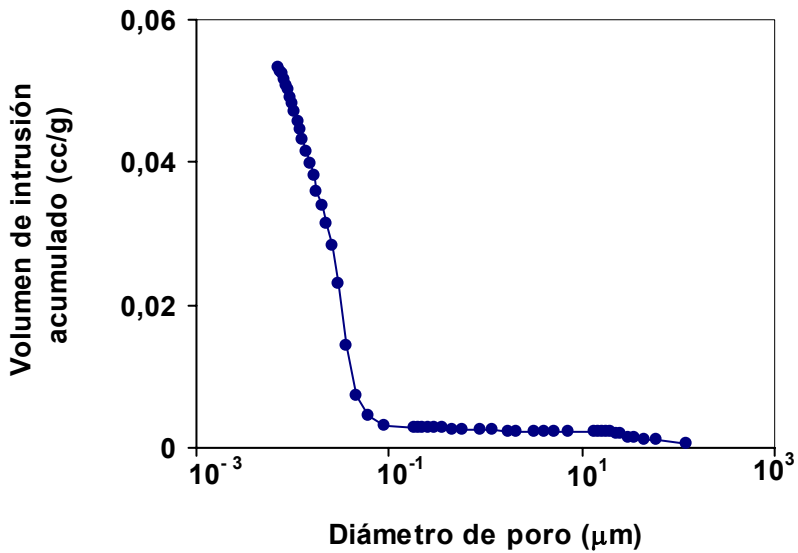
**Tabla 18.** - Diámetro medio de poro y porosidad inicial de los implantes de las distintas formulaciones elaboradas.



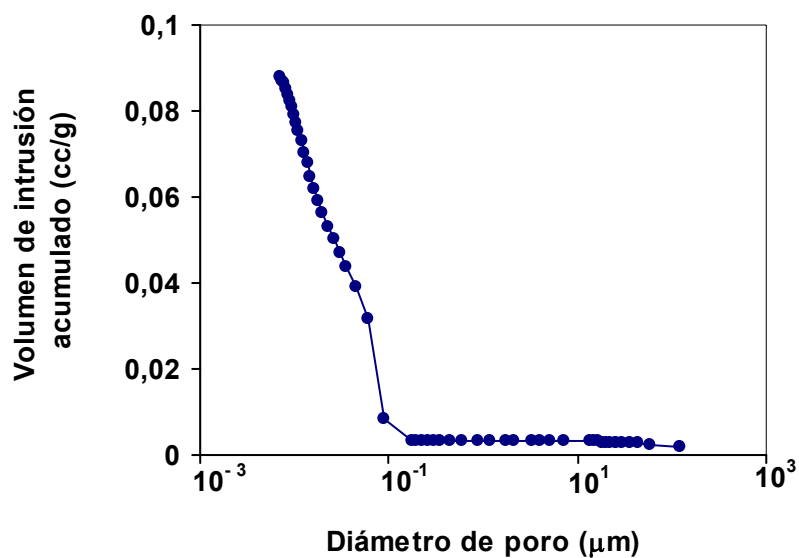
**Figura 24.** - Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-5-0-10, a  $t = 0$ .



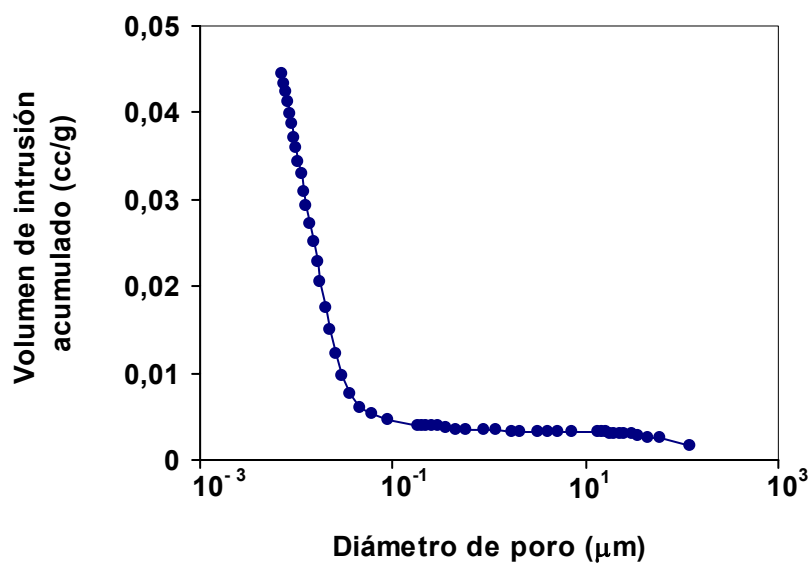
**Figura 25.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-5-0-20, a  $t = 0$ .



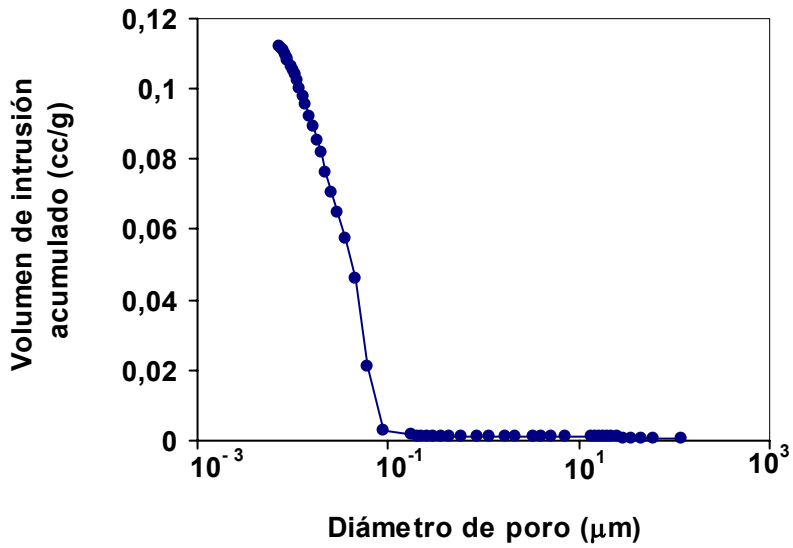
**Figura 26.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-5-0-40, a  $t = 0$ .



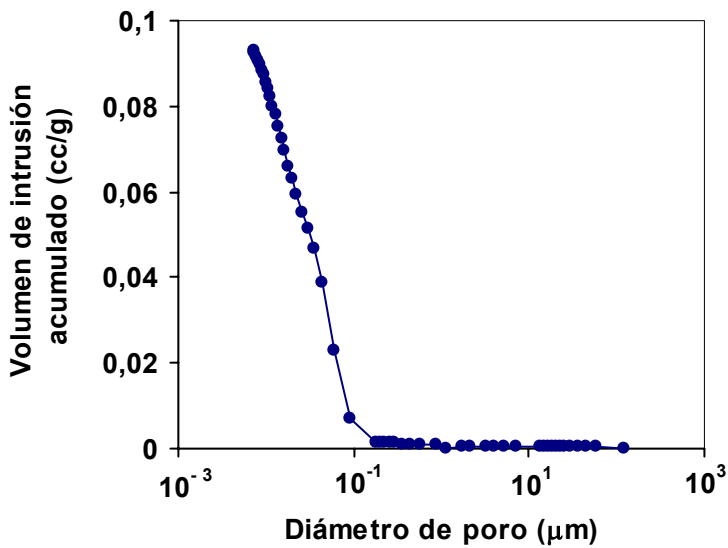
**Figura 27.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-5-20-10, a  $t = 0$ .



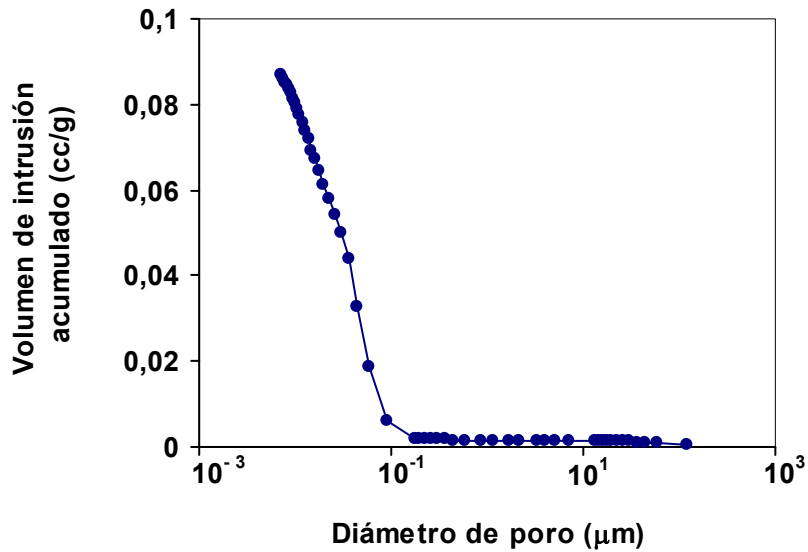
**Figura 28.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-5-50-20, a  $t = 0$ .



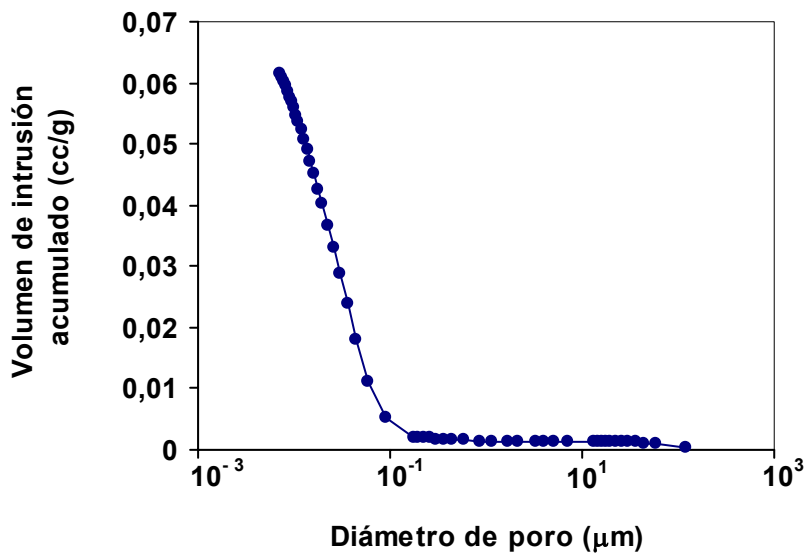
**Figura 29.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-0-10, a  $t = 0$ .



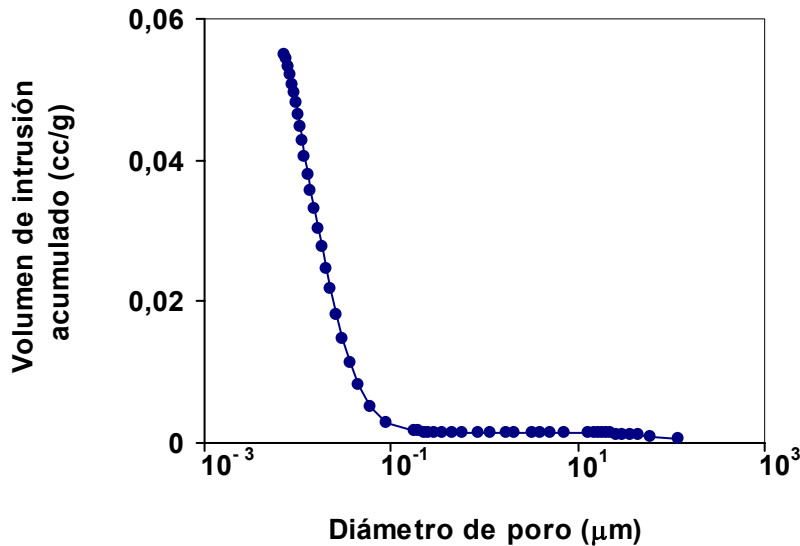
**Figura 30.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-10, a  $t = 0$ .



**Figura 31.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-20, a  $t = 0$ .



**Figura 32.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-40, a  $t = 0$ .



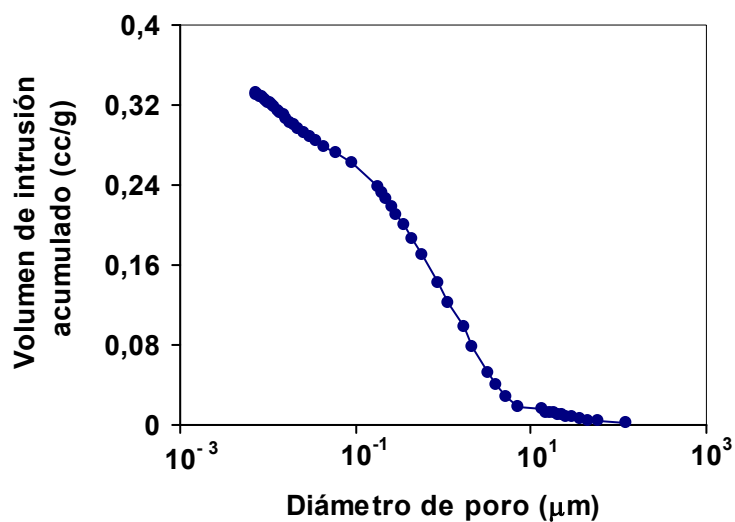
**Figura 33.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-50-10, a  $t = 0$ .

### C. CARACTERIZACIÓN COMPLEMENTARIA DE LAS FORMULACIONES F-3-20-10 Y F-3-20-40

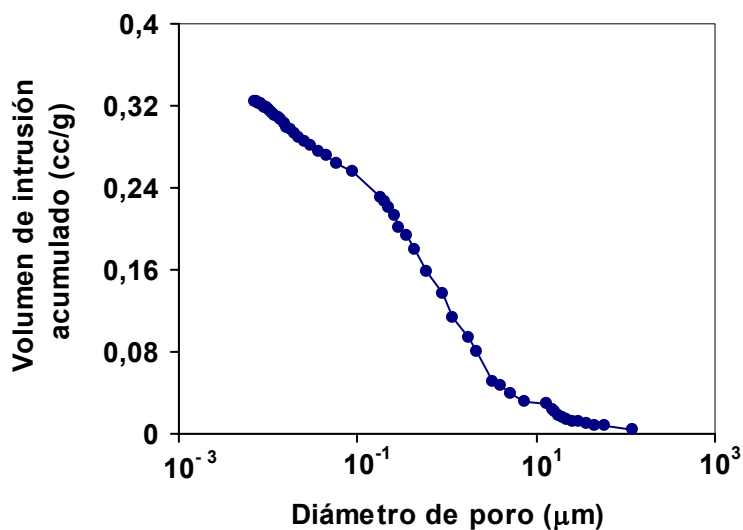
#### 1) Evolución temporal de las características del implante

##### a) Porosidad durante el ensayo de cesión

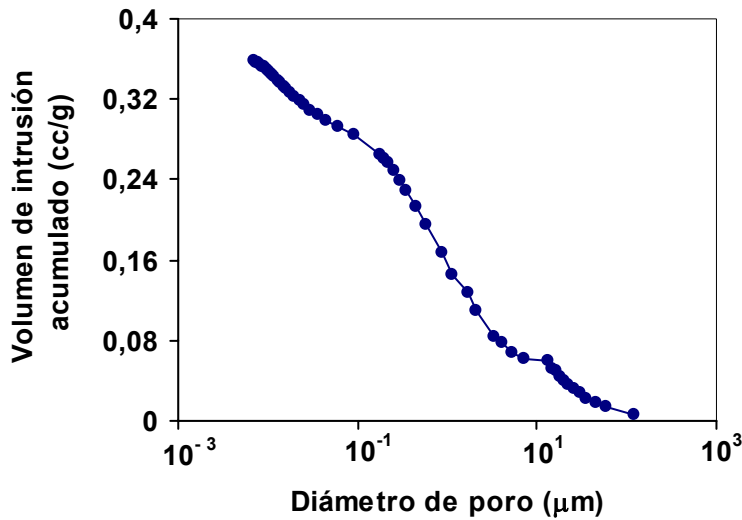
Este ensayo se llevó a cabo solo con las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40, que son las que posteriormente se estudiaron *in vivo*. Las curvas de distribución de tamaño de poro a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*, correspondientes a tiempos 1, 2, 4 y 8 semanas se recogen en las figuras 34 - 37 para la formulación F-3-20-10 y en las figuras 38 - 42 para F-3-20-40, a los tiempos 1, 2, 4, 6 y 8 semanas. En la tabla 19 se recoge el tamaño de poro medio y la porosidad a los tiempos mencionados para ambas formulaciones.



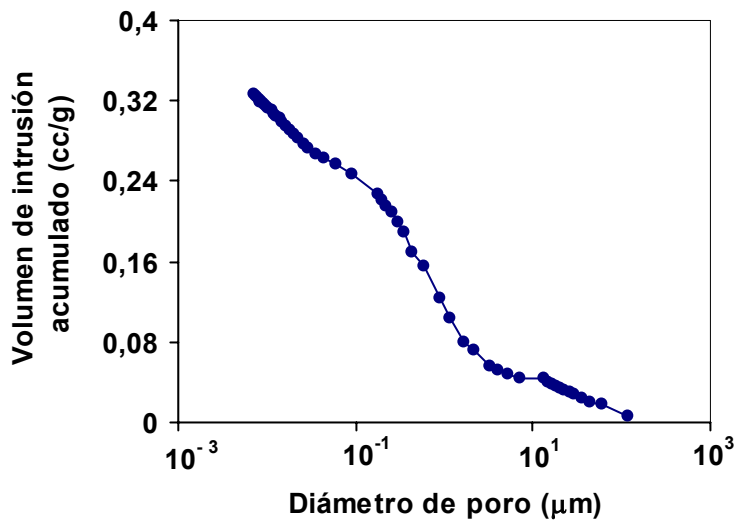
**Figura 34.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-10 después de una semana de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 35.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-10 después de dos semanas de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

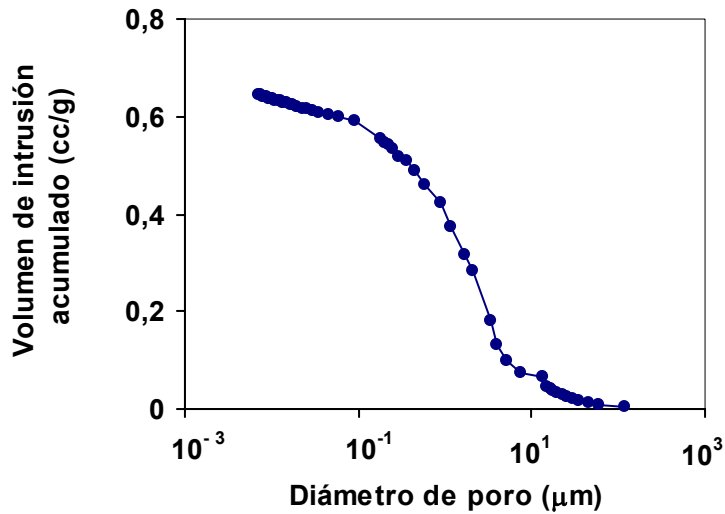


**Figura 36.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-10 después de cuatro semanas de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

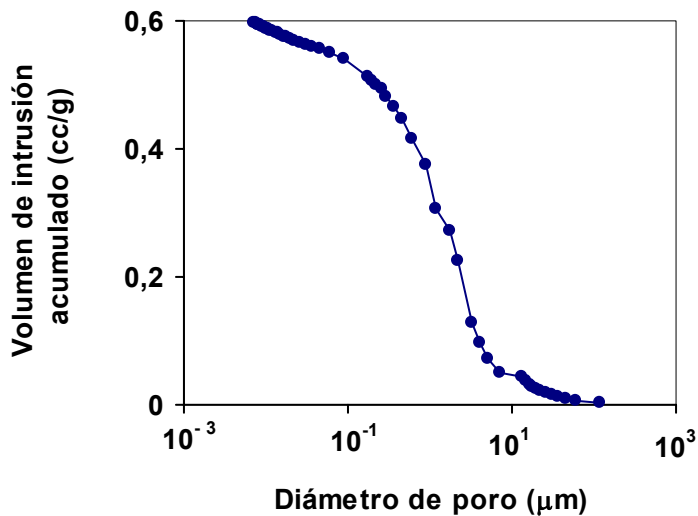


**Figura 37.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-10 después de ocho semanas de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.

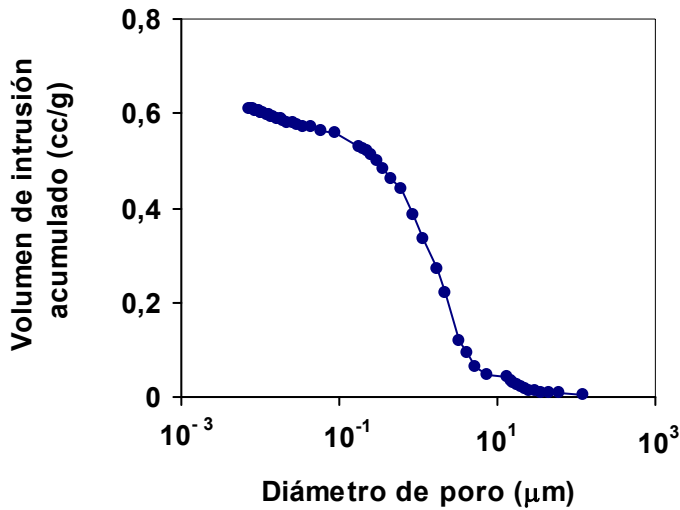




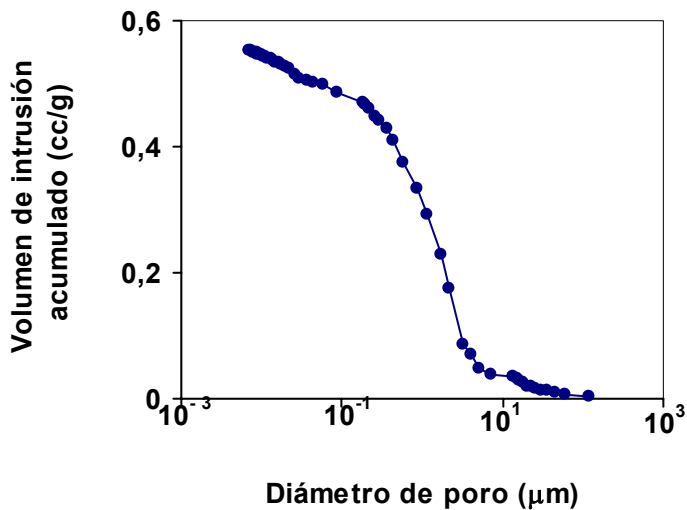
**Figura 38.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-40 después de una semana de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



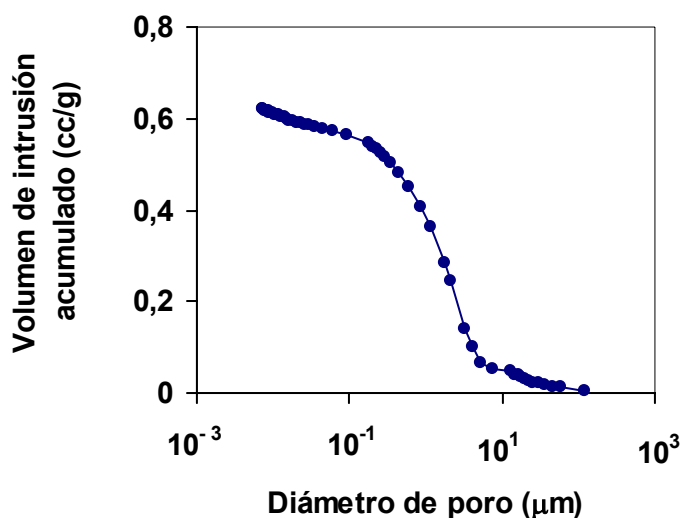
**Figura 39.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-40 después de dos semanas de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 40.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-40 después de cuatro semanas de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 41.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-40 después de seis semanas de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica.



**Figura 42.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-3-20-40 después de ocho semanas de incubación en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica

Tiempo (semanas)	F-3-20-10		F-3-20-40	
	Diámetro medio de poro ( $\mu\text{m}$ )	Porosidad (%)	Diámetro medio de poro ( $\mu\text{m}$ )	Porosidad (%)
0	0,0236	15,3	0,0218	9,43
1	0,0775	36,6	0,1713	44,3
2	0,0749	35,1	0,1586	43,7
4	0,0762	35,7	0,1587	43,6
6	n.d.	n.d.	0,1378	42,5
8	0,0648	33,4	0,1563	44,6

**Tabla 19.-** Diámetro medio de poro y porosidad de los implantes de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40 a lo largo de los ensayos de cesión *in vitro*. (n.d. = valor no determinado).

### b) Captación de agua y pérdida de masa

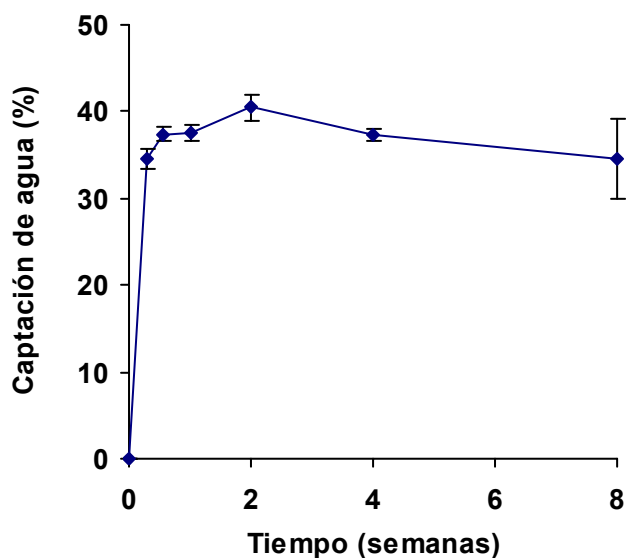
En las tablas 20 y 21 se recogen los porcentajes de agua captada por las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40 y en las figuras 43 y 44 su representación gráfica a lo largo de 8 semanas.

Tiempo (semanas)	Peso (húmedo) (mg)	Peso (seco) (mg)	Captación de agua (%)
0,286	689,1 ± 4,86	490,0 ± 0,757	34,5 ± 1,20
0,571	663,6 ± 11,3	483,0 ± 5,45	37,4 ± 0,840
1	656,1 ± 5,20	477,3 ± 2,49	37,5 ± 0,907
2	619,5 ± 3,14	440,9 ± 3,35	40,5 ± 1,49
4	537,7 ± 16,4	391,7 ± 13,8	37,3 ± 0,76
8	392,7 ± 40,5	297,8 ± 23,2	34,6 ± 4,65

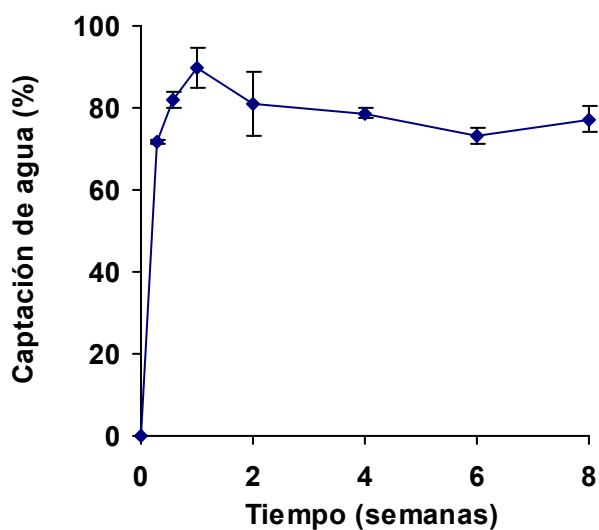
**Tabla 20.-** Pesos y porcentaje de agua captada de los implantes de la formulación F-3-20-10. Media ± desviación estándar (n = 5).

Tiempo (semanas)	Peso (húmedo) (mg)	Peso (seco) (mg)	Captación de agua (%)
0,286	821,4 ± 2,17	478,3 ± 0,404	71,7 ± 0,459
0,571	831,0 ± 10,2	457,0 ± 1,56	81,8 ± 1,89
1	854,4 ± 23,4	449,8 ± 2,43	89,9 ± 4,95
2	775,5 ± 25,4	428,9 ± 5,10	80,9 ± 7,94
4	642,6 ± 8,65	360,0 ± 4,86	78,6 ± 1,24
6	540,9 ± 5,74	312,5 ± 6,29	73,1 ± 1,95
8	421,8 ± 22,2	238,2 ± 13,9	77,2 ± 3,06

**Tabla 21.-** Pesos y porcentaje de agua captada de los implantes de la formulación F-3-20-40. Media ± desviación estándar (n = 5).



**Figura 43.-** Perfil de captación de agua de los implantes de la formulación F-3-20-10; Cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo ( $n = 5$ ).



**Figura 44.-** Perfil de captación de agua de los implantes de la formulación F-3-10-40; Cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo ( $n = 5$ ).

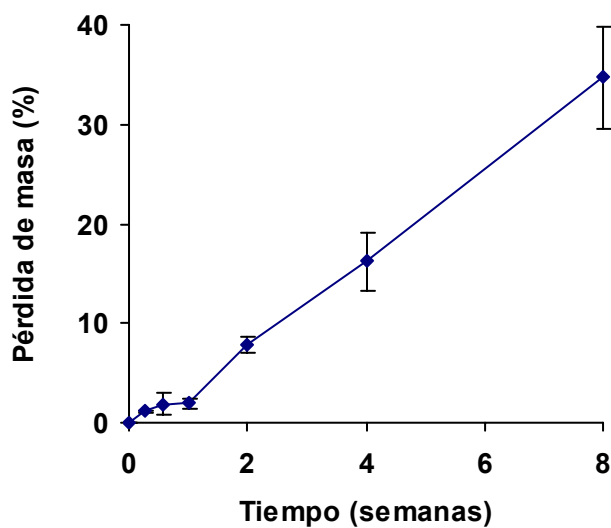
Los porcentajes de pérdida de masa de los implantes F-3-20-10, corregidos por la cantidad de ciprofloxacino cedida, se recogen en la tabla 22 y su representación gráfica frente al tiempo en la figura 45. En la tabla 23 se encuentran los resultados de pérdida de masa correspondientes a la formulación F-3-20-40 y en la figura 46 su representación gráfica.

Tiempo (semanas)	Peso (inicial) (mg)	P (inicial)-CFX (mg)	Peso (seco) (mg)	Pérdida de masa (%)
0,286	499,9 ± 0,346	495,6 ± 0,346	490 ± 0,757	1,13 ± 0,085
0,581	499,5 ± 0,306	492,3 ± 0,306	483,0 ± 5,45	1,88 ± 1,068
1	499,3 ± 0,371	486,9 ± 0,371	477,3 ± 2,49	1,99 ± 0,505
2	499,5 ± 0,329	478,3 ± 0,329	440,9 ± 3,35	7,80 ± 0,747
4	499,6 ± 0,436	467,3 ± 0,436	391,7 ± 13,8	16,2 ± 2,92
8	499,5 ± 0,382	456,4 ± 0,382	297,8 ± 23,2	34,7 ± 5,071

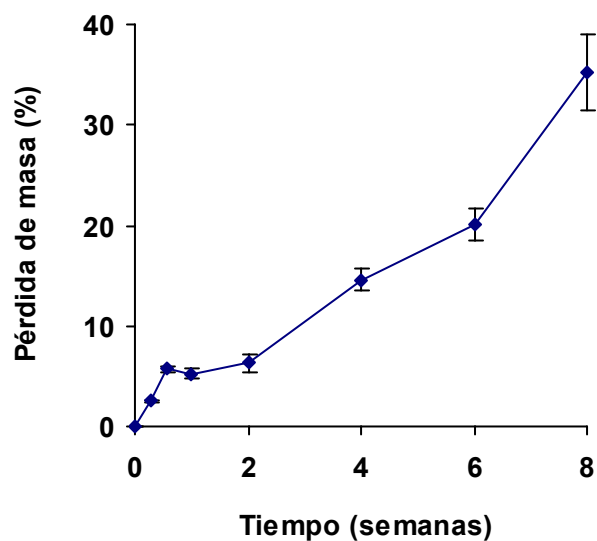
**Tabla 22.-** Pesos y porcentaje de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-3-20-10, corregidos por la cantidad de ciprofloxacino (CFX) cedida a cada tiempo. P = peso; Media ± desviación estándar (n = 5).

Tiempo (semanas)	Peso (inicial) (mg)	P (inicial)-CFX (mg)	Peso (seco) (mg)	Pérdida de masa (%)
0,286	497,8 ± 0,379	490,6 ± 0,379	478,3 ± 0,404	2,49 ± 0,070
0,571	498,1 ± 0,306	484,6 ± 0,306	457,0 ± 1,56	5,69 ± 0,294
1	497,9 ± 0,412	474,8 ± 0,412	449,8 ± 2,43	5,25 ± 0,537
2	498,9 ± 0,974	457,8 ± 0,974	428,9 ± 5,10	6,30 ± 0,954
4	497,2 ± 0,403	421,4 ± 0,403	359,9 ± 4,86	14,6 ± 1,10
6	497,7 ± 0,727	391,1 ± 0,727	312,5 ± 6,29	20,1 ± 1,56
8	497,8 ± 0,386	367,4 ± 0,386	238,2 ± 13,9	35,2 ± 3,77

**Tabla 23.-** Pesos y porcentaje de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-3-20-40, corregidos por la cantidad de ciprofloxacino (CFX) cedida a cada tiempo. P = peso; Media ± desviación estándar (n = 5).



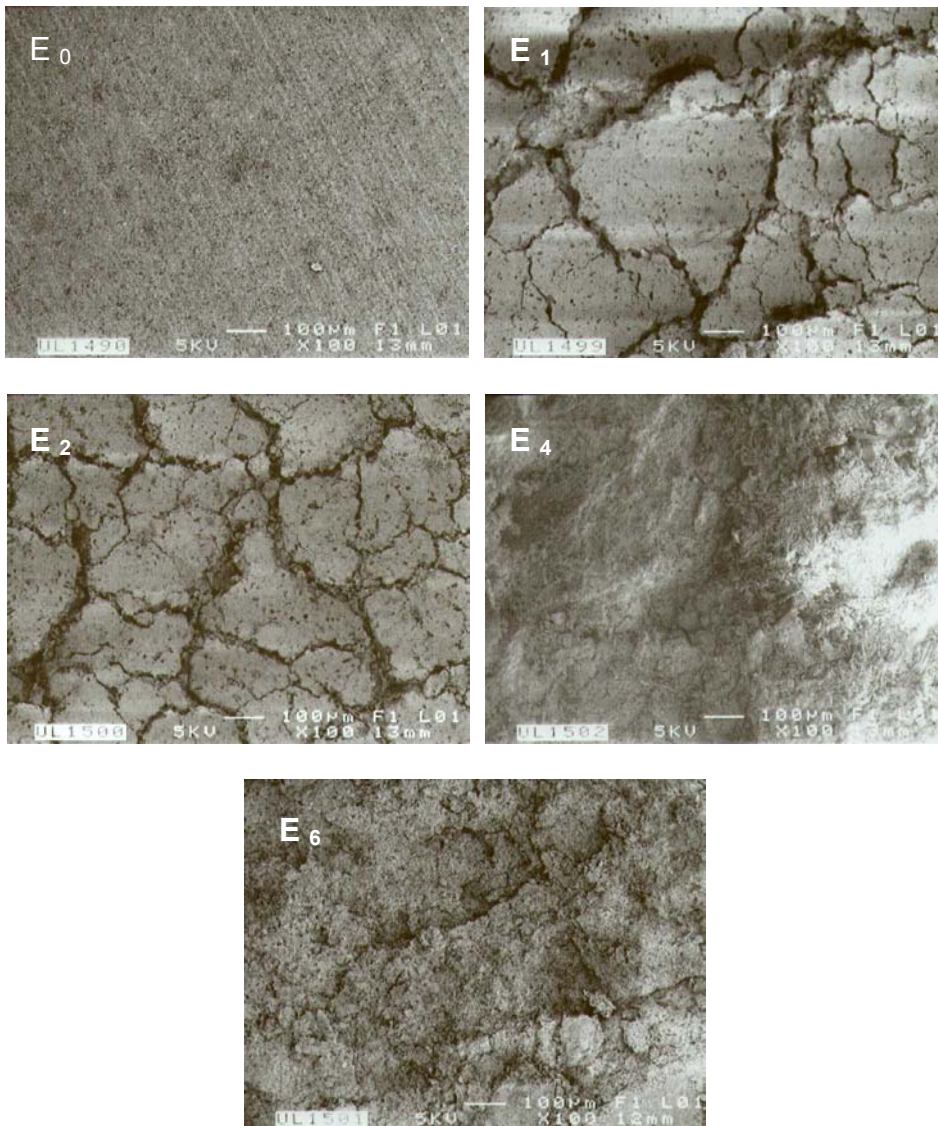
**Figura 45.-** Perfil de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-3-20-10, corregido por la cantidad de ciprofloxacino (CFX) cedida a cada tiempo; Cada punto representa el valor medio y desviación estándar ( $n = 5$ ).



**Figura 46.-** Perfil de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-3-20-40, corregido por la cantidad de ciprofloxacino (CFX) cedido a cada tiempo; Cada punto representa el valor medio y desviación estándar ( $n = 5$ ).

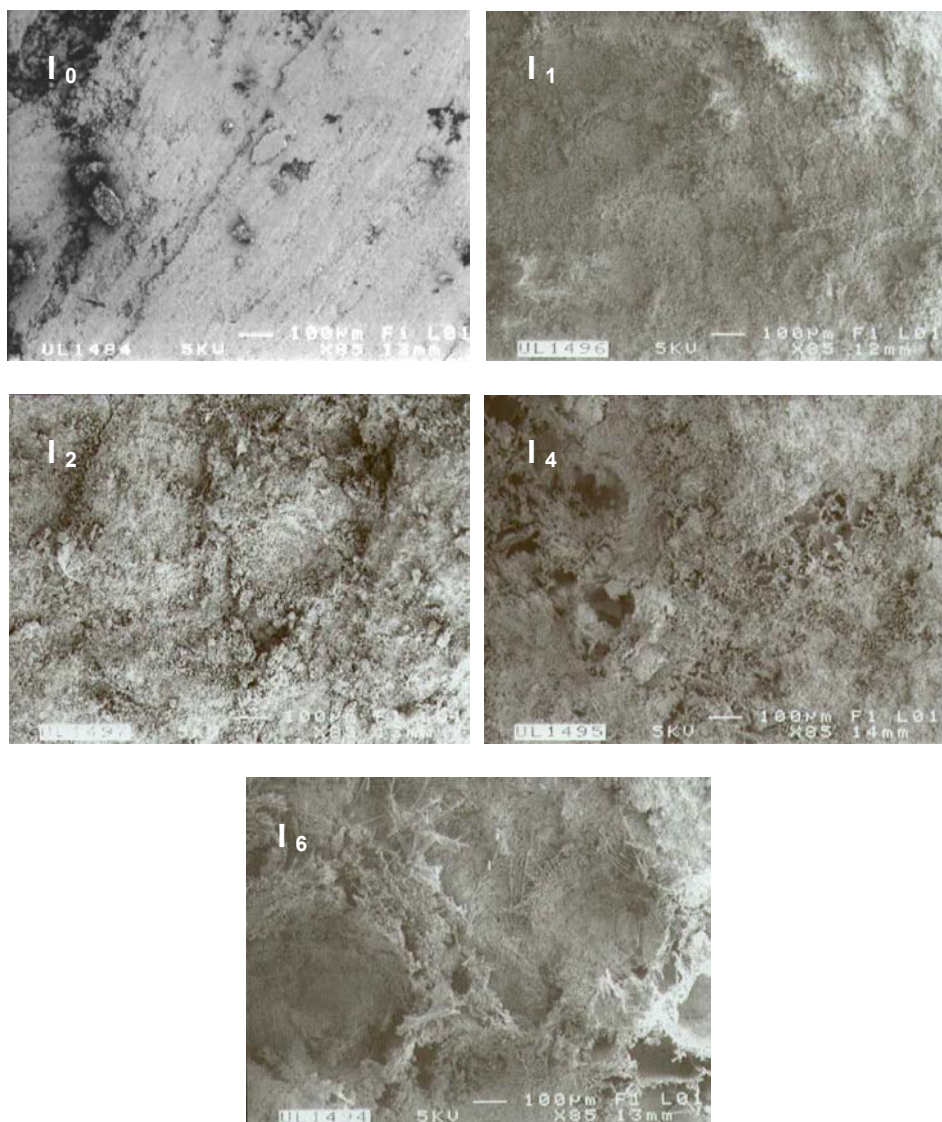
### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) durante el ensayo de cesión

En las figuras 47 y 48 se presentan las microfotografías realizadas por SEM a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*, del implante completo y de las secciones transversales, respectivamente para la formulación F-3-20-10.



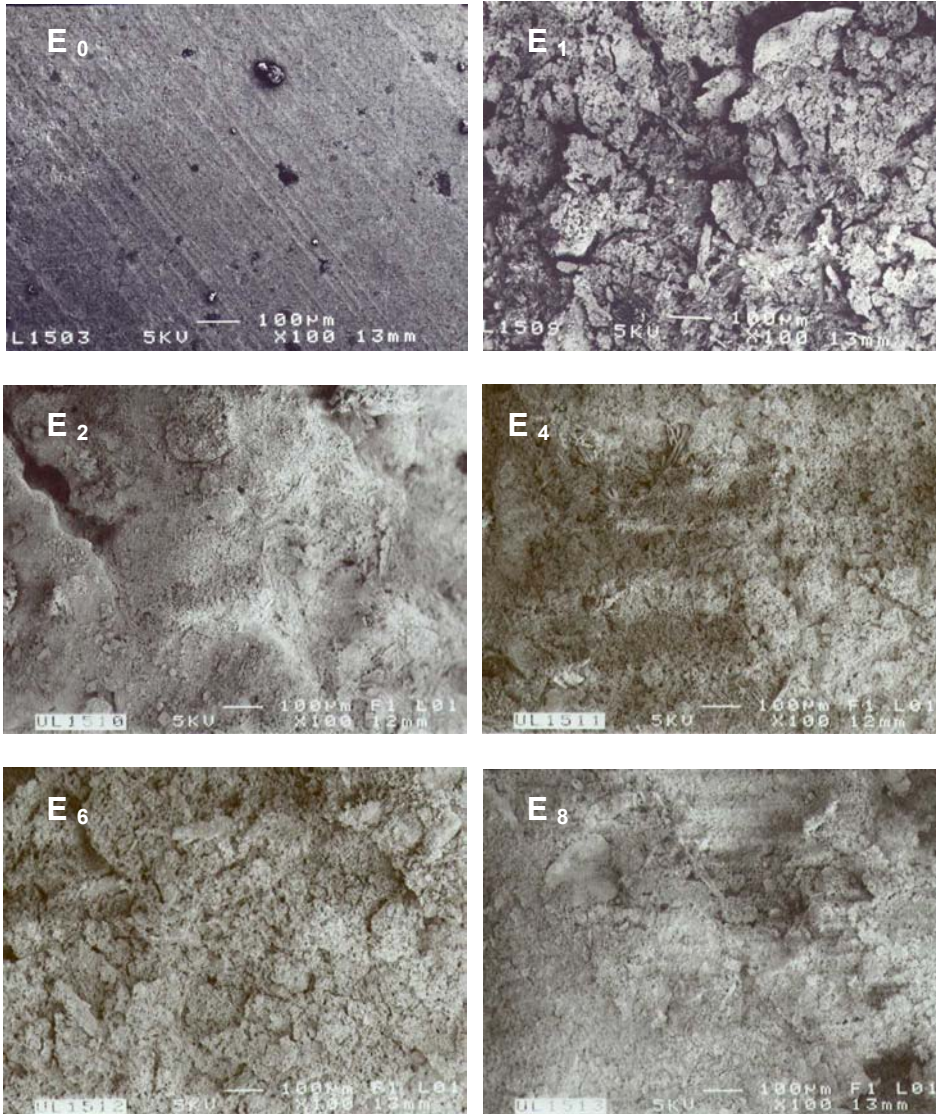
**Figura 47.-** Microfotografías del exterior (E) del implante de la formulación F-3-20-10 a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*. Los subíndices indican los tiempos en semanas.





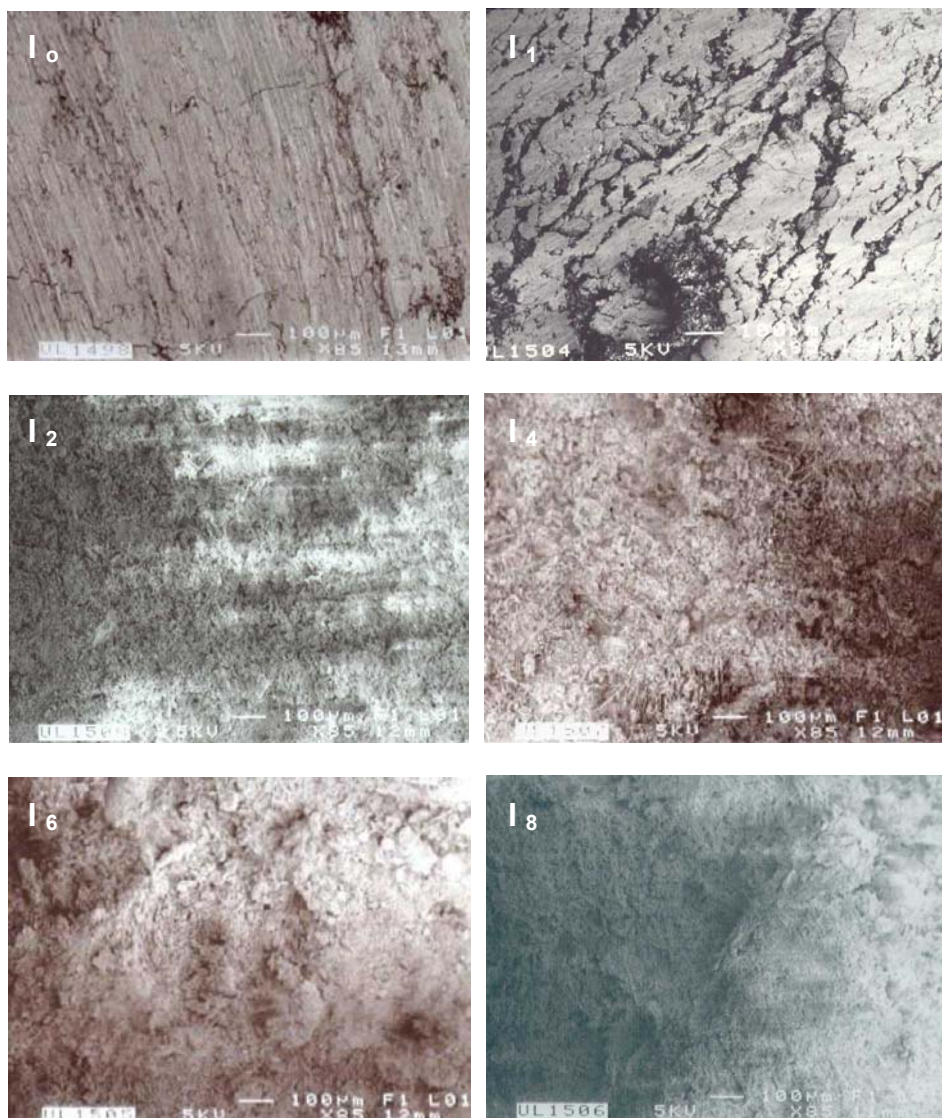
**Figura 48.-** Microfotografías correspondientes al corte transversal (I) del implante de la formulación F-3-20-10 a lo largo del ensayo de cesión in vitro. Los subíndices indican los tiempos en semanas.

En las figuras 49 y 50 se muestran las microfotografías realizadas al implante completo y a las secciones transversales del lote F-3-20-40.



**Figura 49.-** Microfotografías del exterior (E) del implante de la formulación F-3-20-40, a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*. Los subíndices indican los tiempos en semanas.



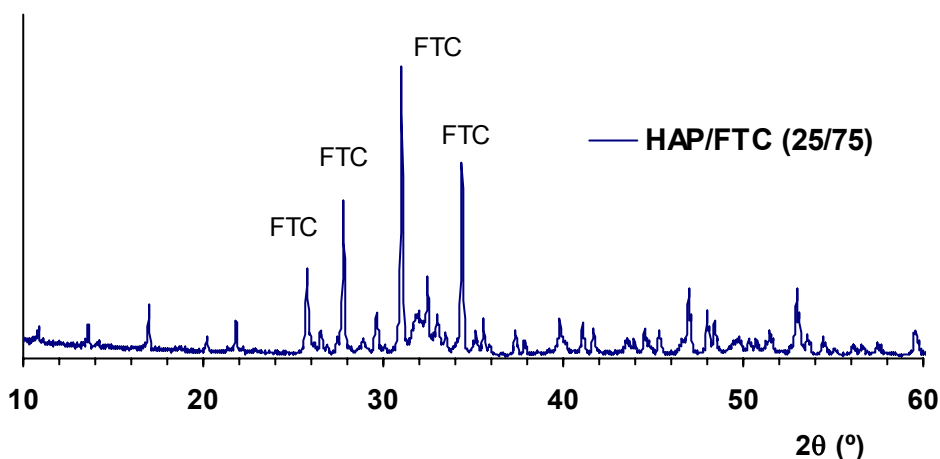


**Figura 50.-** Microfotografías correspondientes al corte transversal (I) del implante de la formulación F-3-20-40 a lo largo del ensayo de cesión in vitro. Los subíndices indican los tiempos en semanas.

## 2) Evolución temporal de los componentes del implante

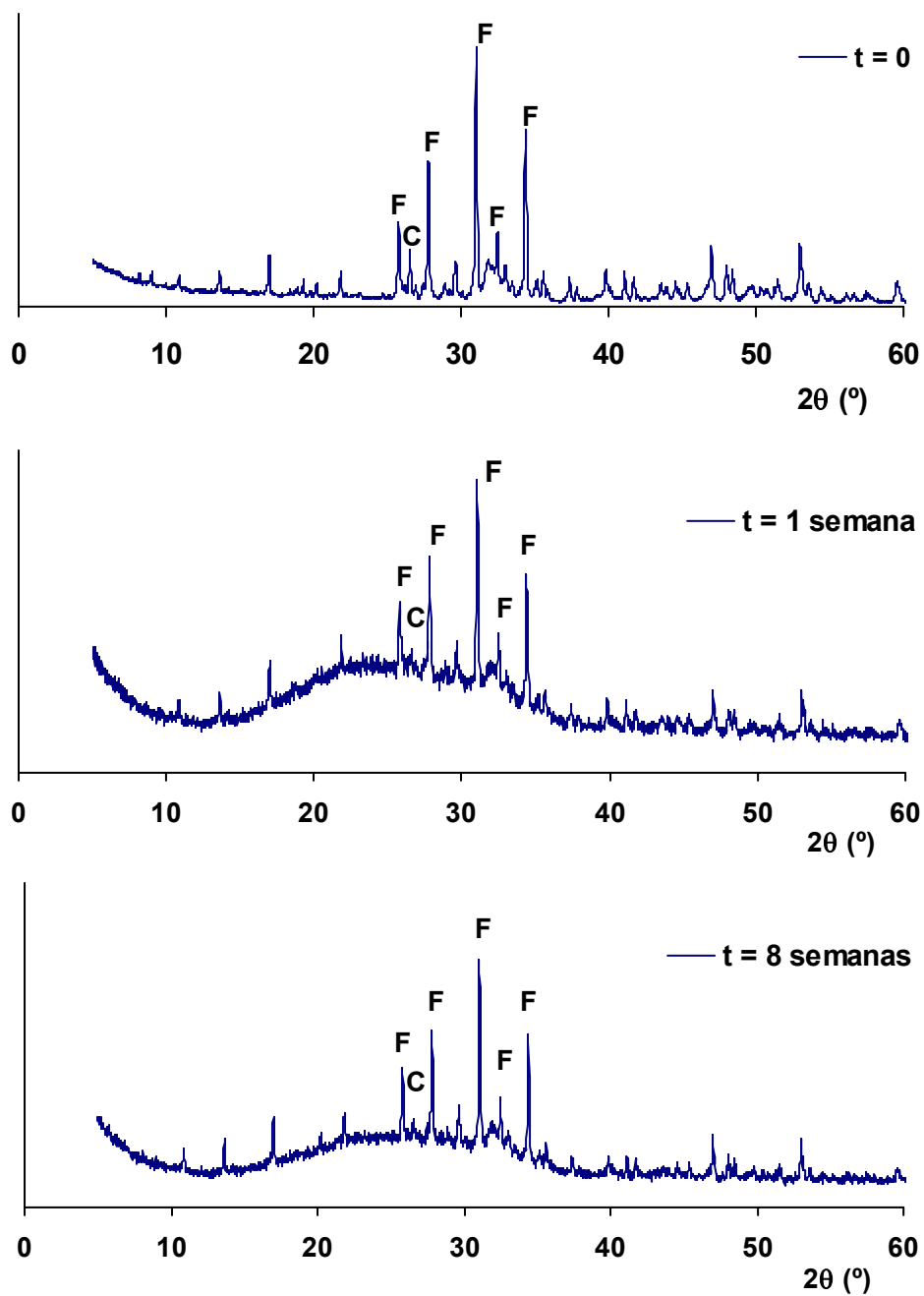
### a) **Análisis por Difracción de Rayos X**

En la figura 51 se muestra el difractograma de rayos X en polvo de los fosfatos que forman parte de los implantes de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40. Como se puede observar, el difractograma corresponde básicamente al del fosfato tricálcico, no apreciándose el pico correspondiente a la HAP.

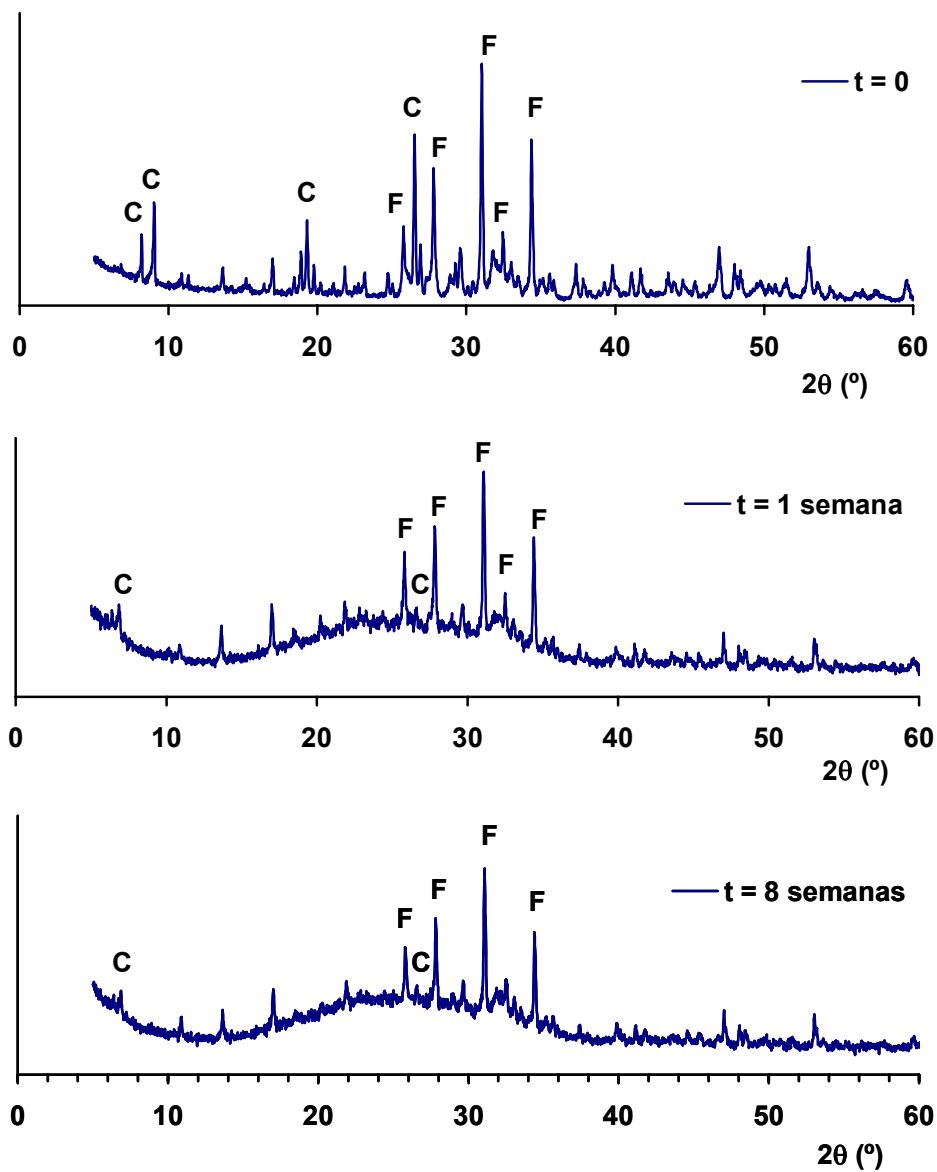


**Figura 51.-** Perfil de difracción de rayos X de la mezcla de fosfatos: hidroxiapatita (HAP) y fosfato tricálcico (FTC) en la proporción 25/75.

En las figuras 52 y 53 se muestran los difractogramas de rayos X en polvo de los implantes de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40 antes de comenzar el ensayo de cesión *in vitro* y tras una y ocho semanas de iniciado el ensayo.



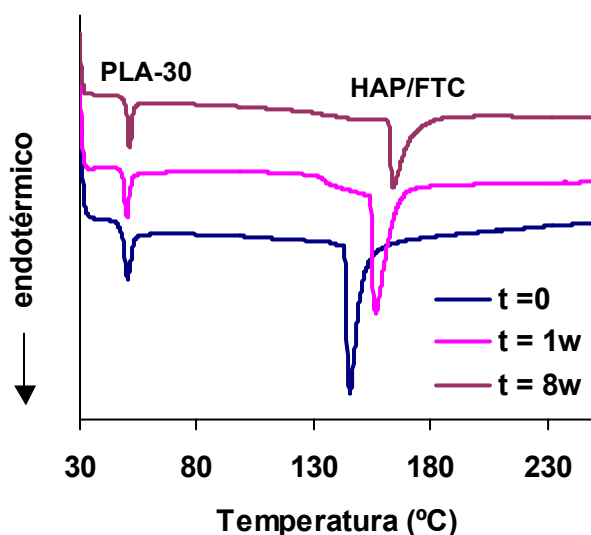
**Figura 52.-** Perfil de difracción de rayos X de los implantes de la formulación F-3-20-10 a tiempos 0, 1 y 8 semanas. F = FTC; C = ciprofloxacin.



**Figura 53.-** Perfil de difracción de rayos X de los implantes de la formulación F-3-20-40 a tiempos 0, 1 y 8 semanas. F = FTC; C = ciprofloxacino.

### b) Análisis de los fosfatos por DSC

En la figura 54 se recogen los termogramas correspondientes a la evolución temporal de los implantes blancos, en los que se aprecian los picos del PLA-30 y de la mezcla de fosfatos, tras su incubación en el medio de cesión.



**Figura 54.-** Termogramas del implante blanco a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*.

### c) Estudio de degradación del PLA-30 por GPC y DSC

El seguimiento de la degradación del polímero se llevó a cabo determinando los pesos moleculares y la Tg a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*.

En la tabla 24, se recoge la evolución del peso molecular y polidispersividad correspondiente al PLA-30 para la formulación F-3-20-10. Los resultados de degradación del PLA-30 durante el ensayo de cesión de los implantes del lote F-3-20-40 se encuentran en la tabla 25. La representación

gráfica de la variación del peso molecular en peso y polidispersividad del polímero, PLA-30, constituyente de los implantes del lote F-3-20-10, se muestra en la figura 55. Estos mismos resultados para el PLA-30 de la formulación F-3-20-40 se reflejan en la figura 56.

En la tabla 26 se recogen los valores de las temperaturas de transición vítrea del polímero correspondientes a estos mismos ensayos.

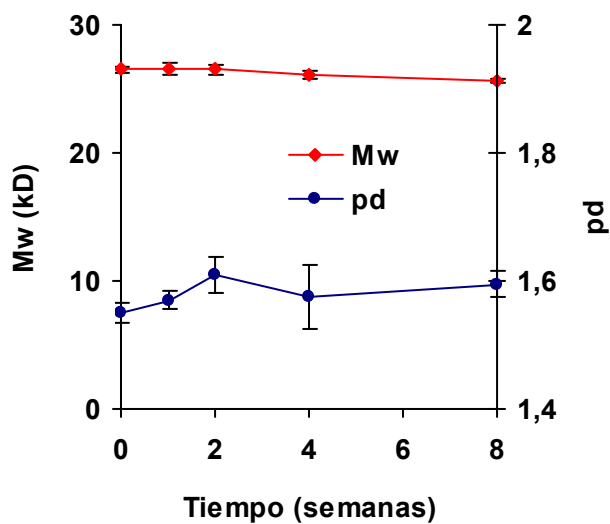
Tiempo (semanas)	Mw (D)	Mn (D)	pd
0	26492 ± 225,6	17076 ± 295,6	1,55 ± 0,014
1	26570 ± 494,3	15684 ± 157,3	1,74 ± 0,247
2	26503 ± 383,3	16453 ± 50,9	1,61 ± 0,028
4	26092 ± 250,3	16526 ± 680,2	1,58 ± 0,049
8	25631 ± 178,2	16061 ± 338	1,60 ± 0,021

**Tabla 24.-** Evolución de los pesos moleculares en peso (Mw) y en número (Mn) y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-3-20-10. Media ± desviación estándar (n = 3).

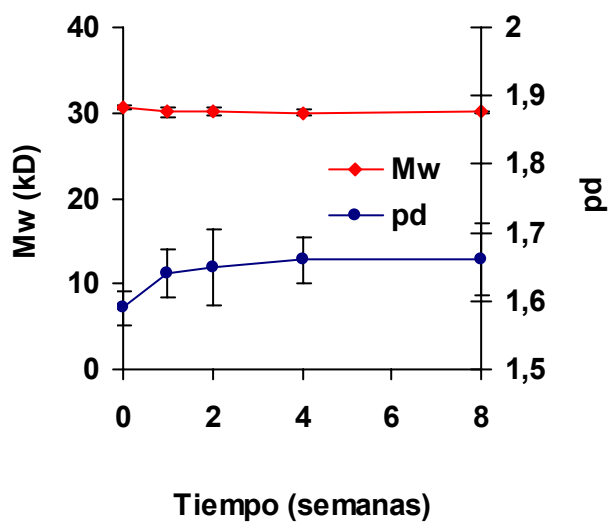
Tiempo (semanas)	Mw (D)	Mn (D)	pd
0	30628 ± 265,3	19212 ± 232,6	1,59 ± 0,025
1	30126 ± 623,5	18369 ± 187,8	1,64 ± 0,036
2	30163 ± 568,3	18230 ± 105,3	1,65 ± 0,055
4	30041 ± 436,6	18083 ± 562,2	1,66 ± 0,034
8	30128 ± 125,2	18189 ± 138,1	1,66 ± 0,052

**Tabla 25.-** Evolución de los pesos moleculares en peso (Mw) y en número (Mn) y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-3-20-40. Media ± desviación estándar (n = 3).





**Figura 55.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polispersividad del PLA-30 de la formulación F-3-20-10 durante el ensayo de cesión in vitro.



**Figura 56.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polispersividad del PLA-30 de la formulación F-3-20-40 durante el ensayo de cesión in vitro.

Tiempo (semanas)	Tg (°C)	
	F-3-20-10	F-3-20-40
0	45,0 ± 0,93	47,2 ± 0,30
1	45,9 ± 0,13	47,7 ± 0,42
2	45,3 ± 1,78	46,9 ± 0,09
4	47,0 ± 2,77	47,1 ± 2,53
6	n.d.	47,1 ± 0,54
8	44,1 ± 0,93	45,4 ± 0,71

**Tabla 26.-** Evolución de la temperatura de transición vítrea (Tg) del polímero durante el ensayo de cesión *in vitro* de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40; n.d. = valor no determinado.

## ESTUDIO *IN VIVO*

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo con las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40, con un 10 y un 40% de ciprofloxacino respectivamente, si bien con la formulación F-3-20-10 se procedió a realizar un estudio más exhaustivo.

### 1. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS CON LA FORMULACIÓN F-3-20-40

#### a) Ensayos de cesión de ciprofloxacino

Los porcentajes de ciprofloxacino remanente en los implantes de la formulación F-3-20-40, una vez insertados en el fémur de conejos se recogen en la tabla 27. El contenido de ciprofloxacino obtenido experimentalmente utilizando el método microbiológico fue del  $39,7 \pm 1,98\%$ .

Tiempo (semanas)	Ciprofloxacino remanente (%)			media	s.d.
	I	II	III		
1	82,5	82,4	82,0	82,3	0,260
2	75,1	75,5	76,2	75,6	0,561
4	71,8	71,2	69,0	70,7	1,47

**Tabla 27.-** Porcentajes remanentes de ciprofloxacino en los implantes de la formulación F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

#### b) Niveles de ciprofloxacino en tejido óseo

En las tablas 28-32 se recogen los niveles de ciprofloxacino alcanzados en las distintas zonas de la cortical del fémur a lo largo de 4 semanas tras la colocación de implantes de la formulación F-3-20-40. Los correspondientes niveles en médula se encuentran recogidos

en las tablas 33 - 36. En la zona metafisariadistal no se dispone de la muestra de médula.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	981,1	1214,0	1368,0	1187,8	194,9
2	681,1	925,7	634,8	747,2	156,3
4	256,3	308,5	225,7	263,5	41,9

**Tabla 28.-** Niveles de ciprofloxacino en la zona de metáfisis distal de la cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	13773	10524	8048	10782	2871
2	4435	5310	4394	4713	517,0
4	2561	2356	2282	2399	145,0

**Tabla 29.-** Niveles de ciprofloxacino en el tercio distal de la diáfisis cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	115,3	110,3	92,5	106,0	11,9
2	112,2	56,4	23,4	64,0	44,9
4	33,2	22,6	16,8	24,2	8,32

**Tabla 30.-** Niveles de ciprofloxacino en el tercio medio de la diáfisis cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	46,0	32,1	21,1	33,1	12,5
2	18,3	12,3	20,0	16,9	4,05
4	10,6	6,65	12,9	10,1	3,16

**Tabla 31.-** Niveles de ciprofloxacino en el tercio proximal de la diáfisis cortical del fémur de conejo correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	21,4	12,5	8,54	14,1	6,59
2	4,21	6,25	6,27	5,58	1,18
4	4,51	5,21	4,81	4,84	0,356

**Tabla 32.-** Niveles de ciprofloxacino en la zona de metáfisis proximal de la cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	7674	5425	2856	5318	2411
2	1248	1365	1466	1360	109,0
4	352,8	389,0	452,3	398,0	50,4

**Tabla 33.-** Niveles de ciprofloxacino en médula del tercio distal de la diáfisis del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	664,3	513,2	275,8	484,4	195,8
2	67,4	79,2	83,4	76,7	8,29
4	23,2	18,6	68,7	36,8	27,7

**Tabla 34.-** Niveles de ciprofloxacino en médula del tercio medio de la diáfisis del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	79,6	83,4	14,3	59,1	38,8
2	39,0	15,4	41,8	32,1	14,5
4	5,64	4,68	8,23	6,18	1,84

**Tabla 35.-** Niveles de ciprofloxacino en médula del tercio proximal de la diáfisis del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	17,4	16,2	7,75	13,8	5,26
2	0	3,62	9,38	4,33	4,73
4	0	0	1,86	0,620	1,07

**Tabla 36.-** Niveles de ciprofloxacino en médula de la zona de metáfisis proximal del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

En las tablas 37 - 39 se recogen los niveles de ciprofloxacino alcanzados en las distintas zonas de la cortical de la tibia a lo largo de 4 semanas tras la colocación de implantes de la formulación F-3-20-40. En las correspondientes zonas de la médula no se detectaron niveles.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	4,91	5,64	9,98	6,84	2,74
2	1,44	3,68	7,32	4,15	2,97
4	13,6	14,1	14,7	14,1	0,55

**Tabla 37.-** Niveles de ciprofloxacino en la zona metafisaria proximal de la cortical de la tibia de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	0	1,45	2,67	1,37	1,34
2	0	1,05	1,3	0,78	0,69
4	37,5	2,12	1,9	13,8	20,5

**Tabla 38.-** Niveles de ciprofloxacino en la diáfisis de la cortical de la tibia de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
1	2,10	1,56	3,81	2,49	1,17
2	3,16	4,58	6,54	4,76	1,70
4	9,45	6,30	2,84	6,20	3,31

**Tabla 39.-** Niveles de ciprofloxacino en la zona metafisaria distal de la cortical de la tibia de conejos correspondientes a F-3-20-40. Media  $\pm$  desviación estándar.

### c) Ciprofloxacino en suero

Las concentraciones de ciprofloxacino en sangre no fueron detectables a lo largo del ensayo por el método microbiológico utilizado para su valoración.

## 2. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS CON LA FORMULACIÓN F-3-20-10

### a) Ensayos de cesión de ciprofloxacino

Los porcentajes de ciprofloxacino remanente en los implantes de la formulación F-3-20-10, una vez insertados en el fémur de conejos se recogen en la tabla 40. El contenido de ciprofloxacino obtenido experimentalmente utilizando el método microbiológico fue del  $10,5 \pm 0,463\%$ .

Tiempo (semanas)	Ciprofloxacino remanente (%)			media	s.d.
	I	II	III		
0,429	75,9	76,0	74,0	75,3	1,13
1	70,3	75,6	71,0	72,3	2,88
2	63,7	59,0	62,8	61,8	2,49
3	38,2	45,3	44,1	42,5	3,80
4	30,5	30,7	30,2	30,5	0,250
6	2,0	3,80	3,60	3,20	0,970

**Tabla 40.-** Porcentajes remanentes de ciprofloxacino en los implantes de la formulación F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

### b) Niveles de ciprofloxacino en tejido óseo

En las tablas 41 - 45 se recogen los niveles de ciprofloxacino alcanzados en las distintas zonas de la cortical del fémur a lo largo de 6 semanas tras la colocación de implantes de la formulación F-3-20-10.



Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	266,3	250,1	179,8	232,1	46,0
1	132,4	65,8	46,8	81,7	45,0
2	250,0	308,0	316,4	291,5	36,2
3	372,2	250,6	136,6	253,1	117,8
4	25,1	30,2	36,3	30,5	5,61
6	5,15	10,8	13,7	9,88	4,35

**Tabla 41.-** Niveles de ciprofloxacino en la zona de metáfisis distal de la cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	1024	2000	3393	2139	1191
1	433,5	1095	1430	986,2	507,1
2	379,6	152,3	78,9	203,6	156,8
3	2217	1114	207,2	1179	1006
4	134,4	130,0	126,3	130,2	4,06
6	20,5	16,1	11,3	15,9	4,60

**Tabla 42.-** Niveles de ciprofloxacino en el tercio diafisariodistal de la cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	3,77	23,6	576,0	201,1	325
1	23,7	75,3	166,4	88,5	72,3
2	30,2	19,4	10,5	20,0	9,87
3	34,9	21,9	5,01	20,6	15,0
4	1,57	5,80	6,14	4,50	2,55
6	0	0	0	0	0

**Tabla 43.-** Niveles de ciprofloxacino en el tercio medio de la diáfisis de la cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	0	1,89	2,61	1,50	1,35
1	7,30	36,1	44,4	29,3	19,5
2	4,51	3,05	3,15	3,57	0,816
3	13,5	1,23	3,0	5,91	6,63
4	3,96	0,98	2,11	2,35	1,50
6	0	0	0	0	0

**Tabla 44.-** Niveles de ciprofloxacino en el tercio proximal de la diáfisis de la cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	0	0	0	0	0
1	2,80	4,60	6,80	4,73	2,0
2	0,284	6,42	11,3	6,0	5,52
3	6,70	3,27	0,563	3,51	3,08
4	1,12	1,09	0,56	0,923	0,315
6	0	0	0	0	0

**Tabla 45.-** Niveles de ciprofloxacino en la zona de metáfisis proximal de la cortical del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

En las tablas 46 - 48 se recogen los niveles de ciprofloxacino alcanzados en la médula de la zona diafisaria del fémur a lo largo de 6 semanas tras la implantación de la formulación F-3-20-10. No se dispone de muestras de médula de la zona metafisariadistal y no se detectaron niveles en la metáfisis proximal.

Tiempo (semanas)	µg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	343,1	245,3	m.n.d.	294,2	69,2
1	197,1	124,9	m.n.d.	161,0	51,1
2	568,2	367,2	102,3	345,9	233,7
3	1072	756,1	235,1	687,7	422,5
4	53,0	54,1	56,7	54,6	1,9
6	0	0	0	0	0

**Tabla 46.-** Niveles de ciprofloxacino en la médula del tercio diafisariodistal del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar; m.n.d.: muestra no disponible.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	3,73	389,3	1472	621,7	761,3
1	27,2	122,5	206,9	118,9	89,9
2	122,0	65,1	21,6	69,6	50,3
3	93,0	15,3	7,63	38,6	47,2
4	8,33	2,45	0	3,59	4,28
6	0	0	0	0	0

**Tabla 47.-** Niveles de ciprofloxacino en la médula del tercio medio de la diáfisis del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	0	0	m.n.d.	0	0
1	0	9,68	14,1	7,93	7,21
2	6,51	3,42	0	3,31	3,25
3	18	0	0	6,01	10,4
4	10,1	0	0	3,37	5,83
6	0	0	0	0	0

**Tabla 48.-** Niveles de ciprofloxacino en la médula del tercio proximal de la diáfisis del fémur de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Los niveles de ciprofloxacino alcanzados en la cortical de la tibia a lo largo de 6 semanas tras la colocación de implantes de la formulación F-3-20-10 se muestran en las tablas 49 - 51. No se detectaron niveles en la médula.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	0,693	0,742	0,817	0,751	0,063
1	0	0,243	0,672	0,305	0,340
2	14,5	8,52	2,96	8,66	5,77
3	3,92	2,94	3,48	3,45	0,491
4	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

**Tabla 49.-** Niveles de ciprofloxacino en la cortical de la metáfisis proximal de la tibia de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	2,71	1,95	0	1,55	1,39
3	1,01	1,24	2,67	1,64	0,903
4	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

**Tabla 50.-** Niveles de ciprofloxacino en la cortical de la diáfisis de la tibia de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	μg ciprofloxacino/g de tejido			Media	s.d.
	I	II	III		
0,429	0,862	0	0	0,287	0,498
1	0	0	0	0	0
2	1,12	0	0	0,373	0,647
3	1,11	2,15	3,05	2,11	0,976
4	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

**Tabla 51.-** Niveles de ciprofloxacino en la cortical de la metáfisis distal de la tibia de conejos correspondientes a F-3-20-10. Media  $\pm$  desviación estándar.

### c) Ciprofloxacino en suero

Como ocurrió con la formulación F-3-20-40, en este caso tampoco se detectaron niveles de ciprofloxacino en sangre.

### d) Control de la función renal

En este apartado se recogen los niveles de creatinina en suero correspondientes a los conejos implantados con las dos formulaciones estudiadas *in vivo*, F-3-20-10 y F-3-20-40.

Los valores basales encontrados en todos los animales utilizados en el estudio están comprendidos entre 0,73 y 1,44 mg/dl. Estos valores se ajustan a los recogidos en la bibliografía para conejos adultos: 0,8 – 1,8 mg/dl (Wolford et al., 1986).

Los intervalos de niveles de creatinina en suero alcanzados a los distintos tiempos del ensayo se recogen en la tabla 52.

Tiempo (semanas)	Creatinina en suero (mg/dl)
1	0,78 – 1,35
2	0,8 – 1,35
3	1,02 – 1,2
4	0,95 – 1,17
6	0,8 – 1,12
12	0,9 – 1,4
24	0,86 – 1,2

**Tabla 52.- Intervalos de concentraciones de creatinina en suero (mg/dl) alcanzadas a los distintos tiempos tras la implantación de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40.**

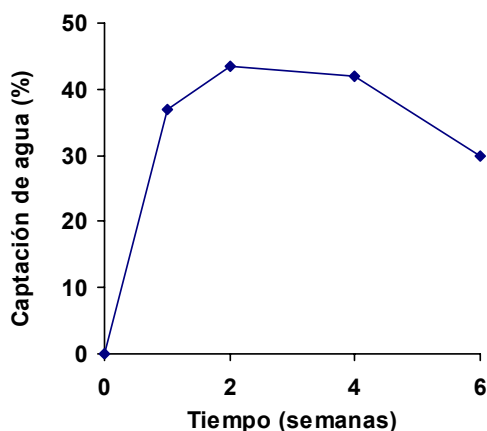
### **e) Caracterización de la formulación F-3-20-10 durante los ensayos *in vivo***

#### **1) Captación de agua**

En la tabla 53 se recogen los porcentajes de agua captada por los implantes de la formulación F-3-20-10 y en la figura 57 su representación gráfica a lo largo de 6 semanas.

Tiempo (semanas)	Peso inicial (mg)	Peso (húmedo) (mg)	Peso (seco) (mg)	Captación de agua (%)
1	499,8	720,4	525,8	37,0
2	499,8	794,5	553,6	43,5
4	499,8	711,8	501,1	42,0
6	499,8	583,1	448,6	30,0

**Tabla 53.- Pesos y porcentaje de agua captada por los implantes de la formulación F-3-20-10 durante el ensayo *in vivo*.**



**Figura 57.-** Perfil de captación de agua de los implantes de la formulación F-3-20-10 durante los ensayos *in vivo*.

## 2) Estructura de los implantes

En las figuras 58 y 59 se muestran las microfotografías realizadas por SEM a lo largo del ensayo de cesión *in vivo*, del implante completo y de las secciones transversales respectivamente, para la formulación F-3-20-10.

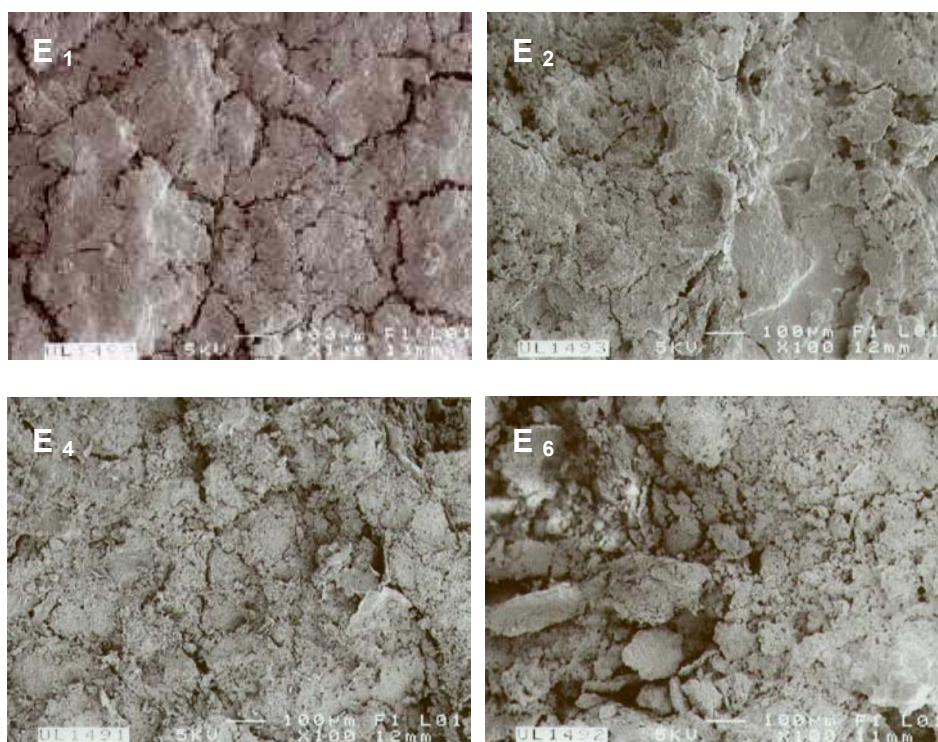
## 3) Degradación del PLA-30

El seguimiento de la degradación del polímero se llevó a cabo determinando los pesos moleculares y la temperatura de transición a lo largo del ensayo de cesión *in vivo*.

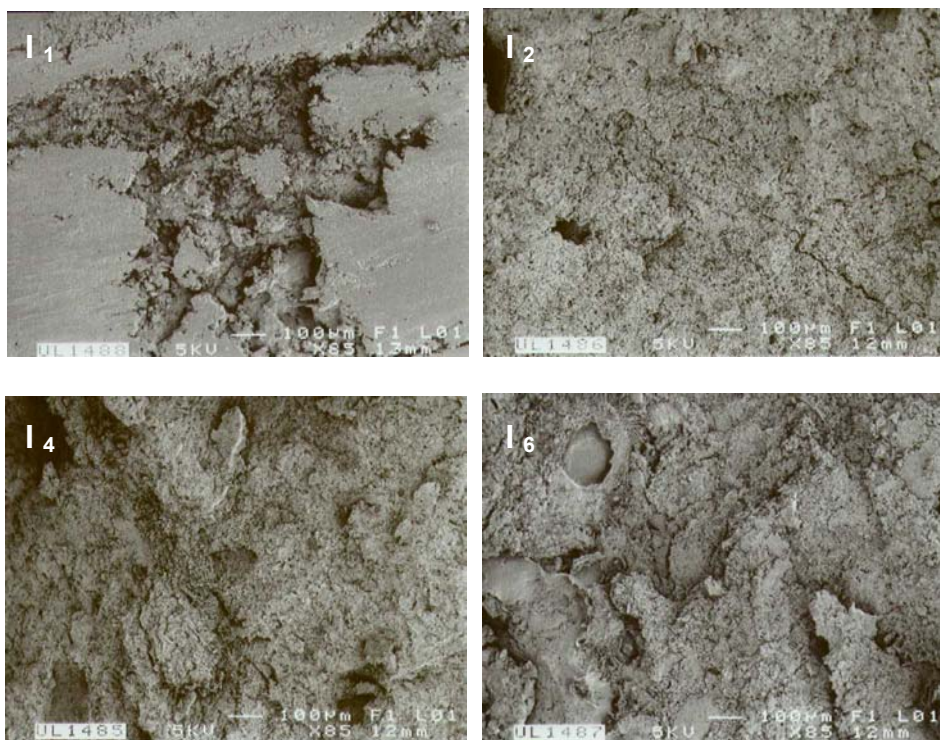
En la tabla 54, se recoge la evolución del peso molecular y polidispersividad correspondiente al PLA-30 para la formulación F-3-20-10 y su representación gráfica se muestra en la figura 60.

Los valores de temperatura de transición vítrea del polímero correspondientes a estos mismos ensayos se recogen en la tabla 55.





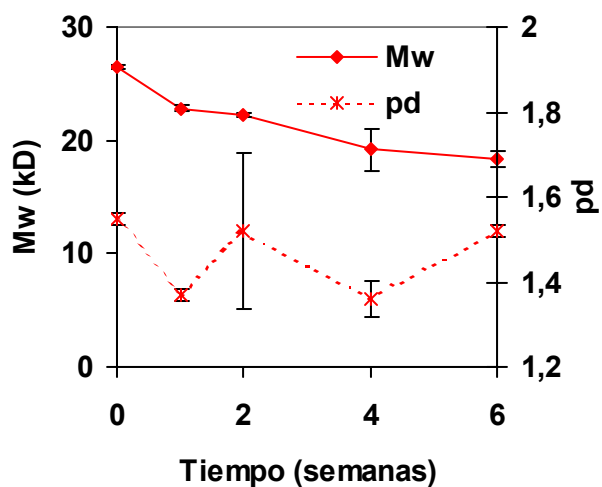
**Figura 58.-** Microfotografías del exterior (E) del implante de la formulación F-3-20-10 a lo largo del ensayo de cesión in vivo. Los subíndices indican los tiempos en semanas.



**Figura 59.-** Microfotografías correspondientes al corte transversal (I) del implante de la formulación F-3-20-10 a lo largo del ensayo de cesión in vivo. Los subíndices indican los tiempos en semanas.

Tiempo (semanas)	Mw (D)	Mn (D)	pd
0	26492 ± 225,6	17076 ± 295,6	1,55 ± 0,014
1	22815 ± 275,1	16636 ± 398,1	1,37 ± 0,014
2	22272 ± 217,1	14737 ± 1925	1,52 ± 0,184
4	19161 ± 1839,9	14034 ± 932,0	1,36 ± 0,042
6	18409 ± 729,7	12106 ± 539,5	1,52 ± 0,014

**Tabla 54.-** Evolución de los pesos moleculares en peso (Mw) y en número (Mn) y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-3-20-10 durante el ensayo in vivo. Media ± desviación estándar (n = 3).



**Figura 60.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polispersividad del PLA-30 de la formulación F-3-20-10 durante el ensayo de cesión in vivo.

Tiempo (semanas)	Tg (°C)
0	45,0 ± 0,93
1	42,3 ± 0,18
2	46,8 ± 1,53
4	48,7 ± 0,50
6	47,2 ± 0,02

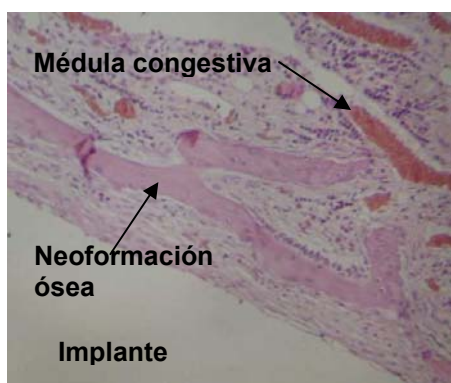
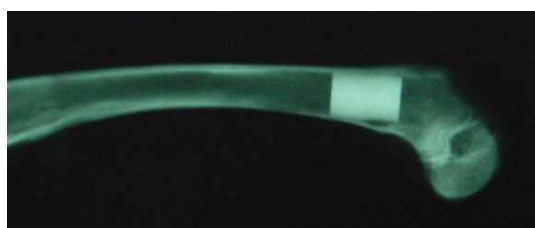
**Tabla 55.-** Evolución de la temperatura de transición vítrea (Tg) del polímero durante el ensayo de cesión in vivo de la formulación F-3-20-10.

## f) Resultados radiológicos e histológicos

### 1) **Implantes blancos**

Las siguientes radiografías e imágenes histológicas corresponden al ensayo realizado *in vivo* con implantes que tienen igual composición y presión que el lote F-3-20-10, pero que no contienen ciprofloxacino. Las muestras reservadas para este estudio se analizaron a lo largo de 8 semanas tras la colocación del implante, observándose los siguientes resultados:

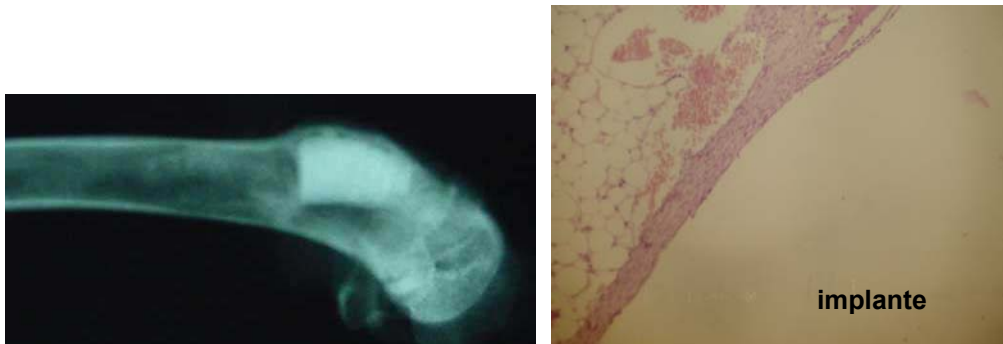
♣ 1 semana: en la Rx se observa ausencia de reacción perióstica y de interface implante-hueso. El implante está entero y no se aprecia neoformación ósea. En la imagen histológica sin embargo, si se aprecia neoformación ósea inmadura así como, focos de necrosis y médula congestiva, periimplantes (Figura 61).



**Figura 61.-** Rx e imagen histológica obtenidas a la semana de la colocación del implante blanco en el fémur.

♣ 4 semanas: en la Rx se aprecia ausencia de reacción perióstica y de interface implante-hueso. En el polo distal del implante, se observa claramente su disgregación. Puede apreciarse, neoformación ósea periimplante y en la cortical anterior. La imagen histológica es superponible a

la anterior, no observándose en ella todavía, septos conectivos vasculares que penetren en el implante (Figura 62).



**Figura 62.-** Rx e imagen histológica obtenidas a las 4 semanas de la colocación del implante blanco en el fémur.

♣ 8 semanas: en la Rx sigue sin apreciarse reacción perióstica ni interface implante-hueso. Se observan tractos óseos o espículas en el implante, lo que significa el inicio de crecimiento óseo hacia su interior. El implante prácticamente se encuentra intacto, aunque hay una leve disgregación. En la imagen histológica se observan septos finos conectivos vasculares que penetran hacia el interior del implante (Figura 63).

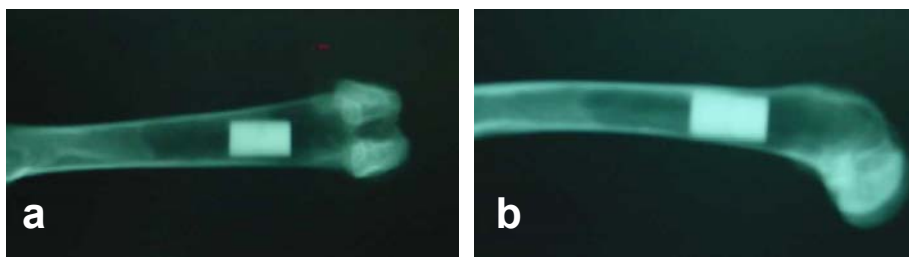


**Figura 63.-** Rx e imagen histológica obtenidas a las 8 semanas de la colocación del implante blanco en el fémur.

## 2) Implantes de la formulación F-3-20-10

Las muestras reservadas para el estudio radiológico e histológico con implantes del lote F-3-20-10 se analizaron a lo largo de 24 semanas tras la colocación del implante.

Inicialmente, tras la inserción del implante en la cavidad medular del fémur, se hizo una radiografía (Figura 64) para verificar su posición y el estado en que está, observándose el vacío de la cavidad medular debido a la reacción traumática realizada durante el fresado. El implante está localizado en la zona diafisaria-distal y está claramente diferenciado del tejido óseo.



**Figura 64.-** Rx obtenida inmediatamente después de insertar un implante de la formulación F-3-20-10; (a), Rx antero-posterior y (b), Rx lateral.

Los resultados a lo largo del ensayo son los siguientes:

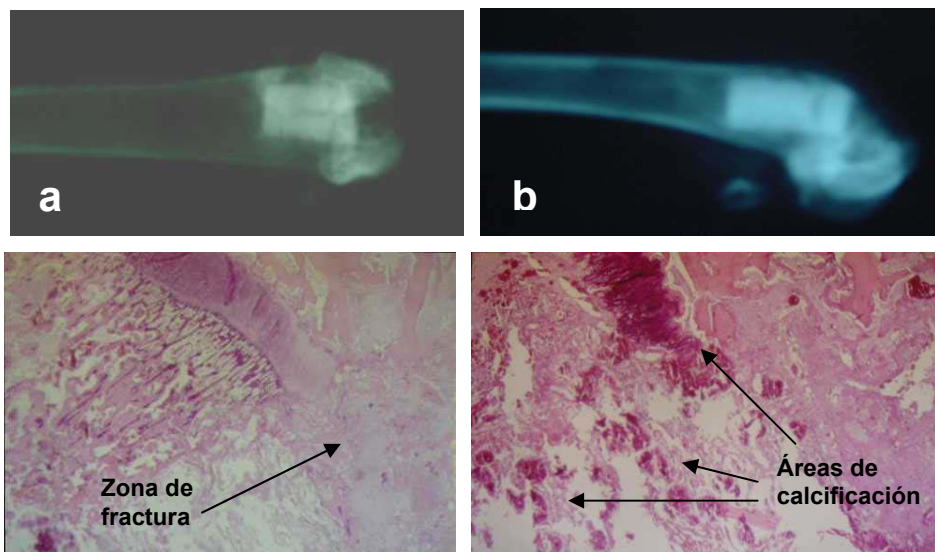
### ♣ 1 semana

Rx antero-posterior: se observa ausencia de reacción perióstica, corticales no engrosadas y permanecen los signos de vacío debido a la reacción traumática realizada durante el fresado de la cavidad medular. Así mismo, vemos que el implante sigue diferenciado del tejido óseo y localizado en la región metafiso-epifisaria-distal. Las grietas que se observan son debidas a la baja presión utilizada durante la compresión (Figura 65a).

Rx lateral: se aprecia un adelgazamiento de las corticales coincidiendo con signos de vacío debido al fresado. En cuanto al implante, está claramente delimitado, observándose las grietas en su interior (Figura 65b).



El resultado del estudio histológico muestra fractura, áreas isquémicas y hemorrágicas periimplante, que alcanzan y traspasan la metáfisis. Se observan abundantes calcificaciones en el interior del implante (Figura 65).

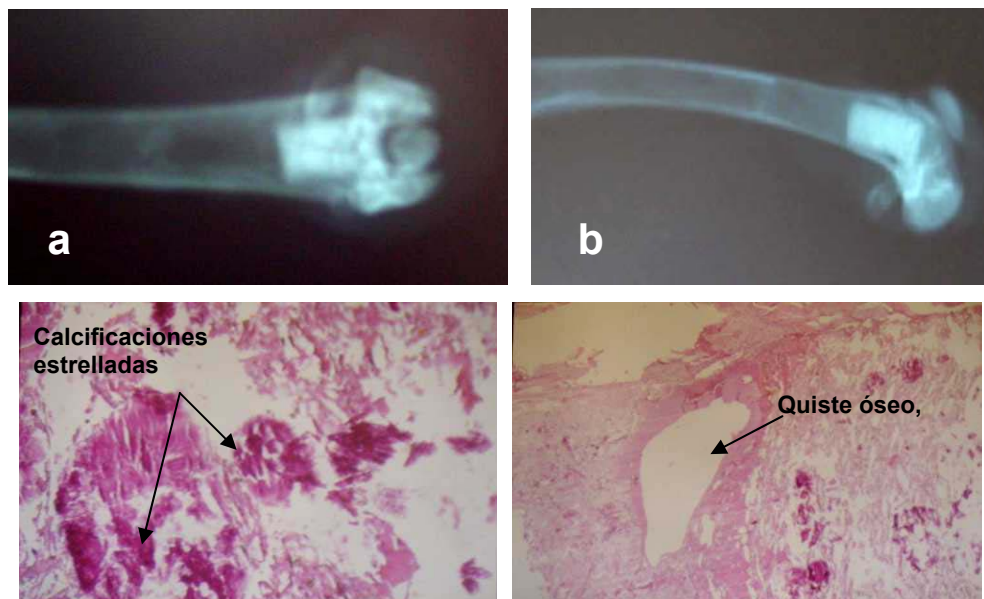


**Figura 65.-** Rx e imágenes histológicas obtenidas a la semana de la colocación del implante del lote F-3-20-10; (a), Rx antero-posterior y (b), Rx lateral.

#### ♣ 2 semanas

Rx antero-posterior: no se aprecian diferencias radiológicas con respecto a la anterior, no observándose reacción perióstica ni endóstica (Figura 66a). Lo mismo ocurre en la radiografía lateral (Figura 66b).

En la imagen histológica se observa un callo de fractura importante trismetafisario. En la zona contralateral se aprecian signos de necrosis isquémica y hemorragia con otro callo de fractura y se descubre la presencia de un pequeño quiste óseo. En el interior del implante hay calcificaciones estrelladas y clara osificación (osteóide acelular) (Figura 66).



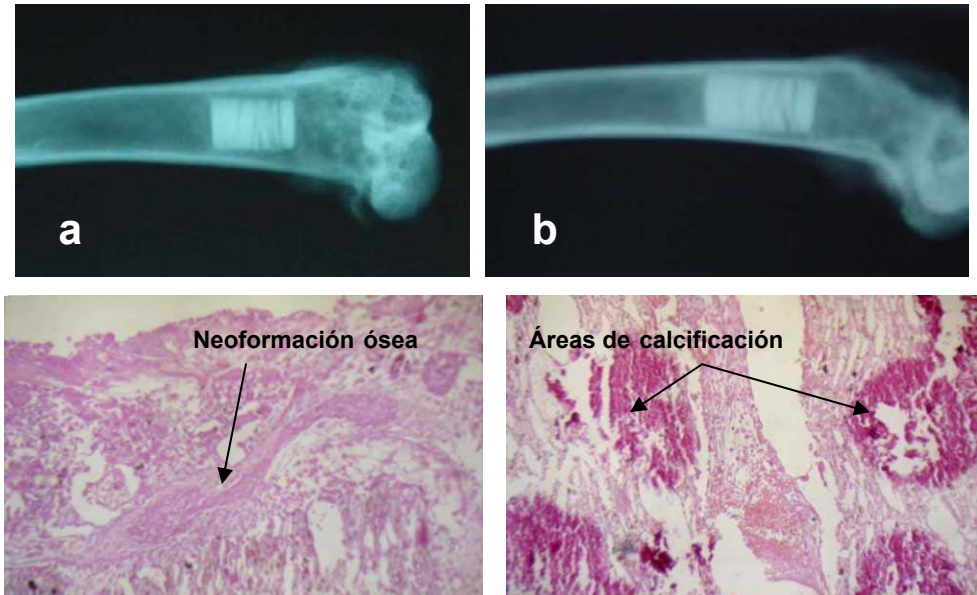
**Figura 66.-** Rx e imágenes histológicas obtenidas a las 2 semanas de la colocación del implante del lote F-3-20-10. (a), Rx antero-posterior y (b), Rx lateral.

#### ♣ 4 semanas

Rx antero-posterior y lateral: se observa que la cavidad se ha ido rellenando de tejido óseo de aspecto normal. El implante se diferencia claramente del hueso, continúa con grietas y parece iniciar relaciones con la cortical posterior interna (Figura 67).

En la imagen histológica se observa un callo de fractura triangular periférico. Se aprecian neoformación ósea y osificaciones periimplante, así como abundantes calcificaciones en el interior del implante. En la imagen se ve un septo conectivovascular grueso (Figura 67).





**Figura 67.-** Rx e imágenes histológicas obtenidas a las 4 semanas de la colocación del implante del lote F-3-20-10. (a), Rx antero-posterior y (b), Rx lateral.

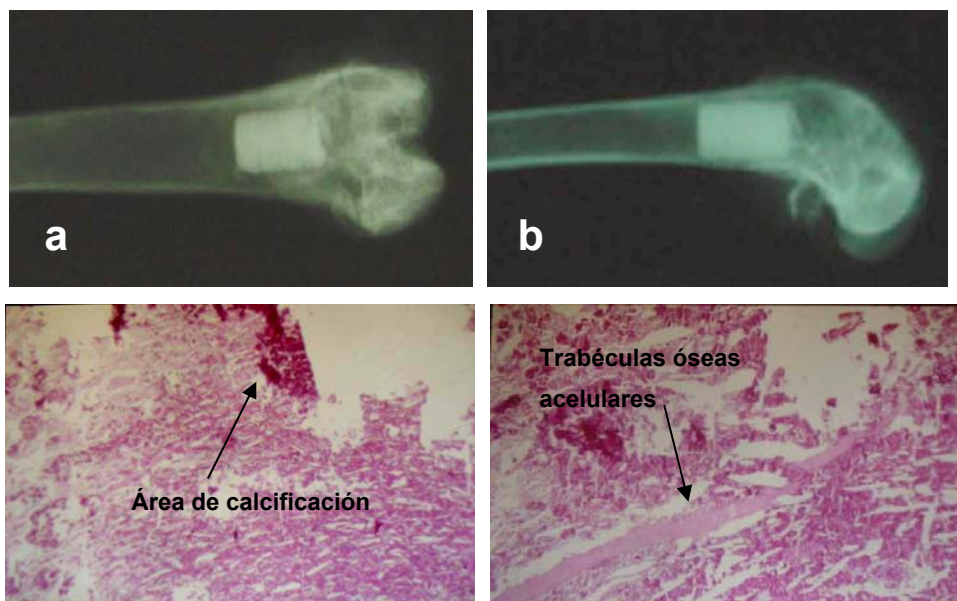
#### ♣ 6 semanas

Rx antero-posterior: el implante está completamente rodeado de tejido óseo maduro y parece haberse iniciado su disgregación (Figura 68a).

Rx lateral: el implante ha iniciado relación con la cortical-posterior, sobre la que se apoya (Figura 68b).

En ambas proyecciones parece que el tejido óseo penetra en el implante; se aprecian menos grietas debido posiblemente a que son rellenadas por tejido óseo.

En la imagen histológica se aprecia, al igual que la muestra correspondiente a las cuatro semanas, un callo de fractura triangular periférico, así como abundantes calcificaciones intraimplante. Conjuntamente se descubre la presencia de estructuras hialinas acelulares que remedan osteoide acelular y cuya naturaleza histológica no podemos precisar (Figura 68).

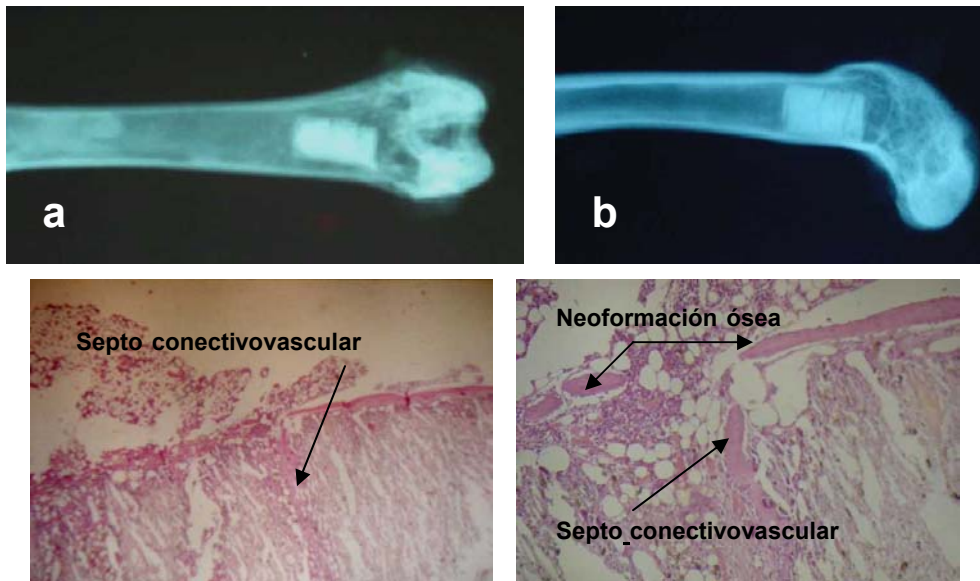


**Figura 68.-** Rx e imágenes histológicas obtenidas a las 6 semanas de la colocación del implante del lote F-3-20-10. (a), Rx antero-posterior y (b), Rx lateral.

#### ♣ 12 semanas

Radiografías antero-posterior y lateral: se observa pérdida de la nitidez de los bordes del implante. En la radiografía lateral es prácticamente indistinguible del tejido óseo de la zona cortical posterior. El implante aparece más disgregado (Figura 69).

En la imagen histológica se ve de nuevo el callo de fractura triangular periférico al implante, osificación periimplante, calcificaciones intrainplante y septos conectivovasculares intrainplante (Figura 69).

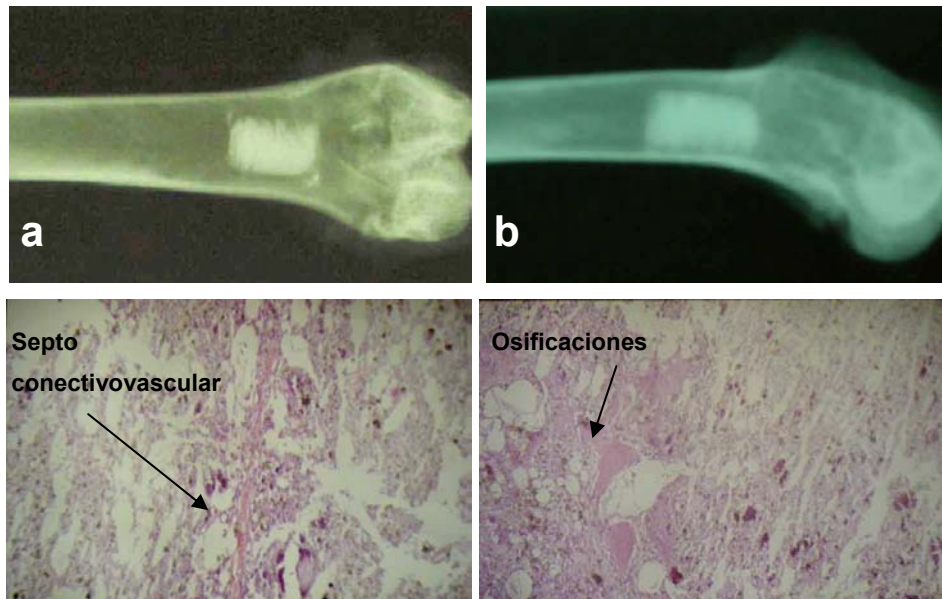


**Figura 69.-** Rx e imágenes histológicas obtenidas a las 12 semanas de la colocación del implante del lote F-3-20-10. (a), Rx antero-posterior y (b), Rx lateral.

♣ 24 semanas

Rx antero-posterior: la fragmentación del implante es franca y se observa que el tejido óseo maduro ocupa las irregularidades de la superficie del implante (Figura 70a).

En la imagen histológica se aprecia una reacción macrofágica focal periimplante, calcificaciones irregulares intrainplante y ya empiezan a observarse osificaciones septales, toscas, que penetran en el implante y que, probablemente utilicen los septos conectivovasculares ya descritos previamente, como soporte (Figura 70).



**Figura 70.-** Rx e imágenes histológicas obtenidas a las 24 semanas de la colocación del implante del lote F-3-20-10. (a), Rx antero-posterior y (b), Rx lateral.

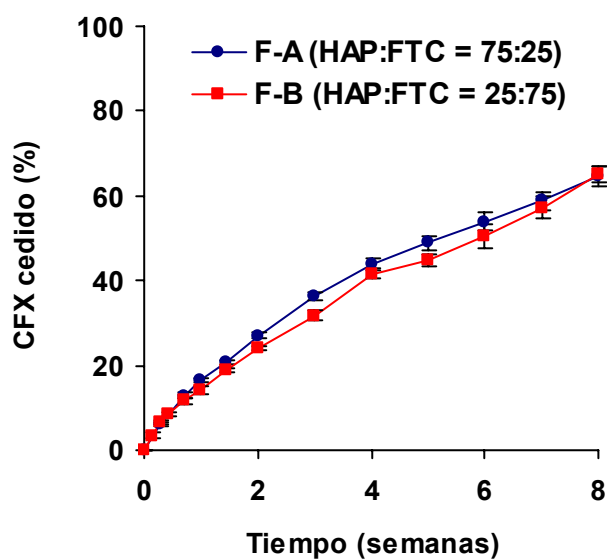
**DISCUSIÓN**



## ENSAYOS *IN VITRO*

### Estudio preliminar

Antes de proceder a elaborar los implantes y al estudio de los factores que gobiernan la cinética de cesión de ciprofloxacino desde este tipo de sistemas y de acuerdo con los resultados previos con gentamicina (Soriano y Évora, 2000, Sánchez et al., 2001 y Baro et al. , 2002), se llevó a cabo un estudio preliminar en el que se elaboraron dos formulaciones: F-A y F-B, cuya composición se detalla en la tabla 2, con el fin de estudiar la relación óptima HAP/FTC, fijando las restantes variables. Las curvas de cesión de ambas formulaciones se representan en la figura 71, y como puede observarse a simple vista, los perfiles de cesión de ciprofloxacino son muy similares ( $f_2 = 77,2$ ), lo que indica que la proporción de HAP/FTC no afecta a las características de liberación del antibiótico.



**Figura 71** . Influencia de la relación de fosfatos sobre el perfil de cesión *in vitro* de ciprofloxacino (CFX).

Overbeck en un estudio llevado a cabo con implantes de PLGA conteniendo ciprofloxacino (Overbeck et al. , 1995), cita que algunos autores encuentran una unión reversible del ciprofloxacino con la HAP. Posteriormente Wallis et al. (1996) ponen de manifiesto que el norfloxacino forma complejos con cationes di y trivalentes, en concreto en lo que respecta al  $\text{Ca}^{+2}$  no más de un 10% de norfloxacino se compleja. Sin embargo Conceição et al. , 2000 observan que el ciprofloxacino se compleja, en una proporción elevada, con la hidroxiapatita no estequiométrica. En nuestro caso, los ensayos de adsorción llevados a cabo con los distintos componentes de las formulaciones elaboradas en esta memoria indicaron que el ciprofloxacino no se adsorbe significativamente a ninguno de los fosfatos empleados (tabla 17) y los perfiles de cesión representados en la figura 71, son superponibles indicando que la proporción de HAP/FTC no afecta a la cinética de liberación del ciprofloxacino. Teniendo en cuenta estos resultados, la proporción HAP/FTC se fijó en 25/75 para todos los lotes elaborados en esta memoria.

### **Caracterización de la cesión de ciprofloxacino *in vitro***

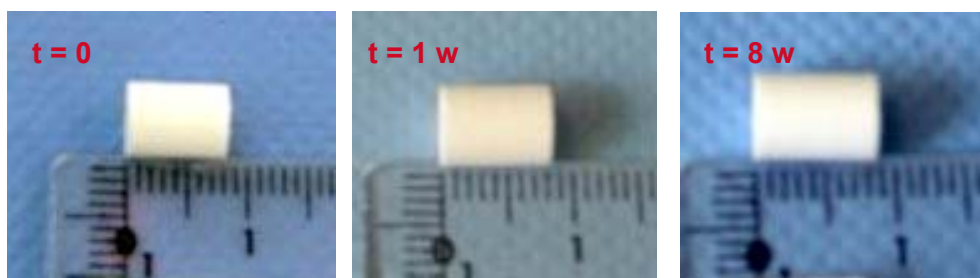
De acuerdo con estos resultados, se plantea la elaboración de una serie de implantes que nos va a permitir estudiar la influencia de la presión aplicada en la compresión, la relación PLA-30/fosfatos y la carga de ciprofloxacino sobre la liberación del mismo desde estos sistemas. En concreto se elaboraron 10 formulaciones fijando en 25/75 la relación de HAP/FTC y cuyas características y composición se recogen en las tablas 5 y 6.



**a) Seguimiento de los cambios de los componentes de las formulaciones durante su incubación en el medio de cesión.**

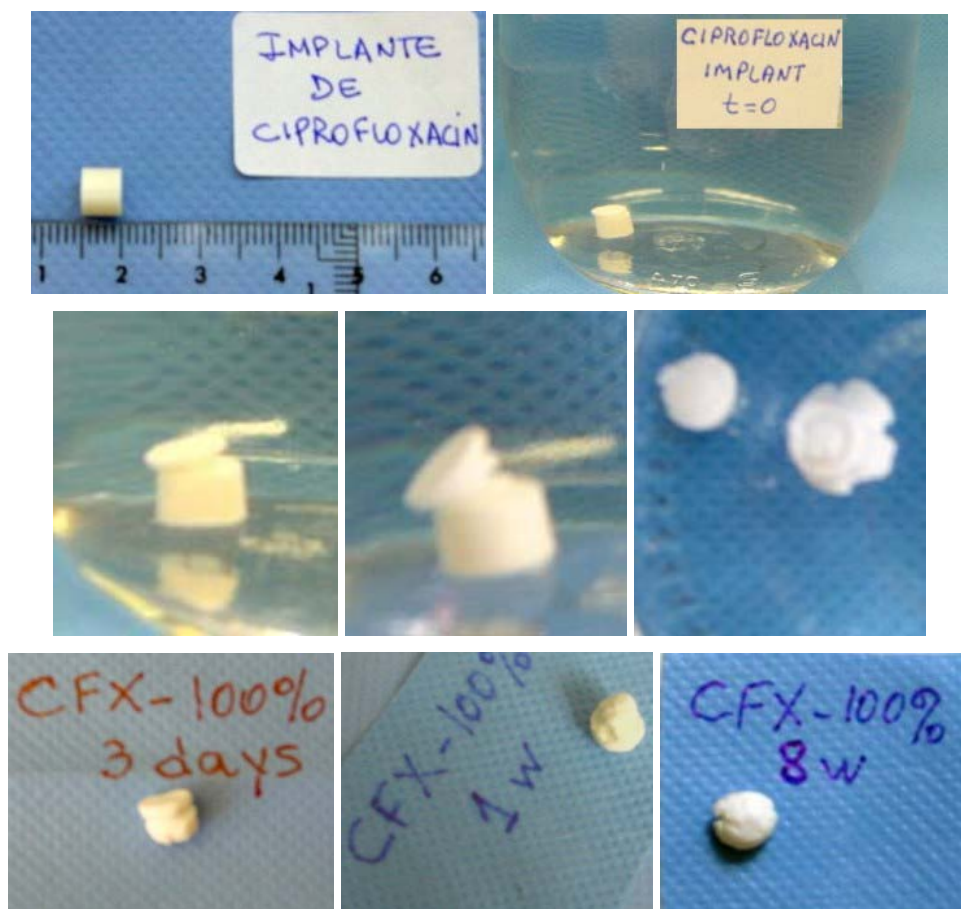
Para intentar explicar los cambios observados en la estructura de los implantes y su influencia en la cinética de cesión del ciprofloxacino se llevaron a cabo una serie de estudios que se detallan y comentan a continuación. Para ello se prepararon 2 tipos de implantes, un lote de implantes blancos, con todos los componentes de la formulación (HAP-FTC-PLA-30) excepto el antibiótico y un segundo lote elaborado por compresión directa de 200 mg de ciprofloxacino solamente. Estos implantes se incubaron en el medio de cesión durante 8 semanas y se realizó el seguimiento de los cambios que se producen.

En la figura 72 se recogen las fotografías de los implantes blancos a lo largo de este ensayo; como se puede observar estos implantes permanecen intactos, por tanto los cambios macroscópicos que vamos a observar en las formulaciones elaboradas en esta memoria no pueden ser atribuidos al contacto de los fosfatos o el PLA-30 con el medio.



**Figura 72.-** Evolución de los implantes blancos (sin antibiótico) a lo largo de 8 semanas en incubación en tampón fosfato pH 7,4.

Este mismo ensayo se realizó con los implantes de ciprofloxacino y en la figura 73 se recogen las correspondientes fotografías. Como podemos observar se obtiene un implante cilíndrico perfecto que en contacto con el medio de cesión se hincha inmediatamente y parte del mismo incluso llega a separarse. Este proceso tiene lugar en los primeros 10 minutos sin embargo, tal y como se puede apreciar en las imágenes de los tres días, una y ocho semanas, el implante no sufre transformaciones posteriormente.

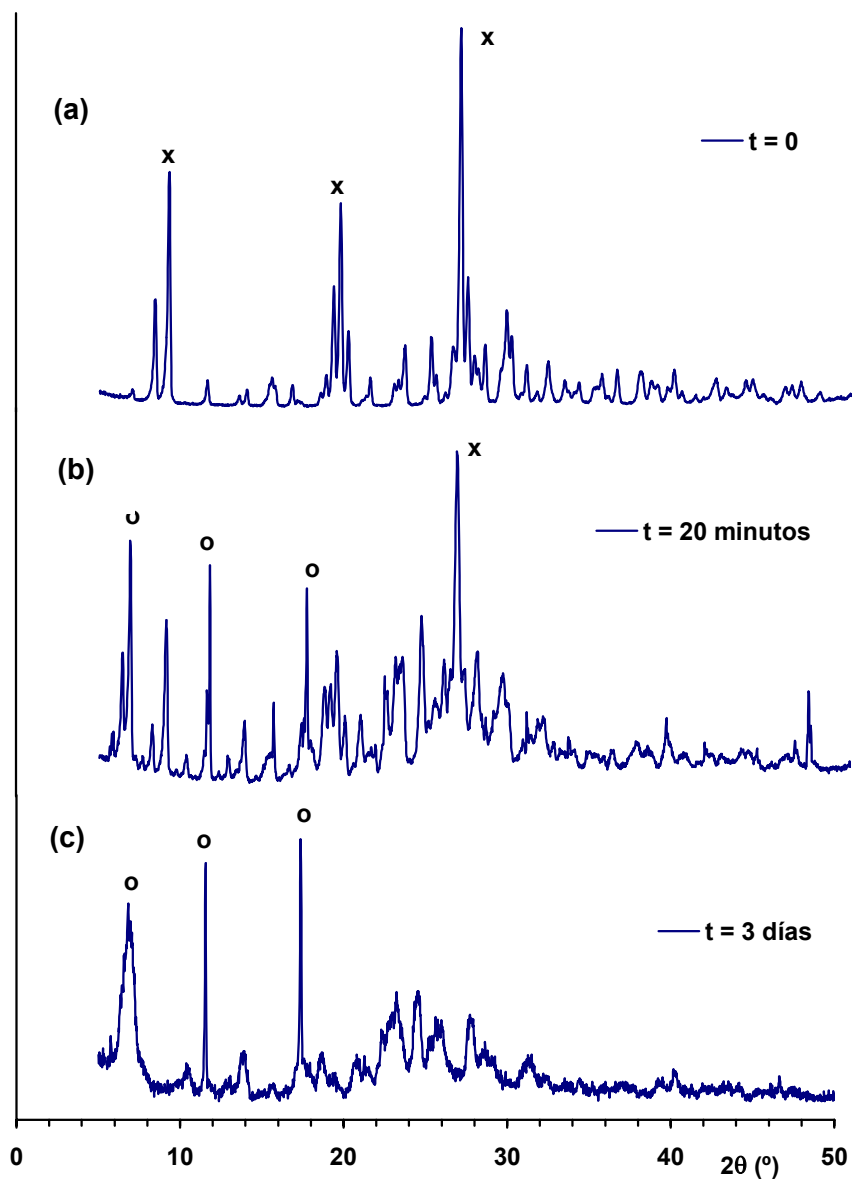


**Figura 73** .- Seguimiento del proceso de hinchamiento de implantes elaborados con ciprofloxacino a 312 MPa.

Este estudio se completó con el análisis de difracción por rayos X. En la figura 74 se representan los difractogramas de ciprofloxacino puro (producto comercial en polvo) correspondientes a este ensayo: muestra seca (figura 74a) y muestras húmedas después de estar en contacto con el medio de cesión durante 20 minutos (figura 74b) y durante 3 días (figura 74c). Puesto que el ciprofloxacino no se encuentra en la base de datos JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) del ICDD (International Centre for Diffraction Data), ni disponemos de otros datos estructurales, lo analizaremos desde el punto de vista cualitativo. Es evidente, que la fase correspondiente a ciprofloxacino puro y seco ha desaparecido totalmente en el difractograma de la figura 74c, que corresponde al producto que ha estado en el medio de cesión durante tres días. Una inspección ocular nos indica que la muestra comprimida y sometida al medio de cesión durante 20 minutos ha aumentado su volumen original de forma significativa (figura 73).

También es evidente al observar las figuras 74a-c que se ha producido un cambio estructural drástico, pasando de una fase “seca” (figura 74a) a otra fase “húmeda” (figura 74c) que debe corresponder ésta última, a una forma hidratada de ciprofloxacino.

Los picos de Bragg de los difractogramas observados a  $26,65^\circ$  ( $2\theta$ ) para la fase “seca” (figura 74a) y a  $6,8^\circ$  ( $2\theta$ ) para la fase “húmeda” (figura 74b) los tomaremos como referencia para diferenciar entre una y otra fase. En este sentido, en la figura 74b se observa claramente que el difractograma es la resultante de una mezcla de ambas fases. Es decir, un tiempo de cesión de 20 minutos no es suficiente para transformar toda la fase “seca” en fase “húmeda”, por lo que en este caso ambas fases coexisten.



**Figura 74.-** Perfil de difracción de rayos X de ciprofloxacino a lo largo de tres días de incubación en tampón fosfato, pH 7,4 a 37°C. Como referencia visual, se han marcado tres picos de Bragg para cada fase: fase seca (x) y fase húmeda (o).

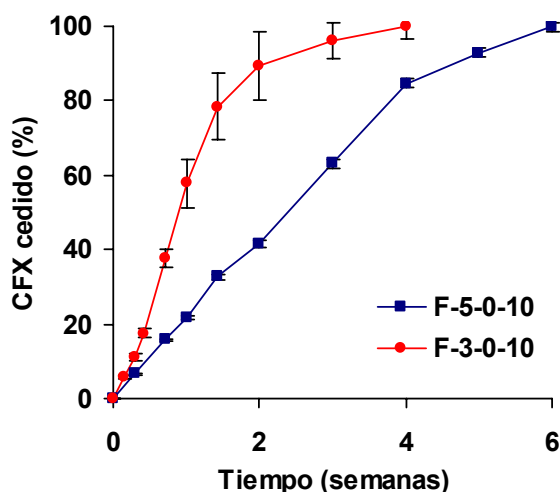
Por tanto basándonos en estas observaciones muchas de las modificaciones que van a sufrir los distintos implantes durante los ensayos de cesión deben ser atribuidos al hinchamiento que se produce del fármaco durante la incubación.

#### **a) Efecto de la presión de compresión**

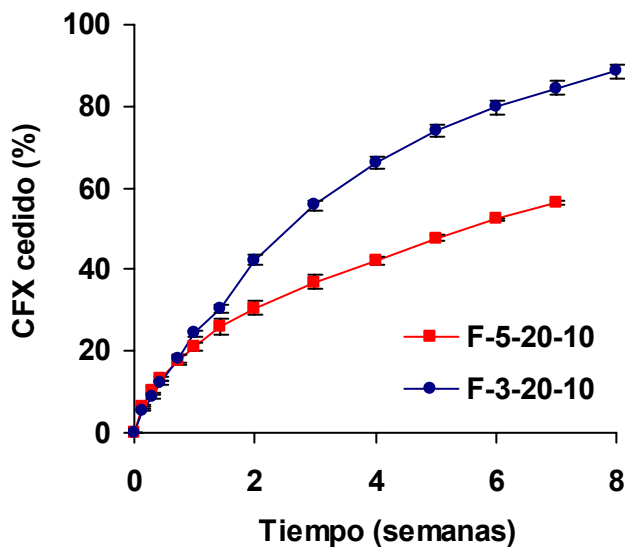
Para estudiar el efecto de la presión empleada en la compresión sobre la velocidad de cesión del ciprofloxacino se compararon los perfiles de liberación de dos pares de lotes: F-3-0-10 frente a F-5-0-10 y F-3-20-10 frente a F-5-20-10. En ambos casos se mantiene la misma composición dos a dos y se varía la presión aplicada que fue de 312 MPa y 520 MPa. La diferencia entre ambos pares de formulaciones es que los lotes F-3-0-10 y F-5-0-10 se elaboraron sin polímero, mientras que F-3-20-10 y F-5-20-10 se prepararon con una relación PLA-30/fosfatos de 20/80, por tanto en ambas parejas de formulaciones el contenido en ciprofloxacino es del 10%.

En las figuras 75 y 76 podemos observar claramente la influencia de la presión de compresión sobre la cesión. El factor de similitud resultó ser en ambos casos inferior a 50, en concreto de 24,3 para F-3-0-10 y F-5-0-10 y de 38,9 para F-3-20-10 y F-5-20-10. Como era de esperar, a mayor presión aplicada menor velocidad de cesión. Sin embargo, no existen prácticamente diferencias en las porosidades iniciales dentro de cada par de formulaciones, los lotes elaborados sin PLA tienen una porosidad inicial de aproximadamente un 21% (21,3 y 20,7%), mientras que los elaborados con polímero alrededor de un 14% (15,3% y 13,0%). La mayor velocidad de cesión de los lotes preparados aplicando 312 MPa es probablemente debido a que, como se observa a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*, el hinchamiento que sufre el ciprofloxacino en contacto con el medio de cesión relaja la estructura del implante de forma más acusada que cuando se emplean presiones más

elevadas, favoreciendo su disgregación y facilitando así la liberación del antibiótico.



**Figura 75.-** Efecto de la presión de compresión sobre el perfil de cesión *in vitro* de ciprofloxacino (CFX) a partir de formulaciones elaboradas sin PLA: F-3-0-10 y F-5-0-10.



**Figura 76.-** Efecto de la presión de compresión sobre el perfil de cesión *in vitro* de ciprofloxacino (CFX) a partir de las formulaciones elaboradas con un 20% de PLA: F-3-20-10 y F-5-20-10.

En la figura 75, se observa que las diferencias en las velocidades de cesión de ciprofloxacino de los implantes elaborados sin PLA se aprecian desde tiempos cortos. Como estos implantes están preparados solamente con fosfatos la erosión que sufre la formulación F-3-0-10 es mucho más acusada que en el caso de F-5-0-10 (Figura 77), este efecto se refleja en la curva de cesión, al cabo de 2 semanas se ha liberado prácticamente la totalidad del contenido de la F-3-0-10, mientras que del F-5-0-10 solamente un 40%.

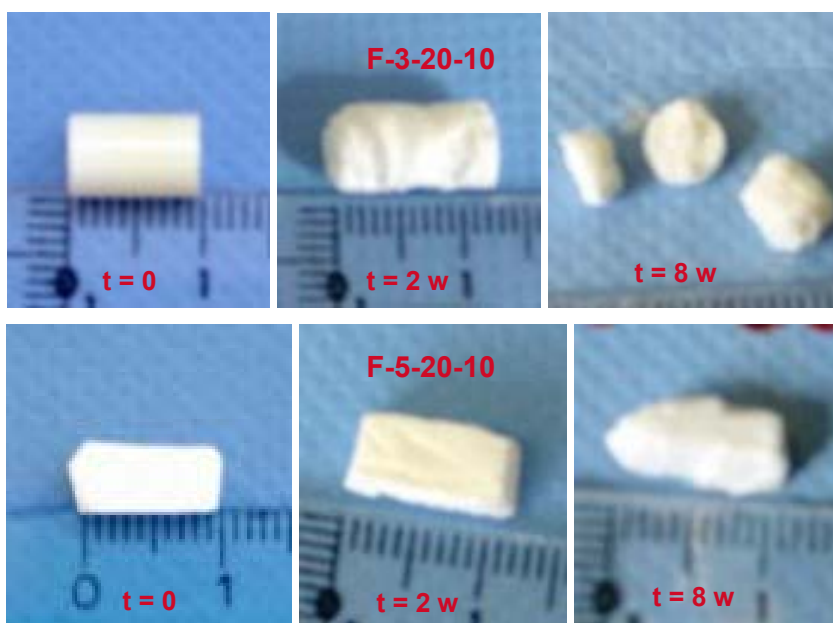


**Figura 77.-** Efecto de la presión. Cambios morfológicos producidos en los implantes F-3-0-10 y F-5-0-10 a lo largo de los ensayos de cesión.

Por el contrario, tal y como se aprecia en la figura 76, el efecto de la presión sobre la velocidad de cesión no se observa a tiempos cortos para las formulaciones elaboradas con PLA, en una semana se cede alrededor de un 22%; sin embargo, a partir de un cierto tiempo aproximadamente 2 semanas,

se separan las curvas y la influencia de la presión se manifiesta claramente.

Además en las fotografías de la figura 78 se observa un aumento de tamaño de ambos implantes, consecuencia del hinchamiento del ciprofloxacino, más notable en la F-3-20-10 que va perdiendo parte de su superficie lo que lleva a una velocidad de cesión más elevada. Este efecto se sigue apreciando a lo largo del tiempo si bien a medida que se cede el antibiótico se va produciendo una reducción paulatina en el tamaño de ambos implantes.



**Figura 78.-** Efecto de la presión. Cambios morfológicos observados en los implantes F-3-20-10 y F-5-20-10 a lo largo de ensayo de cesión *in vitro*.

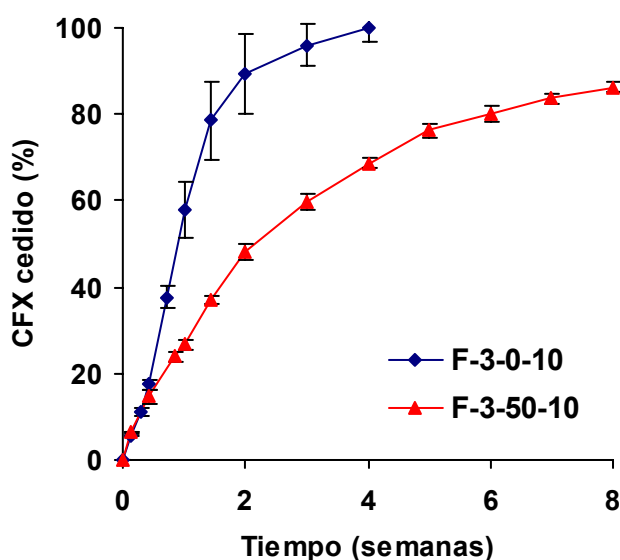
#### b) Efecto de la relación polímero/fosfatos

Para comprobar el efecto de este factor se compararon 2 lotes, F-3-0-10 y F-3-50-10, conteniendo un 10% de ciprofloxacino y una relación



PLA-30/fosfatos de 0/100 y 50/50 respectivamente. En todos los casos la presión aplicada fue de 312 MPa.

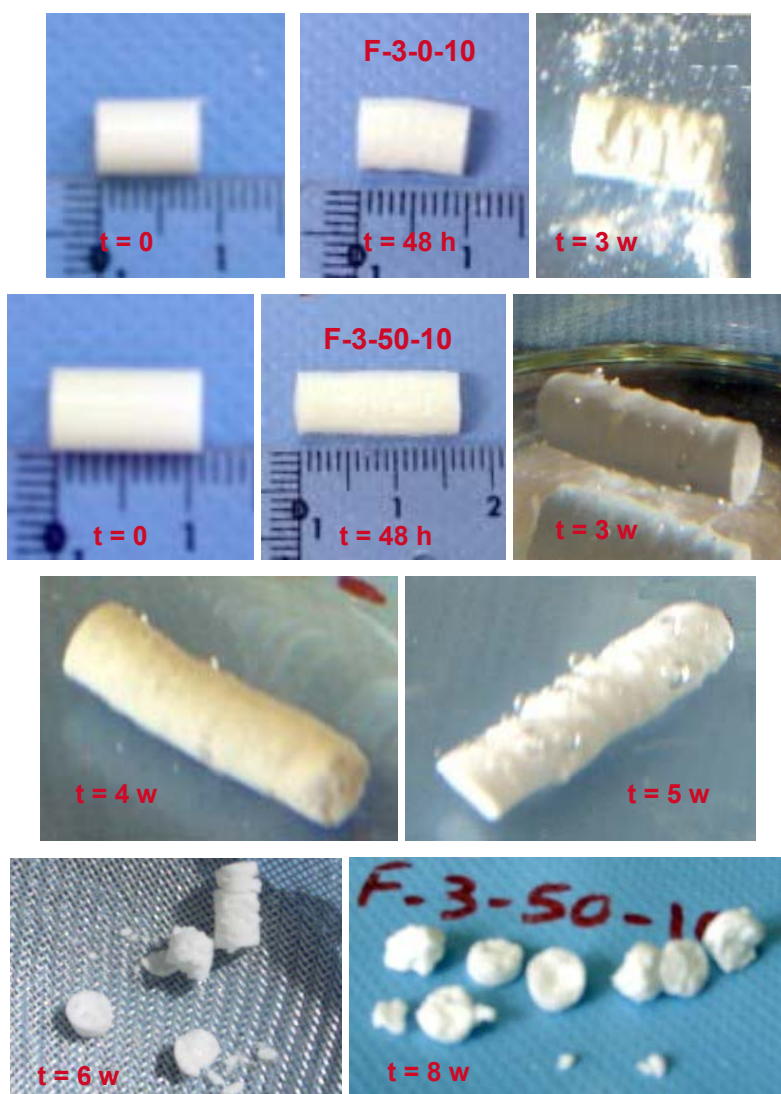
La influencia de la proporción relativa de PLA-30/fosfatos se pone de manifiesto en la figura 79 donde se comparan las curvas de cesión de las dos formulaciones.



**Figura 79.-** Efecto de la relación PLA/fosfatos sobre el perfil de cesión in vitro de ciprofloxacino (CFX) a partir de las formulaciones F-3-0-10 y F-3-50-10.

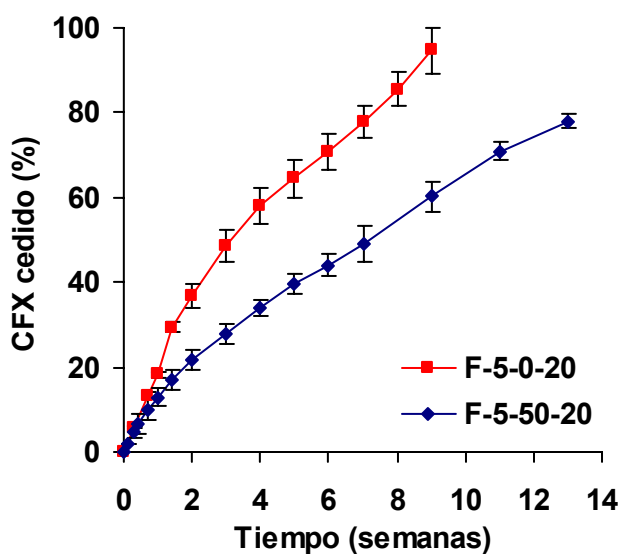
La formulación F-3-0-10, elaborada solamente con HAP y FTC (25/75), presenta una velocidad de cesión superior y sufre una mayor erosión a lo largo del ensayo que la F-3-50-10 que contienen mayor proporción de PLA-30. La ausencia del polímero facilita la cesión de ciprofloxacino liberándose la totalidad del contenido al cabo de 4 semanas (figura 79). La presencia de PLA-30 disminuye la porosidad inicial del sistema y mantiene durante un tiempo más prolongado la integridad del implante, a pesar del hinchamiento tan espectacular observado con la F-3-50-10 (Figura 80). Este

aumento de tamaño puede ser debido al hinchamiento del ciprofloxacino y por otro lado la mayor proporción de PLA-30 le puede conferir cierta plasticidad al sistema retrasando la disgregación del implante lo que conlleva un retraso en la liberación de ciprofloxacino.

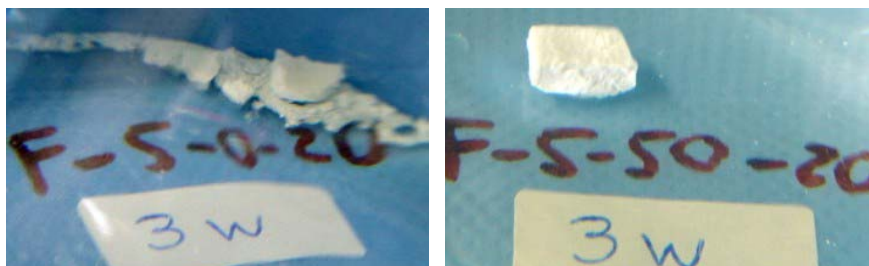


**Figura 80** .- Efecto de la relación PLA-30/fosfatos. Cambios morfológicos observados a lo largo del ensayo de cesión de los implantes F-3-0-10 y F-3-50-10.

El efecto de la relación polímero fosfato también se manifiesta en el mismo sentido en las figuras 81 y 82 donde se comparan dos formulaciones comprimidas a mayor presión (520 MPa) y con un contenido en ciprofloxacino de un 20% variando solamente la relación PLA-30 respecto a los fosfatos, siendo de 0/100 (F-5-0-20) y 50/50 (F-5-50-20). En este caso hemos de indicar que la presión aplicada en F-5-50-20 impide que se produzca un hinchamiento tan acusado como en el caso de la F-3-50-10 a pesar de que el contenido en ciprofloxacino es el doble.



**Figura 81.-** Efecto de la relación PLA/fosfatos sobre el perfil de cesión in vitro de ciprofloxacino (CFX) a partir de las formulaciones F-5-0-20 y F-5-50-20.



**Figura 82.-** Efecto de la relación PLA/fosfatos en implantes elaborados a 520 MPa. Morfología de los implantes F-5-0-20 y F-5-50-20 después de 3 semanas de incubación en tampón fosfato pH 7,4.

A la vista de estos resultados podemos decir que el incremento de la proporción de polímero en la formulación reduce la velocidad de cesión independientemente de la presión aplicada y de la carga de antibiótico. La porosidad inicial en ambos grupos de formulaciones se encuentra directamente relacionada con el contenido en polímero, los lotes elaborados solamente con fosfatos son inicialmente mucho más porosos (tabla 18) y sufren una mayor erosión que se refleja en los perfiles de cesión.

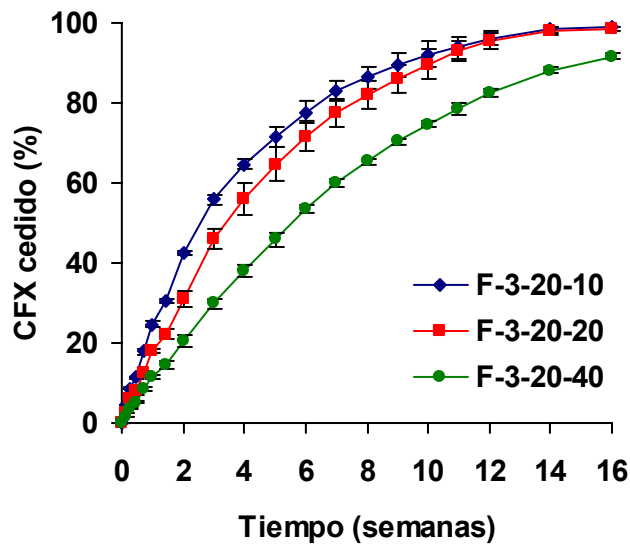
### **Efecto de la carga de ciprofloxacino**

Teniendo en cuenta que la cantidad de fármaco incorporada en los implantes debe afectar a la velocidad de cesión del mismo desde este tipo de sistemas, se compararon tres formulaciones, F-3-20-10, F-3-20-20 y F-3-20-40, con una relación polímero/fosfatos 20/80 y elaboradas a 312 MPa, conteniendo 10%, 20% y 40% de ciprofloxacino, respectivamente.

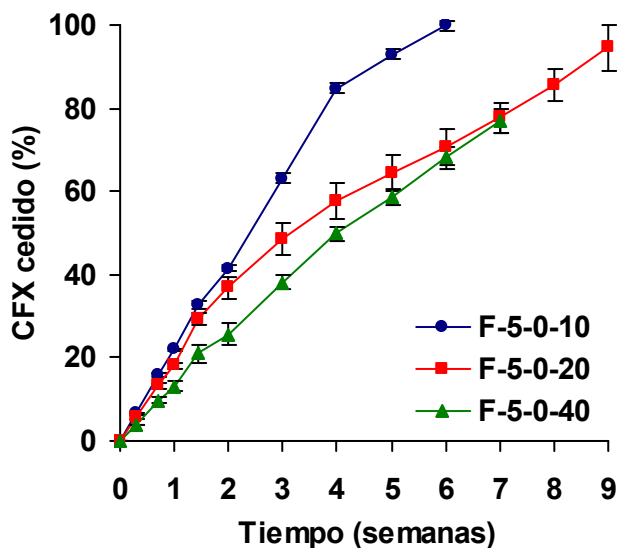
La figura 83 recoge los perfiles de cesión medios de las tres formulaciones. Las curvas correspondientes a las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-20, con un 10 y un 20% de ciprofloxacino son similares ( $f_2=61,8$ ). Sin embargo, las diferencias entre un 10% y un 20% comparadas con un 40%

(F-3-20-40) resultaron significativas con valores de  $f_2 < 50$ , en ambos casos, en concreto de 37,6 para F-3-20-10 frente a F-3-20-40 y de 44,7 para F-3-20-20 frente a F-3-20-40.

Este efecto se manifiesta independientemente de la composición del implante y de la presión aplicada en la compresión como se puede observar en la figura 84, donde se comparan tres formulaciones elaboradas sin polímero, proporción PLA-30/fosfatos de 0/100, con un 10%, 20% y 40% de ciprofloxacino aplicando una presión de 520 MPa. La formulación F-5-0-10 con menor proporción de antibiótico es la que presenta una velocidad de cesión más rápida, con valores de  $f_2 < 50$  con respecto a las dos formulaciones elaboradas con una mayor carga de ciprofloxacino (F-5-0-20 y F-5-0-40).



**Figura 83.-** Influencia de la carga sobre el perfil de cesión in vitro de ciprofloxacino (CFX) a partir de las formulaciones F-3-20-10, F-3-20-20 y F-3-20-40.



**Figura 84.-** Efecto de la carga sobre el perfil de cesión de ciprofloxacino (CFX) a partir de implantes elaborados sin PLA: F-5-0-10, F-5-0-20 y F-5-0-40

Estos resultados se encuentran relacionadas con la porosidad inicial, tanto cuando se comprime con 312 MPa como cuando se hace con 520 MPa e independientemente de la presencia de PLA en la formulación, se cumple que a mayor carga menor porosidad inicial, mayor hinchamiento del implante a lo largo del ensayo y menor porcentaje cedido de antibiótico.

En esta primera parte de la discusión, hemos puesto de manifiesto que efectivamente la cesión de ciprofloxacino desde estos implantes depende de la presión empleada, de la proporción polímero/fosfatos y del contenido en antibiótico. Teniendo en cuenta que el objetivo de esta memoria es la elaboración y evaluación de implantes de ciprofloxacino para tratar eficazmente la infección ósea, lo que requiere alcanzar altas concentraciones en hueso y mantenerlas durante periodos relativamente prolongados (4-6 semanas) y, resultados previos con gentamicina (Sánchez et al., 2002),

indicaron que la velocidad de cesión es mayor *in vivo* que *in vitro*, seleccionamos dos formulaciones, F-3-20-10 y F-3-20-40. Sin embargo, antes de proceder al ensayo *in vivo* se llevaron a cabo una serie de análisis *in vitro* para una mejor caracterización de estas dos formulaciones.

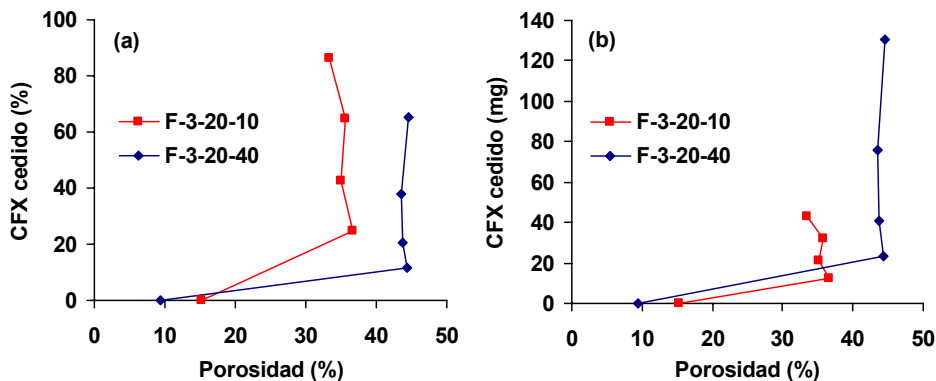
### **Caracterización complementaria *in vitro* de F-3-20-10 y F-3-20-40**

Las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40 fueron caracterizadas a lo largo de los ensayos de cesión *in vitro* en términos de porosidad, captación de agua, pérdida de masa, microscopía electrónica y difracción de rayos X para intentar establecer el mecanismo de liberación del ciprofloxacino y explicar el efecto de la carga de antibiótico en el perfil de cesión.

La única diferencia entre estos dos tipos de implante es el contenido en ciprofloxacino y como hemos expuesto anteriormente, el porcentaje de antibiótico cedido disminuye al aumentar la carga, por lo que estos resultados no están de acuerdo con los observados por otros autores (Dounis et al., 1996, Schierholz et al., 1997, Ramchandani y Robinson, 1998) con microesferas o implantes elaborados con quinolonas y polímeros. En general, la cesión de un fármaco aumenta con la dosis sin embargo, para fármacos poco solubles se puede observar, en el caso de matrices hidrofílicas que se hinchan en contacto con el medio (Sujja-areevath et al., 1996, Munday et al., 2000, Siepmann y Peppas, 2000), que la velocidad de cesión disminuye al aumentar la proporción de fármaco en la formulación aún cuando la cantidad de fármaco cedido es mayor. Hay que resaltar que en estos estudios son los excipientes los responsables del hinchamiento de la matriz y que la cinética de cesión de los fármacos, independientemente de la carga, depende del grado de hinchamiento-erosión, puesto que a mayor tamaño del sistema, mayor es el recorrido del fármaco para difundir al medio externo. En nuestro caso hemos de tener en cuenta primero que los ensayos de cesión se llevan

a cabo a pH 7,4 que coincide con el punto isoeléctrico y por tanto con una menor solubilidad (Ramchandani y Robinson, 1998) y segundo, que el ciprofloxacino es el responsable del hinchamiento de los implantes.

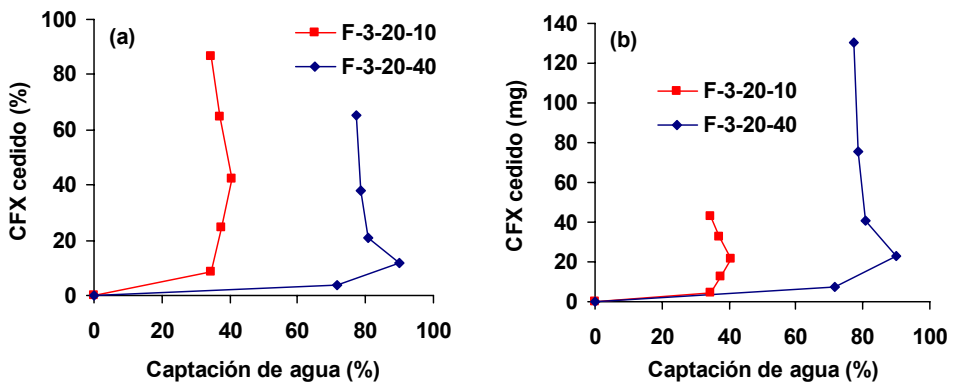
En la figura 85a se representa el porcentaje de antibiótico cedido frente a la porosidad a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*, correspondiente a los tiempos de 0, 1, 2, 4 y 8 semanas, para ambas formulaciones. Se observa que la cesión de ciprofloxacino en porcentaje, al final de la primera semana se relaciona con el aumento de porosidad, para cada formulación. Sin embargo, observamos que a pesar de que la formulación F-3-20-40 sufre un aumento de porosidad en la primera semana, más acusado que el lote preparado con un 10% de antibiótico, este efecto no se refleja proporcionalmente en el porcentaje cedido pero si en la cantidad de ciprofloxacino cedida (figura 85b). A partir de este tiempo la porosidad permanece prácticamente constante, mientras que el ciprofloxacino sigue liberándose en ambos casos. Todo ello indica que otros factores deben estar implicados en la cesión.



**Figura 85.-** Influencia de la porosidad sobre la cesión de ciprofloxacino (CFX) *in vitro* a lo largo de 8 semanas correspondiente a F-3-20-10 y F-3-20-40.



La figura 86 correspondiente a la captación de agua, refleja un comportamiento similar. La formulación con un 40% capta más agua en la primera semana pero el porcentaje de antibiótico cedido es menor (figura 86a) sin embargo, la cantidad de ciprofloxacino cedida es mayor (figura 86b) y al igual que con la porosidad a partir de la primera semana, la cesión es independiente de la captación de agua. El porcentaje agua captado por la formulación F-3-20-40 es el doble que para F-3-20-10 y en la figura 86b, se observa que la cantidad de ciprofloxacino cedida desde la F-3-20-40 es prácticamente el doble a lo largo de las 4 primeras semanas. La formulación F-3-20-40 tiene un contenido menor de fosfatos y PLA que la F-3-20-10 pero la carga de antibiótico es mucho mayor, la relación fármaco/excipientes es de 1:1,5 y 1:9 respectivamente, lo que explicaría que se produzca una mayor captación de agua partiendo de una porosidad menor.

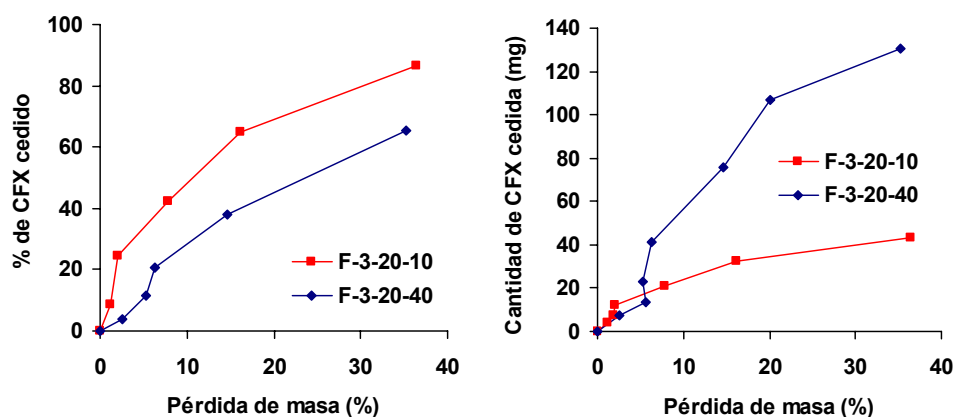


**Figura 86.-** Influencia de la captación de agua sobre la cesión in vitro de ciprofloxacino (CFX) desde F-3-20-10 y F-3-20-40.

Como pusimos de manifiesto al inicio de este apartado, el ciprofloxacino capta gran cantidad de agua y se hincha en contacto con el medio de cesión, este comportamiento explica la mayor captación de agua por parte de la F-3-20-40, el aumento de tamaño y de porosidad tan acusado

que se observa en los primeros tiempos del ensayo de cesión, al hincharse el ciprofloxacino ejerce presión desde el interior del implante y por lo tanto este efecto se refleja en un aumento de porosidad.

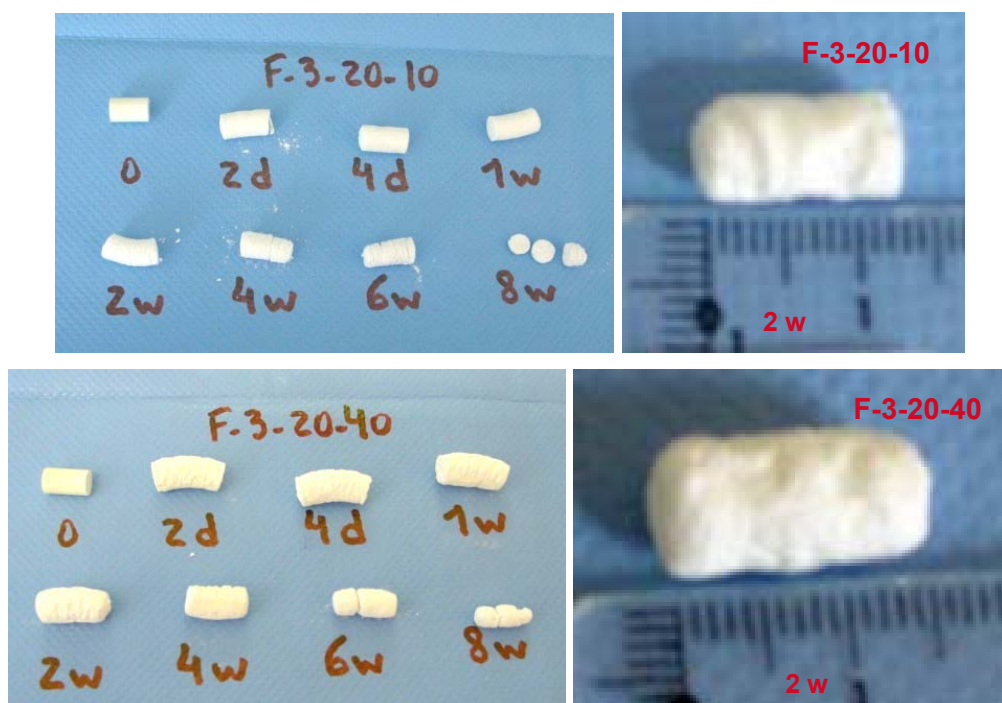
En la figura 87 se observa que tanto el porcentaje cedido como la cantidad de fármaco cedido se encuentran relacionados con la pérdida de masa. Una mayor porosidad y pérdida de componentes del implante debe facilitar la liberación del fármaco. Por tanto la cesión está directamente relacionada con la pérdida de masa, teniendo en cuenta que la solubilidad de ciprofloxacino en tampón fosfato pH 7,4 es de aproximadamente 130  $\mu\text{g/ml}$ , el mecanismo de cesión será por erosión y posterior disolución del antibiótico ya que el ciprofloxacino retenido en el interior del implante, se encuentra a saturación.



**Figura 87.-** Influencia de la pérdida de masa sobre la cesión *in vitro* de ciprofloxacino (CFX) a lo largo de 8 semanas, desde las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40.

Las imágenes obtenidas del implante a lo largo del ensayo de cesión apoyan el aumento de porosidad que se produce en la primera semana

(figura 88). Se observa erosión de la capa más externa. En la imagen correspondiente a la 2ª semana parece que se va perdiendo esa primera capa y sin embargo, la estructura interna prácticamente se mantiene. Además, no se aprecia un aumento de porosidad a pesar de que el ciprofloxacino se va reduciendo en el implante remanente lo que apoya que la cesión tiene lugar desde los fragmentos más externos que se van desprendiendo. Las figuras 47-50 obtenidas por SEM ratifican estos comentarios. Los resultados de GPC y DSC del PLA-30 indican que el polímero no se degrada y por tanto es el hinchamiento del antibiótico lo que contribuye a la disgregación del implante.



**Figura 88.-** Evolución morfológica de los implantes F-3-20-10 y F-3-20-40 a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*.

En resumen los procesos que tienen lugar a lo largo de la cesión son: hinchamiento, hinchamiento + erosión y disgregación. A tiempos cortos predomina el hinchamiento, a partir de aproximadamente una semana, que es cuando el implante alcanza el máximo hinchamiento, es la erosión el efecto más manifiesto y a partir de la 4ª semana aproximadamente predomina la disgregación. Sin embargo y sobre todo en la formulación F-3-20-40 es la solubilidad del ciprofloxacino el proceso limitante de la cesión del fármaco. Así, en las microfotografías del interior del implante (Figura 50) se observan algunos cristales en aguja correspondientes al ciprofloxacino.

Al objeto de llevar a cabo un análisis por difracción de rayos X de las muestras estudiadas hemos realizado los difractogramas de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40. En primer lugar, analizaremos los difractogramas de los fosfatos tricálcico (FTC) e hidroxiapatita (HAP), tanto puros (figura 7) como en una mezcla física de ambos (figura 51) en las mismas proporciones a las que se encuentran en las formulaciones estudiadas en esta memoria. Estos difractogramas los hemos identificado con la ayuda de la base de datos JCPDS, donde al FTC le corresponde la ficha nº 40-0008 y a la HAP la nº 24-0033. De la observación de la figura 51, se deduce que el difractograma de la mezcla física corresponde a la suma de los difractogramas de FTC y HAP. Al estar el FTC en mayor proporción (75%), la HAP prácticamente no se observa por DRX en la mezcla. Por otra parte, los picos de Bragg correspondientes al FTC se mantienen a lo largo del ensayo de ambas formulaciones, F-3-20-10 y F-3-20-40 (figuras 52 y 53), de donde se deduce que el fosfato aparentemente no sufre ningún cambio estructural tras ocho semanas de cesión. Puesto que los picos de Bragg correspondientes a estos fosfatos no nos aportan ninguna información adicional, salvo a título comparativo de su intensidad, no los comentaremos posteriormente en los difractogramas de las formulaciones.

En las figuras 52 y 53 se muestran los difractogramas de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40 a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*. Para la formulación F-3-20-10 no se observan picos de Bragg correspondientes al ciprofloxacino, ni en su forma “seca” ni “hidratada”. Esto es debido a que la concentración de ciprofloxacino está por debajo del nivel de detección de la técnica en estos implantes. Sin embargo, en la figura 53 correspondiente a implantes con un 40% de ciprofloxacino si se observan claramente los picos de Bragg tanto de la fase “seca”, como de la “húmeda”. En el difractograma del implante a tiempo cero solo se observa la fase “seca”, mientras que a medida que transcurre el ensayo, la proporción de esta fase va disminuyendo a la vez que la fase “húmeda” aumenta. A partir de una semana, prácticamente no se observa la fase “seca”, mientras que la “húmeda” está en el máximo de intensidades relativas. Sin embargo, la solubilidad del producto no se modifica.

Este estudio se intentó completar con el análisis diferencial de barrido, sin embargo la descomposición que sufre el antibiótico a partir de una cierta temperatura nos impidió analizar las formulaciones elaboradas. Por ello en la figura 54 mostramos únicamente los resultados obtenidos tras la incubación de los implantes blancos (PLA-30 + HAP + FTC). El PLA-30 como ya se ha comentado no se modifica, sin embargo el pico de la mezcla de los fosfatos que corresponde solamente a la HAP (figuras 8 y 54) sufre un ligero desplazamiento hacia temperaturas superiores. Puesto que los resultados de difracción de rayos X no muestran cambio cristalográfico alguno, ese desplazamiento del pico observado en el termograma podría ser debido a la transformación de la HAP empleada en otra HAP con una mayor o menor riqueza en calcio.

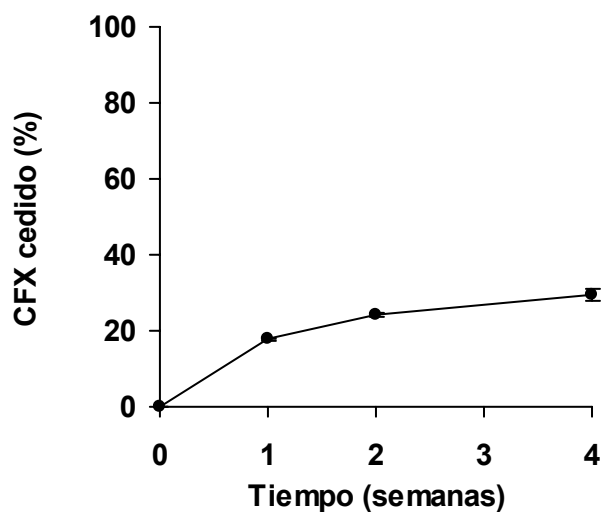
## ESTUDIOS *IN VIVO*

### Ensayo de cesión *in vivo*

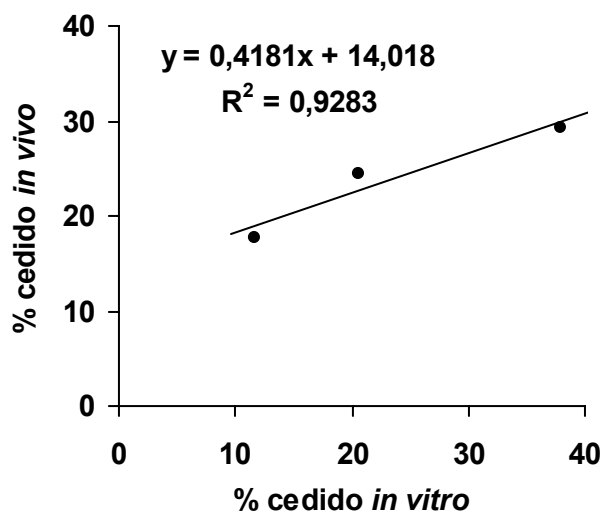
Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo simultáneamente con las dos formulaciones seleccionadas, con el fin de ir valorando si los niveles alcanzados resultaban terapéuticamente eficaces. Se consideraron niveles terapéuticos aquellas concentraciones que superaban las mínimas bactericidas (CMB) para *Staphylococcus aureus* que en principio es el microorganismo que más frecuentemente produce osteomielitis.

En primer lugar se valoró el porcentaje remanente en el implante a lo largo del tiempo. La formulación F-3-20-40 se ensayó durante 4 semanas solamente ya que tal y como se aprecia en la figura 89, la liberación del ciprofloxacino desde estos implantes se retrasa considerablemente entre las 2 y las 4 semanas. Si comparamos la cesión obtenida *in vitro*, que ya la consideramos excesivamente lenta, con los resultados *in vivo*, apreciamos que si bien, tal y como se esperaba, la liberación de ciprofloxacino es ligeramente superior durante las dos primeras semanas, aproximadamente un 21% frente a un 25% *in vivo* sin embargo, entre la 2ª y la 4ª semana la velocidad de cesión disminuye notablemente cediéndose menos de un 5% frente a un 18% aproximadamente *in vitro* (figura 19).

En la figura 90 puede observarse que la pendiente de la recta de correlación *in vitro-in vivo* es considerablemente menor que la unidad, indicando una menor cesión *in vivo* que *in vitro*.



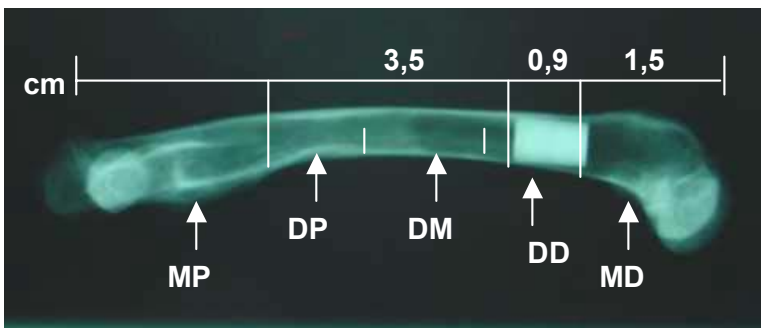
**Figura 89.-** Porcentaje de ciprofloxacino (CFX) cedido desde los implantes del lote F-3-20-40 después de su implantación en fémur de conejos (media  $\pm$  s.d.; n = 3).



**Figura 90.-** Correlación obtenida entre los porcentajes cedidos *in vivo* e *in vitro* a lo largo de cuatro semanas de ensayo para la formulación F-3-20-40.

Los resultados de cesión nos indican que los implantes F-3-20-40 se alejan de la formulación ideal buscada, pues el tiempo de cesión se

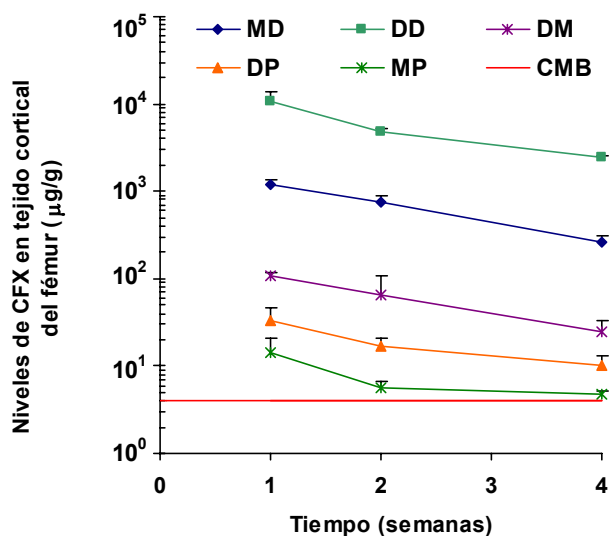
prolongaría excesivamente y tal como se ha publicado el sistema ideal debe proporcionar dosis adecuadas durante 4 a 6 semanas. Sin embargo, los niveles alcanzados tanto en hueso como en médula son eficaces, aunque incluso se podrían considerar excesivamente elevados. Como era de esperar las concentraciones más altas se alcanzan en las zonas del fémur próximas al lugar de la implantación, metáfisis distal y diáfisis distal (figura 91), tanto en tejido cortical (figura 92) como en el medular (figura 93).



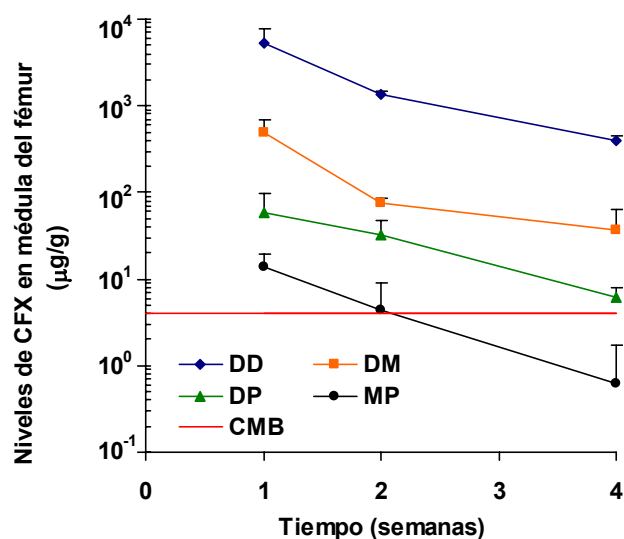
**Figura 91.-** Radiografía de un fémur implantado indicando las distintas zonas muestradas. MD: metáfisis distal; DD, DM y DP: tercios distal, medio y proximal de la diáfisis, respectivamente; MP: metáfisis proximal.

En la figura 93, no se representan los niveles en médula correspondientes a la metáfisis distal porque en esa zona se ha destruido totalmente la médula cuando se practica el orificio para insertar el implante. Esta misma operación se lleva a cabo en hueso infectado cuando se realiza el curetaje quirúrgico para eliminar el foco de infección. La valoración del ciprofloxacino en tibia muestra niveles irregulares y bajos en las zonas estudiadas (figura 94).

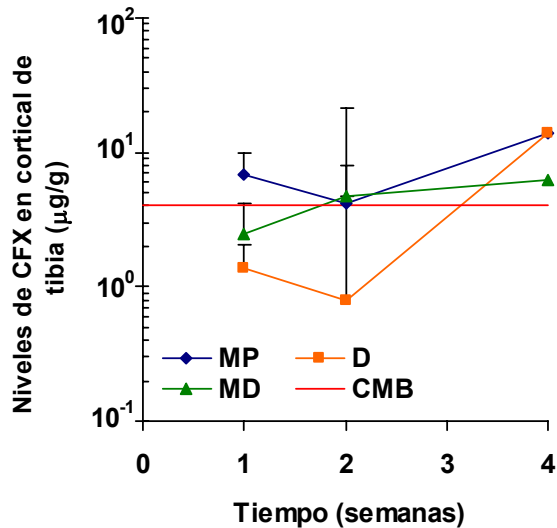




**Figura 92.-** Concentraciones de ciprofloxacino (CFX) en las distintas zonas de cortical obtenidas con F-3-20-40. MD: metáfisis distal; DD, DM y DP: tercios distal, medio y proximal de la diáfisis, respectivamente; MP: metáfisis proximal; CMB: concentración mínima bactericida; (media + s.d.).



**Figura 93.-** Concentraciones de ciprofloxacino en las distintas zonas de médula femoral con F-3-20-40. DD, DM y DP: tercios distal, medio y proximal de la diáfisis, respectivamente; MP: metáfisis proximal; CMB: concentración mínima bactericida; (media + s.d.).

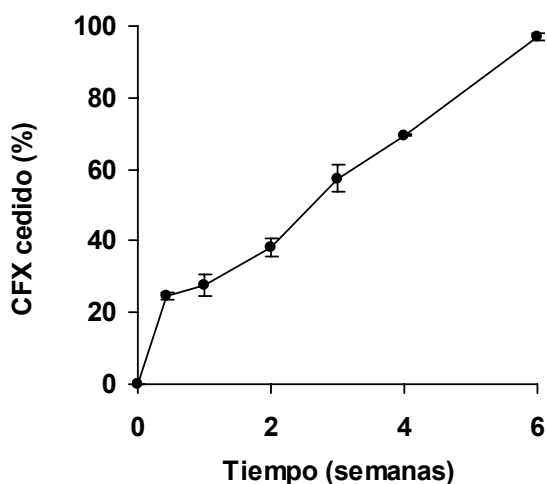


**Figura 94.-** Concentraciones de ciprofloxacino en las distintas zonas de la tibia alcanzadas con F-3-20-40. MP: metáfisis proximal; D:diáfisis; MD: metáfisis distal; CMB: concentración mínima bactericida; (media + s.d.).

En los experimentos realizados tanto con la F-3-20-40 como con la F-3-20-10, se llevó a cabo el control de los niveles de antibiótico en plasma, no detectándose concentraciones de ciprofloxacino con el método microbiológico empleado. Así mismo se controló la función renal a través de la concentración sérica de creatinina; los resultados indicaron que no se produce daño renal a lo largo del ensayo.

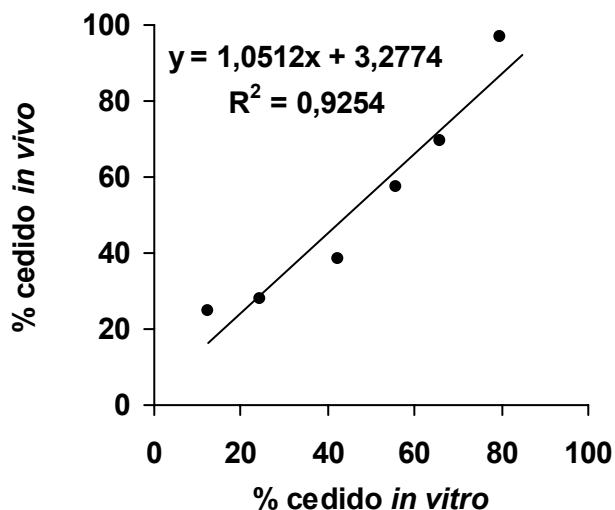
Con respecto al implante con menor proporción de ciprofloxacino, F-3-20-10, ya desde los primeros resultados parecía que el antibiótico se cedía de acuerdo con los objetivos planteados y por ello, los estudios *in vivo* con esta formulación se prolongaron durante 6 semanas, ya que transcurrido este tiempo prácticamente la totalidad de la dosis se ha liberado, tal y como se observa en la figura 95. Por tanto, hemos alcanzado el objetivo planteado

en esta memoria: elaborar implantes que cedieran antibiótico durante al menos 6 semanas.



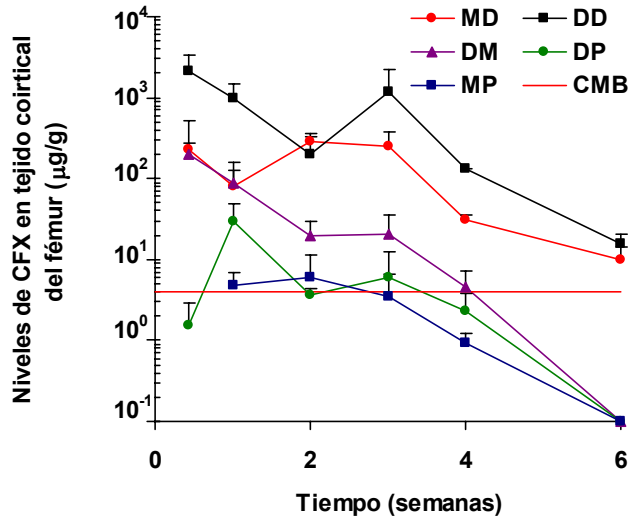
**Figura 95.-** Porcentaje de ciprofloxacino cedido desde los implantes F-3-20-10 tras su colocación en el fémur de conejos (media  $\pm$  s.d.;  $n=3$ ).

En la figura 96 se observa que los porcentajes de ciprofloxacino cedidos *in vitro* e *in vivo* presentan una buena correlación. La pendiente obtenida por regresión lineal es prácticamente uno; las diferencias más importantes se observan en la cesión inicial y a las 6 semanas, donde se aprecia que mientras *in vitro* se ha liberado aproximadamente un 80%, *in vivo* se alcanza prácticamente el 100%.

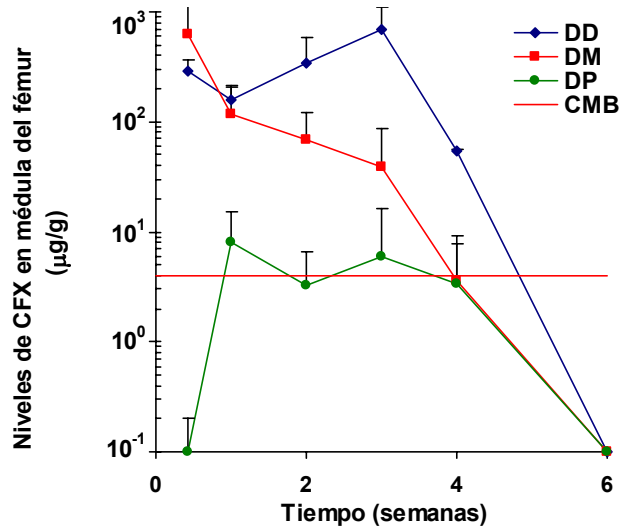


**Figura 96.-** Correlación obtenida entre los porcentajes cedidos *in vivo* e *in vitro* a lo largo de seis semanas de ensayo para la formulación F-3-20-10.

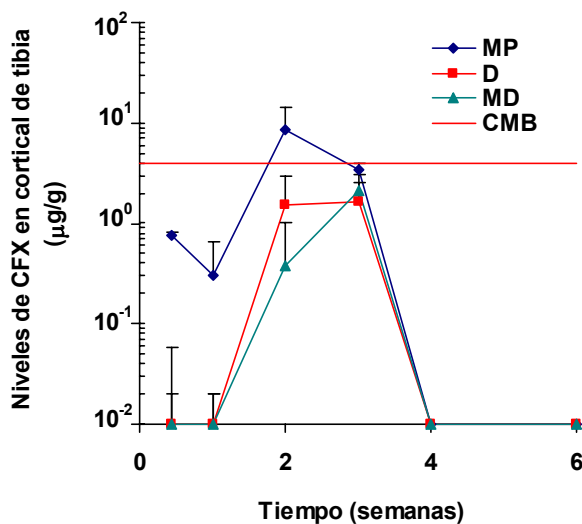
Además en la figura 97, donde se encuentran representadas las concentraciones de ciprofloxacino alcanzadas en las distintas zonas muestreadas del fémur, se observa que éstas son superiores a las CMB. Los niveles más elevadas se localizan en las zonas próximas al implante, en concreto en metáfisis y diáfisis distal, mientras que en diáfisis y metáfisis proximal las concentraciones son inferiores. En la figura 98 también se puede observar que las concentraciones de antibiótico en médula son elevadas en las zonas que se pueden muestrear. Sin embargo, no se alcanzan las CMB en tibia pero los niveles se encuentran próximos a las CMI (figura 99).



**Figura 97.-** Concentraciones de ciprofloxacino (CFX) alcanzadas en las distintas zonas de la cortical del fémur con F-3-20-10. MD: metáfisis distal; DD, DM y DP: tercios distal, medio y proximal de la diáfisis, respectivamente; MP: metáfisis proximal; CMB: concentración mínima bactericida; (media + s.d.).



**Figura 98.-** Concentraciones de ciprofloxacino alcanzadas en las distintas zonas de médula en fémur con F-3-20-10. DD, DM y DP: tercios distal, medio y proximal de la diáfisis, respectivamente; CMB: concentración mínima bactericida; (media + s.d.).



**Figura 99.-** Concentraciones de ciprofloxacino alcanzadas en las distintas zonas de cortical de la tibia con F-3-20-10. MP: metáfisis proximal; D:diáfisis; MD: metáfisis distal; CMB: concentración mínima bactericida; (media + s.d.).

A la vista de estos resultados la formulación F-3-20-40 fue descartada debido en primer lugar, a que la cesión del antibiótico es excesivamente lenta y, aunque los niveles que se alcanzan en el foco de infección son elevados, solamente se ha cedido un 30% aproximadamente en 4 semanas lo que supone, si el comportamiento se mantiene, que para que se libere la totalidad de ciprofloxacino tendrían que transcurrir al menos 12 semanas y no tendría ningún fundamento mantener niveles de antibiótico en hueso durante tanto tiempo pues conlleva los riesgos ya conocidos de posibles efectos secundarios y resistencia. En segundo lugar, la formulación F-3-20-10 se ajusta mucho mejor a los objetivos perseguidos: durante cuatro semanas se mantienen niveles por encima de las CMB a lo largo del fémur y la cesión del antibiótico es completa en 6 semanas.

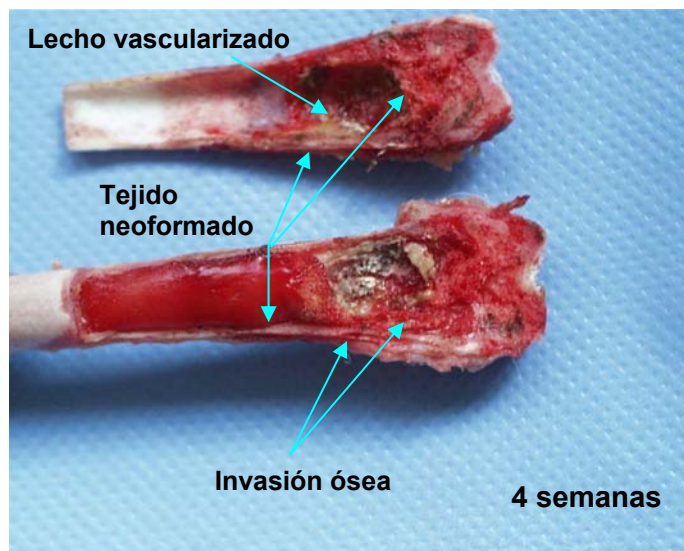
Centrándonos en la formulación seleccionada F-3-20-10, expondremos a continuación los análisis que se llevaron a cabo para estudiar

la evolución de los implantes a lo largo de los ensayos de cesión en conejos. Como acabamos de comentar los niveles alcanzados en hueso pueden ser eficaces para el tratamiento de la infección ósea, sin embargo esto no es suficiente para considerar este tipo de sistemas adecuados para una antibioterapia local ósea; es necesario además comprobar la reacción del tejido al sistema implantado.

La valoración de la biocompatibilidad del sistema se ha hecho sobre la base de los resultados obtenidos de los estudios radiológicos e histopatológicos de las piezas seleccionadas que evolucionaron de forma paralela y se encuentran estrechamente relacionados. Hemos de resaltar, que se llevó a cabo un estudio histológico con implantes blancos (figuras 61–63) para poder detectar las diferencias en regeneración ósea con los implantes conteniendo ciprofloxacino, debido a que como ya hemos comentado hay referencias de retención de ciprofloxacino en tejido óseo y posible efecto negativo en el crecimiento óseo en animales jóvenes. Sin embargo, los resultados observados indican que la evolución regenerativa es similar en ambos casos. Inicialmente, el estudio histológico revela cambios derivados de la agresión quirúrgica que van desapareciendo y apreciándose a lo largo del tiempo calcificaciones intrainplante y relaciones entre el implante y las corticales. Se observa neoformación ósea y osificaciones perimplante, septos conectivos-vasculares intrainplante, en definitiva se establece una relación implante-hueso cada vez más intensa observándose que la densidad del implante se va asemejando al hueso circundante e histológicamente vemos que el implante es invadido por tejido óseo siendo difícil su diferenciación en algunas zonas (figuras 64-70).

En la figura 100 se muestra la impronta dejada por el implante en la zona diafisometafisariadistal del fémur. Así mismo se observa el relleno de la

cavidad medular con tejido óseo neoformado tanto proximal, como distal al implante, así como capas de tejido óseo que lo rodean longitudinalmente por debajo de la cortical primitiva. Observamos también, tejido óseo que sale de la pared primitiva ósea y ha ido avanzando hacia el interior del implante. Se aprecian mamelones de tejido óseo que invaden el implante. Hay que destacar, como puede verse en el fragmente superior, que el lecho dejado por el implante está perfectamente vascularizado.



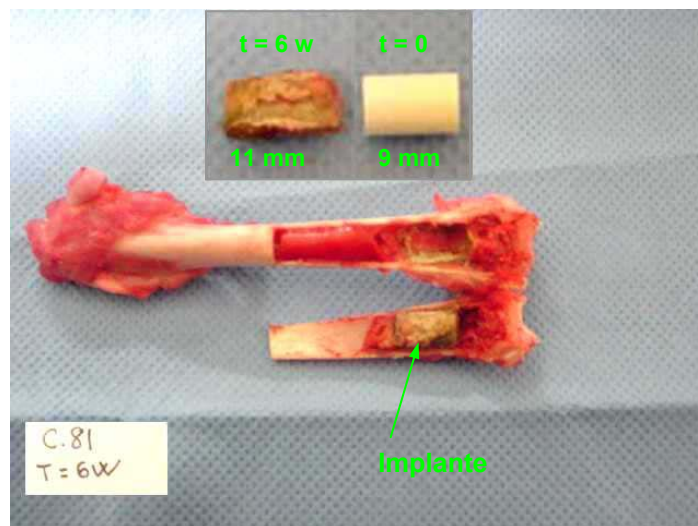
**Figura 100.-** Regeneración ósea observada después de 4 semanas de implantación (F-3-20-10).

Esta invasión secuencial del implante por el nuevo tejido óseo formado condiciona en gran medida la cesión del ciprofloxacino *in vivo* y las modificaciones sufridas por el implante.

En primer lugar de la observación y medida de los implantes colocados en el fémur, a partir de las radiografías, apreciamos que el implante



aumenta de tamaño solamente longitudinalmente, el diámetro se mantiene en aproximadamente 6 mm durante las 24 semanas de las que se dispone radiografías. El incremento de tamaño es más acusado en las primeras semanas y a partir de la 4ª semana se reduce ligeramente. *In vitro* hemos comentado que el implante se hincha tanto en sentido axial como radial y el aumento de tamaño es mucho más acusado *in vitro* que *in vivo*. Estas diferencias son debidas a que *in vivo* el hinchamiento del implante está limitado, ya que se va rodeando de tejido óseo que va penetrando en el sistema dando lugar a la formación de grietas profundas en el implante que radiológicamente parecen atravesarlo (figuras 64-70). Estas observaciones se muestran en las imágenes de la figura 101 donde se aprecia con mayor nitidez el tejido óseo macroscópicamente normal que rodea al implante, así como la vascularización del lecho ocupado por éste. El implante aparece con su superficie irregular y erosionada, posiblemente debido a su desestructuración y posterior invasión por tejido óseo.



**Figura 101.-** Fémur después de 6 semanas de la implantación (F-3-20-10). En el cuadro interior se muestra el implante al inicio y al final del ensayo.

Durante el estudio *in vivo* se intentó llevar a cabo el control de la captación de agua y pérdida de masa. Hemos de indicar que los resultados *in vivo* son aproximados. Cuando se intenta retirar el implante para pesarlo se aprecia que prácticamente se mantiene intacto en las primeras semanas porque se encuentra encajado en el hueso y es difícil extraerlo limpiamente. La captación de agua a pesar de las limitaciones de la toma de muestra, se puede considerar que es similar *in vivo* e *in vitro* (tablas 20 y 53). Sin embargo, el ensayo de pérdida de masa no se pudo realizar por la dificultad de una correcta toma de muestra sobre todo en las primeras semanas pues el implante tiene una estructura esponjosa y no es fácil separarlo del tejido circundante, posteriormente se va endureciendo.

En cuanto a las diferencias morfológicas apreciadas en los implantes a lo largo de los ensayos *in vitro* e *in vivo* hemos de destacar que en ambos casos exteriormente el implante se agrieta tomando forma de corteza (figuras 47 y 58) sin embargo, las imágenes radiográficas sugieren que las grietas formadas se proyectan hacia el interior del implante (figuras 64-70), lo que podría indicar que el implante se agrieta más acusadamente *in vivo* que *in vitro*. Además *in vitro* al microscopio electrónico se observan cristales de ciprofloxacino (figura 48) que no se aprecian *in vivo*.

Todas estas observaciones son consecuencia conjuntamente del hinchamiento de ciprofloxacino y de la entrada de material celular en el implante. Además como ya habíamos puesto de manifiesto en estudios previos (Baro et al., 2002), el PLA-30, material constituyente de la matriz, disminuye su peso molecular *in vivo* (tabla 54) aunque su Tg no se modifica (tabla 55), mientras que *in vitro* ambos parámetros permanecen constantes (tablas 24 y 26). Esta degradación del polímero puede estar favorecida *in vivo* por la presencia de radicales libres, productos ácidos, o enzimas producidos

por las células implicadas en la regeneración ósea observada (Tracy et al., 1999, Liu et al., 2000). Sin embargo no se puede descartar que un proceso autocatalítico por acumulación de productos de degradación dentro del implante y en el tejido que lo rodea pueda estar también implicado (Lu et al., 2000).

El crecimiento celular intra y perimplante lleva consigo una mayor degradación del polímero, una mayor erosión del implante así como la formación de una red de capilares en su interior que favorecen la cesión del ciprofloxacino *in vivo*. El mecanismo de cesión de ciprofloxacino *in vivo* es similar que *in vitro* es decir, comienza con un proceso de hinchamiento y difusión del ciprofloxacino más disponible, posteriormente se produce cierta erosión, lo que favorece la liberación del antibiótico pero sin embargo, no tiene lugar el proceso de disgregación apreciado *in vitro*. *In vivo*, la cesión de la última fase viene probablemente gobernada por la invasión celular y vascular que sufre el implante y que da lugar a ese endurecimiento del sistema y su integración en el tejido óseo del entorno.

A la hora de comparar nuestros resultados con los de otros autores nos encontramos con ciertas dificultades tales como distintos planteamientos experimentales y diferencias importantes en las dosis utilizadas. Overbeck et al., 1995, estudian implantes de PGA con una dosis total de 6 mg de ciprofloxacino. Las concentraciones alcanzadas en cortical y medular superan las CMI a lo largo de 0,1 cm y 0,15 cm del implante durante 2 semanas. De acuerdo con estos autores los niveles resultaron eficaces en hueso infectado. Sin embargo, Ramchandani y Robinson, 1998 emplean dosis mucho más altas, incorporan 100 mg de ciprofloxacino en implantes elaborados con PLGA 50:50 manteniendo niveles por encima de las CMI a lo largo de 7 cm durante 6 semanas, pero hay que tener en cuenta que valoran conjuntamente

cortical y medular. En este último estudio no se lleva a cabo el estudio histológico ni radiológico y no debemos olvidar que estas formulaciones deben cumplir el doble objetivo de erradicar la infección y rellenar el defecto óseo causado por la misma.

Los resultados obtenidos por Overbeck et al., 1995 empleando una dosis inferior a las utilizadas en esta memoria (50 y 200 mg) justifican en primer lugar el abandono de la F-3-20-40 y apoyan la continuación de este estudio en animales infectados, que es nuestro siguiente paso.

**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El método de elaboración permite obtener implantes de ciprofloxacino preparados a base de fosfatos y PLA que ceden el antibiótico durante al menos 6 semanas tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. La velocidad de cesión de ciprofloxacino *in vitro* depende de la presión aplicada en la compresión, de la relación PLA/fosfatos y del contenido en antibiótico. La velocidad de cesión es menor a mayor presión, proporción de PLA y carga de ciprofloxacino.
3. El ciprofloxacino en incubación en el medio de cesión capta agua, se hincha y de acuerdo con los resultados de difracción de rayos X, sufre modificaciones en su estructura cristalina pasando de una fase seca a otra que hemos denominado fase húmeda, que podría tratarse de una forma hidratada.
4. El hinchamiento observado en los implantes en contacto con el medio de cesión es causado exclusivamente por el hinchamiento del ciprofloxacino, aunque en función de la presión aplicada y de la relación PLA/fosfatos, se manifiesta en mayor o menor grado. El hinchamiento es más acusado cuanto mayor es la carga de ciprofloxacino y la proporción de PLA con respecto a los fosfatos y cuanto menor es la presión aplicada.

5. La velocidad de cesión *in vitro* de las formulaciones F-3-20-10 y F-3-20-40 durante la primera semana de ensayo está relacionada con el aumento de porosidad y captación de agua, siendo el efecto más intenso en la F-3-20-40. Posteriormente, la velocidad es independiente de ambos factores. Por el contrario, la influencia de la pérdida de masa se manifiesta a lo largo de todo el ensayo *in vitro*.
6. La cesión de ciprofloxacino *in vitro* se inicia con un proceso de hinchamiento y difusión del antibiótico disponible en el exterior del implante. A partir de la primera semana aproximadamente, se produce hinchamiento más erosión del implante, predominando este último proceso. Después de cuatro semanas predomina la disgregación del implante. No obstante, la solubilidad del fármaco es el proceso limitante de la cesión.
7. La formulación F-3-20-10 es la que más se aproxima a los objetivos planteados en esta memoria, una cesión sostenida durante 4-6 semanas y la liberación de la totalidad de la dosis al cabo de seis semanas. La correlación *in vivo-in vitro* de esta formulación presenta una pendiente prácticamente igual a la unidad. Sin embargo, la cesión *in vivo* fue más rápida y completa que *in vitro*.
8. El mecanismo de cesión *in vivo* es similar al de *in vitro*. Comienza con el hinchamiento del implante, predominando a continuación el proceso de erosión. Sin embargo, la invasión celular y la vascularización del implante así como la degradación del polímero, favorecen la difusión de ciprofloxacino, originando una cesión más rápida y completa que *in vitro*.



9. Los resultados obtenidos *in vivo* nos permiten concluir que los implantes elaborados son potencialmente útiles para el tratamiento *in situ* de la infección ósea. Por una lado, se han alcanzado y mantenido concentraciones de ciprofloxacino superiores a las CMB frente a los microorganismos que más frecuentemente producen este tipo de infección y por otro lado, los materiales empleados en su elaboración son biocompatibles y osteoconductores.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

- Abate J. A., Fadale P. D., Hulstyn M. J., Walsh W.R. "Initial fixation strength of polylactic acid interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction". *Arthroscopy*. 1998; 14 (3): 278-84.
- Aimin C., Chunlin H., Juliang B., Tinyin Z., Zhichao D. "An in vitro, in vivo study of possible treatment for osteomyelitis". *Orthop*. 1999; 366: 239-247.
- Ashammakhi N., Mäkelä E. A., Vihtonen K., Rokkanen P., Törmälä P. " Effect of self-reinforced polyglycolide membranes on cortical bone: An experimental study on rats". *J. Biomed. Mater. Res*. 1995; 29: 687-94.
- Baro M., Sánchez E., Delgado A., Perera A., Évora C. " In vitro - in vivo characterization of gentamicin bone implants". *J. Control. Rel*. 2002
- Bennett S., Conolly K., Lee D. R., Jiang Y., Buck D., Hollinger J. O., Gruskin E. A. "Initial Biocompatibility of a novel degradable polymeric bone substitute that hardens in situ" *Bone*. 1996; 19 (1): 101S-7S.
- Benoit M. A., Mousset B., Delloye C., Bouillet R., Gillard J. "Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections". *Int. Orthop*. 1997, 21: 403-408.
- Boyan B. D., Nasatzky E., Keller B. S., Schwartz Z. " Sustitutos del injerto óseo". *Selecciones de Current Opinio in Orthopedics*". 1998; III (4): 17-23.
- Braye F., Irigaray J. L., Jallot e., Oudadesse H., Weber G., Deschamp N., Deschamp C., Frayssinet P., Tourenne P., Tixier H. " Resorption kinetics of osseous substitute: natural coral and synthetic hidroxyapatite". *Biomaterials*. 1996; 17: 1345-50.

- Burstein F. D., Cohen S. R., Hudgins R., Boydston W., Simms C. "The use of hydroxyapatite cement in secondary craniofacial reconstruction". *Plast. Reconstr. Surg.* 1999; 104 (5): 1270-5.
- Calhoun J. H., Mader J. T. "Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant". *Clin. Orthop. and Rel. Res.* 1997; 341: 206-214.
- Chu C. R., Coutts R.D., Yoshioka M., Harwood F.L., Monosov A.Z., Amiel D. "Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study". *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29 (9): 1147-54.
- Conceição V., Martins V.C., Goissis G. "Nonstoichiometric hydroxyapatite – Anionic Collagen Composite a support for the double sustained release of gentamicin and Norfloxacin/ciprofloxacin". *Artif. Organs* 2000 24(3): 224-230.
- Dounis E., Korakis T., Anastasiadis A., Kanellakopoulou K., Andreopoulos, Giamarellou H. "Sustained release of fleroxacin in vitro from lactic acid polymer" *Bull. Hosp. Joint Dis.* 1996; 55(1): 16-19.
- Freed L. E., Marquis J. C., Nohria A., Emmanuel J., Mikos A. G., Langer R. "Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers". *J Biomed. Mater. Res.* 1993; 27: 11-23.
- Galanakis N., Giamamrellou H., Moussas T. "Chronic osteomyelitis caused by multi-resistant Gram-negative bacteria: evaluation of treatment with newer quinolones after prolonged follow-up". *J. Antimicrob. Chemother.* 1997, 39(2): 241-246.
- García A., Clavel-Sainz M., Messeguer J., Gabardo A., Santoja F. "Poliésteres (PLA/PGA) biodegradables en Cirugía Ortopédica:

- Estudio de su degradación y sustitución por tejido óseo". *Rev. Ortopedia y Traumatología* 1996; 40: 500-10.
- Garvin K.L., Miyano J. A., Robinson D., Giger D., Novak J., Radio S. "Polylactide/polyglycolide antibiotic implantes in the treatment of osteomyelitis. A canine model". *J. Bone Joint Surg. Am.* 1994; 76 (10): 1500-6.
  - Glasstone, S. "Tratado de Química Física". 1972; editorial Aguilar. Cap. 14.
  - Gursel I., Korkusuz F., Turesin F., Alaeddinoglu N. G., Hasirci V. "In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems". *Biomaterials* 2001, 22(1): 73-80.
  - Habib M., Onyilofor S., Ebube N. K., Owusu A. G. "Preparation and characterization of ofloxacin microspheres for the eradication of bone associated bacteria biofilm". *J. Microencapsul.* 1999; 16 (1): 27-37.
  - Henry S.L., Galloway K.P. "Local antibacterial therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations". *Clin. Pharmacokinet.* 1995, 29(1): 36-45.
  - Itokazu M., Ohno T., Tanemori T., Wada E., Kato N., Watanabe K. "Antibiotic-loaded hydroxyapatite blocks in the treatment of experimental osteomyelitis in rats". *J. Med. Microbiol.* 1997; 46: 779-83.
  - Itokazu M., Aoki T., Nonomura H., Nishimoto Y., Itoh Y. "Antibiotic-loaded porous hydroxyapatite blocks for the treatment of osteomyelitis and postoperative infection. A preliminary report". *Bull. Hosp. Jt Dis.* 1998; 57 (3): 125-9.
  - Kanellakopoulou K., Kolia M., Anastassiadis A., Korakis T., Giamarellos-Bourboulis E. J., Andreopoulos A., Dounis E., Giamarellou H. "Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluorquinolones: an in vitro study". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43 (3): 714-6.

- Kanellakopoulou K., Giamarellou-Bourboulis E. J. "Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections". *Drugs* 2000, 59(6): 1223-1232.
- Klemm K. "The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections". *Clin. Microbiol. Infect.* 2001, 7: 28-31.
- Korkusuz F., Uchida A., Shinto Y., Arak N., Inoue K., Ono K. " Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hidroxyaoatite ceramic composites". *J. Bone Joint Surg. Br.* 1993; 75-B: 111-4.
- Lambotte J. C., Thomazeau H., Cathelineau G., Lancien G., Minet J., Langlais F. "Phosphate tricalcique, vecteur d'antibiotiques: étude sur foyer d'ostéomyélite expérimentale chez le lapin". *Chirurgie.* 1998; 123: 572-9.
- Laurencin C. T., Gerhart T., Witschger P., Satcher R., Domb A., Rosenberg A. E., Hanff P., Edsberg L., Hayes W., Langer R. " Bioerodible polianhydrides for antibiotic drug delivery: In vivo osteomyelitis treatment in a rat model system". *J. Orthop. Res.* 1993; 11 (2): 256-62.
- Levai J. P., Boisgard S. " Acetabular reconstruction in total hip revision using a bone graft substitute". *Clin. Orthop.* 1996; 33: 108-114.
- Lew D.P., Waldvogel F. A. "Quinolones and osteomyelitis: State-of-the-Art". *Drugs* 1995; 49 (Suppl.2): 100-111.
- Lew D.P., Waldvogel F. A. "Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis". *Drugs* 1999; 58 (Suppl.2): 85-91.
- Losken H. W., Tschakaloff A., Von-Oepen R., Mooney M. P., Moritz O., Michaeli W., Lalikos J., Losken A. " Memory of DL-pylactic acid biodegradable plates". *Ann. Plast. Surg.* 1994; 32 (6): 606-11.



- Martin, A. N. "Principios de físico-química para Farmacia y Biología". 1967; editorial Alambra, S.A. Cap. 19.
- Martins V. C., Goissis G., Ribeiro A. C., Marcantônio E. Jr., Bet M. R. "The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites". *Artf. Organs*. 1998; 22 (3): 215-21.
- Maze G.I., Reinhardt R.A., Agarwal R.K., Dyer J. K., Robinson D. H., DuBois L. M., Tussing G. J., Maze C. R. "Response to intracrevicular controlled delivery of 25% tetracycline from poly(lactide/glycolide) film strips in STP patients". *J. Clin. Periodontol*. 1995; 22 (11): 860-7.
- Meyer J. D. Falk R. F., Kelly R. M., Shively J. E., Withrow S. J., Dernell W. S., Kroll D. J., Randolph T. W., Manning M. C. "Preparation and in vitro characterization of gentamycin-impregnated biodegradable beads suitable for treatment of osteomyelitis". *J. Pharm. Sci*. 1998; 87 (9): 1149-54.
- Moore J. D. y Flanner, H. H. "Mathematical comparison of dissolution profiles". *Pharm. Technol*. 1996; 20: 64-74.
- Morales de Cano J., Fernández A., Bombi J. A., Cabo J., Potabella F., Manzanares C. "Utilización del sulfato cálcico como material de sustitución ósea". *Biomecánica*. 1995; III (4): 42-8.
- Munday D.L., Cox P.J. "Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms" *Int. J. Pharm*. 2000; 203: 179-192.
- Nakamura K., Natsugoe S., Kumano-hoso T., Aikou T., Shinkawa T., Yamada K., Fukuzaki H. "Controlled release of poly-D,L-lactic acid containing bleomycin". *Anticancer Drugs*. 1995; 6 (3): 483-7.
- Nelson C. L., Griffin F. M., Harrison B. H. "In vitro elution characteristics of commercially and noncommercially prepared antibiotic PMMA beads". *Clin. Orthop*. 1992, 284, 303-309.

- Nicolau D. P., Nie L., Tessier P. R., Kourea H. P., Nightingale C. H. " Prophylaxis of acute osteomyelitis with absorbable ofloxacin-impregnated beads". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42 (4): 840-2.
- Nie L., Nicolau D. P., Tessier P. R., Kourea H. P., Browner B. D., Nightingale C. H. " Use of bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment". *J. Orthop. Res.* 1998; 16 (1): 76-9.
- Nijhof M.W., Stakkmann H. P., Vogely H.C., Fler A., Schouls L.M., Dhert W. J., Verbout A. J. "Prevention of infection with tobramycin-containing bone cement or systemic cefazolin in an animal model". *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 52(4): 709-715.
- Nijhof M.W., Dhert W. J., Fler A., Vogely H.C., Verbout A. J. "Prophylaxis of implant-related staphylococcal infections using tobramycin-containing bone cement". *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 52(4): 754-761.
- Otto T. E., Nulend J. K., Patka P., Burger E. H., Haarman H. J. Th. "Effect of (poly)-L-lactic acid on the proliferation and differentiation of primary bone cells *in vitro*" *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 32: 513-8.
- Overbeck J. P., Winckler S. T., Meffert R., Törmälä P., Spiegel H. U., Brug E. "Penetration of ciprofloxacin into bone: A new bioabsorbable implant". *J. Invest. Surg.* 1995; 8: 155-62.
- Radder A. M., Leenders H., van Blitterswijk C. A. " Application of porous PEO/PBT copolymers for bone replacement". *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 30: 341-51.
- Ramchandani M., Robinson D. " In vitro in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants". *J. Control. Rel.* 1998; 54 (2): 167-75.

- Real Farmacopea Española (1ª edición), 1997. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Rissing J. P. "Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones". *Clin. Infect. Dis.* 1997, 25(12): 1327-1333.
- Rushton N. "Applications of local antibiotic therapy". *Eur. J. Surg.* 1997, Suppl. 578:27-30.
- Sánchez E., Baro M., Soriano I., Perera A., Évora C. "In vivo – in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001, 52: 151-158.
- Sasaki S. e Ishii Y. "Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis". *J. Orthop. Sci.* 1999; 4 (5): 361-9.
- Schierholz J. M., Steinhäuser H., Rump, A. F. E., Berkels R., Pulverer G. "Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: morphological and structural features" *Biomaterials* 1997;18: 839-844.
- Schmidt C., Wenz R., Nies B., Moll F. "Antibiotic in vivo / in vitro release, histocompatibility and biodegradation of gentamicin implants based on lactic acid polymers and copolymers". *J. Control. Rel.* 1995; 37: 83-94.
- Shinto Y., Uchida A., Korkusuz F., Araki N., Ono K. " Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics". *J. Bone Joint Surg. Br.* 1992;74-B: 600-4.
- Siepmann J., Peppas N.A. "Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: An improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics (the "Sequential Layer" model)". *Pharm. Res.* 2000; 17(10): 1290-1298.

- Solberg B. D., Gutow A. P., Baumgaertner M. R. " Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model". *J. Orthop. Trauma*. 1999; 13 (2): 102-6.
- Soriano I., Évora C. " Formulation of calcium phosphates/ poly (d,l- lactide) blends containing gentamicin for bone implantation". *J. Control. Rel*. 2000; 68: 121-34.
- Springer M. A., Van-Binsbergen E. A., Patka P., Bakker F. C., Haarman H. J. "Resorbable rods and screws for fixation of ankle fractures. A randomized clinical prospective study" *Unfallchirurg*. 1998; 101(5): 377-81.
- Sujja-areevath J., Munday D.L., Cox P.J., Khan K.A. "Release characteristics of diclofenac sodium from encapsulated natural gum mini-matrix formulations" *Int. J. Pharm*. 1996; 139: 53-62.
- Thoma K., Alex R., Randzio J. " Biodegradable controlled release implants based on  $\beta$ - tricalcium phosphate ceramic". *J. Pharm. Biopharm*. 1992; 38 (3): 107-112.
- Thomazeau H., Langlais F. " Relargage d'antibiotiques par implantation osseuse de phosphate tricalcique". *Chirurgie*. 1996; 121: 663-6.
- Thomson R.C., Yaszemski M. J., Powers J.M., Mikos A.G. " Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone". *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*. 1995; 7 (1): 23-38.
- Vasenius J., Vainionpää S., Vihtonen K., Mero M., Mäkelä A., Törmälä P., Rokkanen P. "A histomorphological study on self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) osteosynthesis implantates coated with slowly absorbable polymers". *J Biomed. Mater. Res*. 1990; 24: 1615-35.
- Wallis S. C., Charles B. G., Gahan L. R., Filippich L. J., Bredhauer M. G. y Duckworth P. A. " Interaction of Norfloxacin with divalent and

trivalent pharmaceutical cations. *In vitro* complexation and *In vivo* pharmacokinetic studies in the dog" *J. Pharm. Sci.* 1996, 85, 8: 803-809.

- Wei G., Kotoura Y., Oka Masanori, Yamamuro T., Wada R., Hyon S-H, Ikada Y. "Bioabsorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis" *J. Bone Joint Surg. (Br)*. 1991, 73:246-252.
- Winet H, Hollinger J.O., Stevanovic M. "Incorporation of polylactide-polyglycolide in a cortical defect: neoangiogenesis and blood supply in a bone chamber". *J. Orthop. Res.* 1995; 13 (5): 679-89.
- Yagmurlu M. F., Korkusuz F., Gürsel I., Korkusuz P., Örs Ü., Hasirci V. "Sulbactam-cefoperazone 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.
- Yamashita Y., Uchida A., Yamakawa T., Shinto Y., Araki N., Kato K. "Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic". *Int. Orthop.* 1998; 22 (4): 247-51.
- Yang Z., Yuan H., Tong W., Zou P., Chen W., Zhang X. "Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals". *Biomaterials.* 1996; 17 (22): 2131-7.
- Yaylaoglu M. B., Korkusuz P., Örs Ü., Korkusuz F., Hasirci V. "Development of calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release". *Biomaterials.* 1999; 20: 711-9.
- Yoneda M., Hayashida K., Izawa K., Shimada K., Shino K. " A simple and secure anchoring system for Caspari's transglenoid multiple suture

technique using a biodegradable poly-L-lactic acid button".  
*J. Arthroscopy* 1996, 12(3): 293-299.