

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Estudio in vivo – in vitro de  
implantes óseos de gentamicina**

**Autor: Baro Darias, Manuel**

**Directores: Carmen María Evora 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 LA LAGUNA. SPAIN

CARMEN MARÍA EVORA 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: Qué la presente memoria experimental titulada  
**“ESTUDIO *IN VIVO-*IN VITRO** DE IMPLANTES ÓSEOS  
DE GENTAMICINA”**, elaborada por el Licenciado en  
Medicina y Cirugía D. Manuel Baro Darias, 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 diecisiete de enero 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 mi padre**

Al acabar este trabajo me doy cuenta que sin la ayuda de muchas personas no se hubiera llegado al final. Personas que desinteresadamente han colaborado, no solamente con sus conocimientos, sino con el ánimo que me infundieron en los momentos en que pensé abandonar. A algunas las considero ahora como verdaderos amigos.

No quisiera olvidarme de nadie, tarea bastante difícil, aunque vamos a intentarlo.

A la Dra. Carmen M<sup>a</sup> Évora, quien supo corregir el rumbo cuando me encontraba perdido. Hizo que su Departamento fuera mi segunda casa.

A la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Soriano, que me inició en las estrictas reglas de la investigación seria y ordenada.

A la Dra. Araceli Delgado, por su paciencia en explicarme conceptos novedosos y que nunca pensé que existieran.

A Carmen, ejemplo de meticulosidad.

Inmaculada, compañera de fatigas. Gracias.

A los profesores del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, la Dra. Laila Moujir y el Dr. Miguel Ángel Falcón, por su orientación en los aspectos que ellos dominan.

Al Servicio de Radiología de Hospitén Rambla, sin cuya colaboración no se hubiera podido completar este trabajo. Especialmente, a los técnicos de Rayos, a quienes nunca les importó realizar un trabajo extra.

A la Dirección y Gerencia de Hospitén Rambla, por dejarme utilizar sus instalaciones.

Al Dr. Pedro Núñez, amigo antes de empezar este trabajo y después de acabarlo. Por su colaboración en el estudio de la estructura cristalina de los materiales empleados.

A D. Antonio Perera Molinero, Anatomopatólogo y además cuñado mío. Tu ayuda fue de incalculable valor.

Al Dr. Enrique Martínez, por su ayuda desinteresada en las determinaciones hematológicas.

A la Dra. M<sup>a</sup> Rosa Arnau y a su equipo del estabulario, por sus consejos en el manejo y cuidado de los animales.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología de Hospitén Rambla, quienes se encargaron del trabajo hospitalario para que yo me dedicara a acabar éste.

A mi familia, por muchas razones.

Pero hay una persona que merece un agradecimiento especial que no sé expresar en el papel; una persona generosa, trabajadora, sacrificada, que me soportó durante estos años, que sufrió por mí y conmigo. Le hice perder la paciencia en numerosas ocasiones. Pero me llevó hasta el final. Como no sé cómo decirlo, simplemente utilizaré la palabra gracias, Dra. Esther Sánchez. Muchas gracias.

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

### Tratamientos propuestos

Objetivo terapéutico.....4

Terapia atinfecciosa.....7

### Biomateriales

Tipos y características.....9

Sales de calcio.....11

Sales de calcio como sustitutos óseos.....11

Sales de calcio como vehículos de antibióticos.....12

Polímeros.....17

Polímeros como sustitutos óseos.....18

Polímeros como vehículos de antibióticos.....22

Poliláctico y sus copolímeros.....23

Otros polímeros empleados como vehículos de antibióticos.. 28

II. OBJETIVOS.....29

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales.....31

Caracterización de materias primas.....31

Preparación de los implantes.....33

Diseño experimental.....34

### Ensayos *in vitro*

Método analítico.....35

Determinación del contenido en gentamicina.....36

Ensayos de cesión .....36

Captación de agua y pérdida de masa.....37

Caracterización de la estructura microporosa .....	37
Estudios de degradación .....	38
Ensayos <i>in vivo</i>	
Técnica quirúrgica.....	40
Protocolo de muestreo.....	45
Determinación de gentamicina en muestras biológicas.....	46
Control de la función renal.....	48
Análisis radiológico .....	48
Análisis histopatológico.....	49

#### IV. RESULTADOS

Sección I.- Caracterización de materias primas.....	51
Sección II.- Estudio en ratas	
Elaboración de los implantes.....	55
Ensayos de cesión <i>in vitro</i> .....	56
Ensayos <i>in vivo</i>	
Ensayos de cesión.....	59
Gentamicina en suero y riñón.....	62
Estudio radiológico.....	65
Estudio histológico.....	79
Sección III.- Estudio en conejos	
Estudio preliminar.....	85
Diseño experimental.....	89
Ensayos <i>in vitro</i>	
Ensayos de cesión .....	93
Captación de agua y pérdida de masa.....	99
Estructura de los implantes.....	103
Resultados de degradación.....	114

## Ensayos *in vivo*

Ensayos de cesión de gentamicina.....	120
Gentamicina en hueso.....	121
Gentamicina en suero y riñón.....	122
Control de la función renal.....	123
Captación de agua y pérdida de masa.....	124
Estructura de los implantes.....	126
Resultados de degradación.....	131
Resultados radiológicos.....	135
Resultados histológicos.....	140

## V. DISCUSIÓN

Estudio en ratas.....	147
Estudio en conejos.....	156

## VI. CONCLUSIONES.....177

## VII. BIBLIOGRAFÍA.....179



## **INTRODUCCIÓN**



La infección ósea es una de las complicaciones más graves de la Cirugía Ortopédica y sigue siendo la mayor causa del fracaso de las sustituciones articulares. Por otro lado, desde el punto de vista de la Traumatología, 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.

Clásicamente las osteomielitis se han dividido en agudas y crónicas. La osteomielitis aguda puede ser a su vez, subdividida en tres tipos:

a.- 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.

b.- Por continuidad: es decir, el germen alcanza el hueso a partir de una lesión vecina. Es la más frecuente en los pacientes de edad avanzada, diabéticos o con alteraciones vasculares.

c.- Hematógena: el germen alcanza el tejido óseo por vía hemática, 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, con una incidencia anual estimada en 4,5 casos cada 100.000 habitantes (Armstrong y Elsberry, 1997). 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.

Su comienzo, preferentemente metafisario, se debe a la estructura vascular de esa zona, con una gran riqueza en vasos, con finas ramificaciones de la arteria nutricia y formación de bucles vasculares, que

desembocan en lagos venosos, donde la circulación se enlentece (Dimeglio, 1995).

Osteomielitis crónica: es aquella que se produce secundariamente a una osteomielitis aguda que no curó.

Otros tipos de osteomielitis crónicas, de presentación más rara, son (Piulachs, 1956):

a.- Osteomielitis crónica primitiva: recuente en ancianos. Se presenta sin fiebre y con alteraciones radiológicas óseas. De diagnóstico diferencial difícil con determinados tumores (sarcomas).

b.- Periostitis albuminosa de Ollier y Poncet: se presenta como una colección subperióstica, localizada generalmente en el tercio inferior del fémur.

c.- Esclerosante o hiperostosante de Garré: puede aparecer tras una forma aguda, o como crónica de entrada. El diagnóstico es fundamentalmente con pruebas complementarias (radiología, gammagrafía), pues el hueso aparece ebúrneo, engrosado, sin medular, y no hay dolor a la presión. De cuadro clínico pobre, con alguna elevación térmica.

d.- Forma neurálgica de Gosselin: caracterizada por el intenso dolor, debido a la compresión de los filetes nerviosos dentro de los conductos de Havers. Debe hacerse el diagnóstico diferencial con la lúes.

e.- Absceso de David-Brodie: se caracteriza por dolor más o menos intenso, que se exacerba por la noche y con los cambios de tiempo. De localización metafisaria, generalmente en la distal de tibia y fémur, aparece radiológicamente como una geoda ovalada, con el eje mayor paralelo al del hueso y rodeada de un ribete, sin reacción perióstica.

Otras formas de aparición, todavía más raras son:

f.- Osteomielitis fibrosa de Phemister: aparece una reacción fibrosa localizada, que radiológicamente se manifiesta por una cavidad quística, rellena de tejido fibroso.

g.- Osteítis cortical de Leriche y Bauer: exclusiva del adulto. Se localiza fundamentalmente en fémur, húmero y tibia. De sintomatología exclusivamente dolorosa, aparece radiológicamente como una geoda cortical, con reacción perióstica y a veces con un pequeño secuestro en su interior.

Desde un principio y de diferentes maneras, se intenta luchar contra la infección. Así, en Hipócrates (Lain Entralgo, 1975) encontramos la primera referencia, pues aconsejaba el uso sistemático de la cauterización de las heridas. Esta idea, así como la del "*pus laudábilis*", permanecen vigentes hasta el siglo XIV, cuando opiniones como las de Henry de Mondeville y Avicena (Lain Entralgo, 1975) se aventuran a contradecir a los maestros clásicos. Dessault (Lain Entralgo, 1975) indica la necesidad de desbridar las heridas pero a pesar de ello, el tratamiento de las fracturas abiertas, en las que la aparición de una infección ósea era casi seguro, consistía preferentemente en la amputación del miembro. Larrey, cirujano de Napoleón, llegó a realizar doscientas amputaciones en una sola noche (Kren, 1915).

A finales del siglo XIX, las dos principales armas para luchar contra la infección eran el desbridamiento de las heridas y el uso de antisépticos. Desde ese momento y hasta nuestros días, la incorporación de nuevas técnicas quirúrgicas, la cobertura realizada con antibióticos de amplio espectro y combinaciones de ellos, los avances en microcirugía, la utilización de implantes de nuevos materiales para la osteosíntesis y osteotaxia de las fracturas, han conseguido disminuir el número de infecciones óseas, si bien, cuando aparecen, no dejan de ser una grave complicación para el paciente.

Actualmente, y por diferentes razones (nuevas técnicas quirúrgicas, nuevos materiales para osteosíntesis, etc.) las indicaciones quirúrgicas en las fracturas son mayores y aunque el riesgo de infección, debido al uso de antibióticos ha disminuido, las complicaciones sépticas se siguen presentando, lo que justifica la antibioterapia. Lógicamente, el número cada vez mayor de fracturas abiertas debidas a los accidentes de tráfico, laborales

y por armas de fuego, contribuye también al aumento de las infecciones óseas.

A pesar del amplio abanico antibiótico, una osteomielitis aguda hematógena sigue siendo hoy un cuadro grave, que no sólo pone en peligro la viabilidad de la zona afectada, sino también la vida del enfermo.

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.

## **TRATAMIENTOS PROPUESTOS**

### **Objetivo terapéutico**

La osteomielitis es una enfermedad ósea causada fundamentalmente por bacterias, que afecta a la cavidad medular, a la cortical y al periostio (Ramchandani y Robinson, 1998). Los principales microorganismos responsables de producir la osteomielitis son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Azanza et al., 2000).

Una osteomielitis tras una cirugía de reemplazo articular, o tras la osteosíntesis de una fractura, continúa siendo un problema importante, pudiéndose considerar como una verdadera catástrofe (Korkusuz et al., 1993). Hay que tener en cuenta, especialmente en las osteomielitis crónicas, que además de la infección, se produce una pérdida de tejido óseo, debido en parte a la propia enfermedad, y también por los actos quirúrgicos encaminados a su erradicación. Por lo tanto, el tratamiento tendrá el doble propósito de, por una parte eliminar la infección ósea y por otra, sustituir el tejido perdido. Esto conlleva a una combinación del tratamiento quirúrgico,

para eliminar los tejidos desvitalizados, secuestros, etc., con una terapia antibiótica local (Thoma et al., 1992) y efectiva, con aporte de material que estimule o sirva de soporte para un nuevo tejido óseo.

Para tratar la infección ósea se necesitan altas concentraciones de antibióticos en la zona afectada (Korkusuz et al., 1993), concretamente se requiere mantener concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) durante un tiempo prolongado.

La administración sistémica de antibióticos es la modalidad que más se emplea en el tratamiento de la osteomielitis a pesar de los inconvenientes que presenta, particularmente en la enfermedad crónica. Dentro de estos inconvenientes hemos de resaltar la falta de eficacia antiinfecciosa en algunos casos pues no es un método apropiado para obtener altas concentraciones en el lugar de la infección. En primer lugar, porque sólo una pequeña fracción de la dosis administrada alcanza el lugar deseado (Schmidt et al., 1995) y, en segundo lugar, la presencia de tejido necrosado o isquémico, cavidades y fragmentos óseos desvitalizados (secuestros) privados de riego sanguíneo (Watson Jones, 1980) hacen que la penetración del antibiótico sea aún menor, dificultándose así la obtención de concentraciones eficaces y además, una terapia antiinfecciosa prolongada potencia la aparición de efectos secundarios. Si con el propósito de incrementar la concentración de antibióticos en la zona infectada, aumentamos la dosis administrada, se aumenta el riesgo de efectos secundarios como ototoxicidad, nefrotoxicidad (Schmidt et al., 1995), aplasia medular, hepatitis, etc. (Shinto et al., 1992). Otra desventaja es la de mantener abierta una vía durante las semanas que se prolongue el tratamiento, sin que se obstruya o infecte el catéter (Calhoun y Mader, 1997). Finalmente, hemos de indicar que este tipo de tratamiento por vía sistémica resulta caro.

Con el fin de evitar estos inconvenientes, 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).

Sin embargo, hasta el momento, sólo una especialidad (Septopal®), se encuentra en el mercado europeo. Esta especialidad consiste en perlas de polimetilmetacrilato (PMMA) impregnadas con gentamicina. Cada perla contiene 7,5 mg de sulfato de gentamicina que pueden emplearse individualmente para rellenar una cavidad practicada en una intervención quirúrgica o utilizarse varias de ellas unidas por un hilo de acero inoxidable en forma de cadena, de 10, 30 ó 60 perlas, para colocar en hueso o en tejido blando. Las perlas se mantienen en la zona infectada durante aproximadamente dos semanas cediendo gentamicina a una velocidad de 400 a 600  $\mu\text{g}$ /perla/día. Este sistema 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. Desgraciadamente 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.

Por todo lo expuesto, en los últimos años se continúa investigando para conseguir un sistema que mantenga las ventajas de una administración local pero sin los inconvenientes que acabamos de describir. El objetivo actual es conseguir un método 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.

### **Terapia antiinfecciosa.**

Llama la atención la gran variedad de grupos de antibióticos que han sido empleados para el tratamiento de la osteomielitis. Variedad que también se refleja en los estudios experimentales tanto *in Vitro* como *in vivo* que se han publicado en la última década, proponiendo nuevos sistemas terapéuticos para este tipo de infección, como se recoge en la tabla 1. Sin embargo, es sin lugar a dudas la gentamicina el antibiótico más ampliamente estudiado probablemente debido a su amplio espectro y elevada toxicidad sistémica, lo que lo hace un candidato atractivo para formularlo en sistemas de cesión *in situ*, con el objetivo de aumentar su eficacia terapéutica y evitar su toxicidad.

<b>Grupo</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Referencia</b>
Tetraciclinas	Tetraciclina	Maze et al. (1995), Webber et al. (1998)
Cefalosporinas	Cefoperazona	Shinto et al. (1992)
	Cefoperazona + Sulbactam	Yagmurlu et al. (1999)
	Cefuroxima	<b>Gracia et al. (1998)</b>
	Cefmetazol + sulfato de Isepamicina	Kawanabe et al. (1998)
Aminoglucósidos	Kanamicina	Wei G. et al. (1991)
	Arbekacín	Itokazu et al. (1997)
	Tobramicina	Greene et al. (1998), <b>Gracia et al. (1998)</b> , Scott et al. (1999)
	Gentamicina	Shinto et al. (1992), Thoma et al. (1992), Korkusuz et al. (1992), Laurencin et al. (1993), Morales de Cano et al. (1995), Thomazeau et al. (1996), Bohner et al. (1997), Meyer et al. (1998), Seber et al. (1998), Walenkamp et al. (1998), Yaylaoglu et al. (1998), Lambotte et al. (1998), Solberg et al. (1999), Sasaki e Ishii (1999), Soriano y Évora (2000)
Fluorquinolonas	Ciprofloxacino	Ramchandani et al. (1998), Kanellakopoulou et al. (1999)
	Ofloxacino	Nicolau et al. (1998), Habib et al. (1999), Nie et al. (1998)
Glicopéptidos	Vancomicina	Atkins et al. (1998), Greene et al. (1998), Ozaki et al. (1998), Gracia et al. (1998)
Otros	Sulperazona	Yagmurlu et al. (1999)
	Bleomicina	Nakamura et al. (1995)

**Tabla 1.- Antibióticos propuestos para el tratamiento de la osteomielitis.**

## **BIOMATERIALES**

Como hemos comentado una infección ósea implica generalmente, una pérdida de tejido, con lo que además de erradicar la infección, habrá que aportar material que sustituya al hueso desvitalizado.

Así surgen los biomateriales, definidos desde 1991 en la Conferencia de Consenso de Chester, como cualquier material empleado para sustituir o reforzar la función de un tejido o de un órgano y que establece relaciones de intercambio con los sistemas biológicos (Vallejo Galbete 2000).

En la convención que la Sociedad de Investigaciones Ortopédicas organizó en 1997 en la AAOS (American Academy of Orthopedics Surgeons) que se celebró en San Francisco (California), se destacó el papel del ácido poliláctico como biomaterial (Boyan et al., 1998). Desde entonces, su presencia en Cirugía Ortopédica ha aumentado de forma notable.

### **Tipos y Características**

Los biomateriales son los materiales que han resultado más adecuados como matriz de sistemas de liberación de antibióticos para alcanzar y mantener concentraciones eficaces en el foco de infección y promover una cierta osteoinducción. Además, el material implantado debe reunir ciertas condiciones mecánicas como la capacidad para soportar peso, fuerzas de tensión, flexión, etc., ser reabsorbible y degradarse en metabolitos no tóxicos. En la actualidad no existe ningún material que posea todas las características óptimas para las diferentes aplicaciones ortopédicas pero como comentaremos, se han producido grandes avances en cuanto al desarrollo de nuevos materiales.

Los biomateriales pueden ser divididos en (Vallejo Galbete, 2000):

**1.- Biológicos:**

- Injertos óseos: - Autoinjertos
  - Aloinjertos
  - Xenoinjertos
- Cartílago articular y fibrocartílago meniscal
- Disco intervertebral, tendones y ligamentos
- Coral

**2.- Artificiales:**

- Metales: - Puros
  - Aleaciones
- Polímeros
- Cerámicas: - Bioinertes
  - Bioactivas
- Materiales carbonados

De todos ellos, el ideal sería el autoinjerto. Se han publicado algunos trabajos en los que se emplean impregnados en gentamicina, para el relleno de las cavidades óseas y tratamiento de la osteomielitis (Chan et al., 1998). No obstante, el uso sistemático de los autoinjertos implica una mayor morbilidad, así como un mayor riesgo de infecciones y dolor postoperatorio. Además, la cantidad de hueso que se puede injertar es restringida y su reabsorción puede hacer necesario una nueva intervención (Boyan et al., 1998). También se han utilizado xenoinjertos impregnados en gentamicina, con el mismo fin (Seber et al., 1998).

Sin embargo, los materiales más utilizados como vehículos de antibióticos para la liberación controlada de los mismos en el lugar de la infección han sido, solos o combinados, las sales de calcio y los polímeros.

- **Sales de calcio**

### **1.- Sales de calcio como sustitutos óseos**

El empleo de las sales de calcio, como sustituto óseo, se basa en su similitud estructural con la fase mineral del hueso. Su capacidad para inducir la osteogénesis (Burstein et al., 1999) ha sido ampliamente estudiada *in vivo*, incluso en áreas extraesqueléticas (Yang et al., 1996).

El primer cirujano que empleó yeso de Paris para rellenar cavidades óseas fue Dressmann (1892). En 1894, Stechow, utilizando la misma técnica pero dejando íntegro el periostio, comprobó que se producía una reabsorción completa del yeso (sulfato cálcico) (Peltier et al. 1957). Posteriormente, Koffmann en 1925, publica un trabajo en el que recogía los resultados de pacientes con osteomielitis de tibia y su evolución favorable tras la limpieza quirúrgica de la cavidad y posterior relleno con yeso (Koffmann, 1925).

Treinta años mas tarde, en 1956, Nikulin y Ljubovic, tras estudios experimentales, afirman que el sulfato de calcio produce en el hueso reacciones similares a las que se producen tras una fractura (Nikulin y Ljubovic, 1956).

Por tanto, el empleo de sales cálcicas para la reparación ósea es una técnica relativamente antigua. El uso de cerámicas para la regeneración de defectos óseos se apoya en su similitud con el hueso. Los materiales más empleados han sido la hidroxiapatita, de coral, bovina o sintética y el fosfato tricálcico. En el caso de la hidroxiapatita se han observado ciertas diferencias según su origen. Así, Braye et al. (1996) han comprobado que cuando se implanta hidroxiapatita sintética o de coral en fémur de ovejas, se produce un intercambio iónico con el tejido óseo dando lugar a la integración del implante; sin embargo la velocidad de reabsorción del coral (5 meses) es más rápida que la de la hidroxiapatita sintética (9 meses). Por otro lado, Levai y Boisgard

(1996) han demostrado que la hidroxiapatita bovina puede emplearse con éxito como sustitutivo del injerto óseo en la cirugía de revisión de artroplasia total de cadera. Yang et al. (1996) emplean cerámica sintética de fosfato cálcico, constituida por una mezcla de fosfato tricálcico e hidroxiapatita y estudian la diferente osteogénesis que induce este material en distintas especies animales tras su implantación en tejido subcutáneo y muscular.

Recientemente, Burstein et al. (1999) muestran la eficacia del cemento de hidroxiapatita en la reconstrucción craneofacial secundaria. El estudio se llevó a cabo en 61 pacientes, la mayoría de los cuales son niños entre 2 y 18 años y los autores indican que se produce una excelente retención del volumen del implante sin que se haya producido recurrencia del defecto periférico después de tres años de la implantación. Señalan que no se ha producido ninguna evidencia de rechazo, concluyendo que el cemento de hidroxiapatita es un biomaterial muy versátil y seguro, muy útil para la corrección de defectos secundarios del contorno craneofacial en niños y adultos.

## **2.- Sales de calcio como vehículos de antibióticos.**

Como hemos comentado, el uso de sales cálcicas para el relleno de defectos óseos se remonta a los años veinte del siglo pasado, sin embargo su utilización como soporte de antibióticos comienza en la década de los cincuenta. En 1953, Kovacevic presenta tres casos de osteomielitis hematógena de tibia, que tras una diafisectomía, se les implantó unos cilindros de yeso con penicilina y sulfamidas, comprobando que se revertía el proceso séptico, y se producía una restitución completa del hueso (Kovacevic, 1953).

En 1983, se considera que la gentamicina es el mejor antibiótico para mezclar con el yeso, al no alterarse sus propiedades (Varlet y Dauchy, 1983). Sin embargo, no fue hasta la década de los noventa cuando se empieza a

estudiar *in vitro* e *in vivo* y comprobar la capacidad de las sales de calcio como transportadoras de antibióticos y a la vez, sustitutas del tejido óseo.

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 conjuntamente 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 de ratas, fue más lenta 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.

Se ha estudiado también, *in vivo* e *in vitro*, la liberación de antibióticos (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 (Thomazeau y Langlais, 1996). Estos autores incorporan el antibiótico por inmersión en una disolución del mismo 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. La incorporación aumenta directamente con la porosidad mientras que la velocidad de cesión es inversamente proporcional a este parámetro. Estos resultados indicaron que es necesario una porosidad

mínima para que el antibiótico penetre en el implante pues si ésta no es suficiente el antibiótico queda solamente adsorbido en su superficie siendo rápidamente cedido al medio. Aunque el sistema que resultó más eficaz fue el paralelepípedo con una porosidad del 40%, los autores indican que, quizás, en clínica sea más útil la forma esférica.

Posteriormente este mismo grupo (Lambotte et al., 1998) valoran las esferas de tricálcico con gentamicina (3-4 mm y 45% de porosidad) en una osteomielitis provocada en la metáfisis superior de la tibia de conejos, obteniendo la liberación total del antibiótico al segundo día aunque el antibiótico permanece en el compartimento intraóseo durante diez días.

Paralelamente se han estudiado otros fosfatos, como hidroxiapatita. Así, Shinto et al. (1992) estudian el comportamiento de bloques de cerámica de hidroxiapatita cálcica, como sistema de liberación controlada de antibióticos, en concreto de sulfato de gentamicina, cefoperazona sódica y flomoxef sódico. Preparan bloques de hidroxiapatita con una porosidad del 30-40% (microporos de 40 a 150  $\mu\text{m}$ ) y en un reservorio central se deposita el antibiótico en polvo. Los estudios *in vitro* mostraron un perfil de cesión caracterizado por una liberación inicial elevada seguida de una segunda fase más lenta para los tres antibióticos. Los ensayos *in vivo* fueron llevados a cabo con los cilindros de gentamicina, pues es éste el antibiótico que presentó una liberación más prolongada *in vitro*. El perfil de cesión *in vivo* es similar al *in vitro* si bien hay que indicar, que en los ensayos *in vitro* la dosis de gentamicina fue de 75 mg mientras que los bloques implantados en tibia de rata fueron de 5 mg y precisamente el contenido de fármaco es uno de los factores que podrían controlar la cesión desde este tipo de sistemas. De cualquier forma los niveles detectados en hueso fueron superiores a las concentraciones mínimas inhibitorias para *S. aureus* durante aproximadamente 90 días. Los estudios histológicos indicaron que la

regeneración ósea se acelera debido a la ocupación de los poros del implante por tejido óseo.

Korkusuz et al. (1993), realizan un estudio similar y también encuentran una respuesta terapéutica eficaz tanto desde el punto de vista radiológico, como histopatológico y antiinfeccioso.

Sistemas similares, bloques de hidroxapatita cargados con un aminoglucósido (arbakacina) por un método de centrifugación, fueron valorados en osteomielitis experimentales producidas en tibia de ratas (Itokazu et al., 1997). Los resultados indicaron una evolución radiológica e histológica satisfactoria y, con respecto a la infección, también se apreció que el grupo tratado con los implantes de arbakacina presentaba menores niveles de bacterias que los tratados con antibiótico vía subcutánea. Aunque estos autores no determinaron las concentraciones de antiinfeccioso en el foco de infección, con lo que no se puede establecer una relación entre eficacia y concentración en el hueso, si señalan que los niveles en suero son bajos sin riesgo de efectos secundarios.

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.

Dentro de este grupo de estudios con hidroxapatita comentaremos el trabajo realizado por Yaylaoglu et al. (1999) en el que emplean membranas o películas constituidas por mezclas de fosfato cálcico con gelatina, intentando imitar la composición del tejido óseo. El sistema comprende una fase orgánica (gelatina) y una fase mineral, un fosfato cálcico tipo hidroxapatita, con una cierta dosis de gentamicina. La cinética de cesión de la gentamicina tanto *in vitro* como *in vivo*, se caracteriza por una liberación rápida inicial seguida de una cinética de orden uno, si bien la cesión *in vivo* presenta una velocidad

más elevada que *in vitro*. Los autores señalan que estas diferencias podrían ser debidas a una más intensa degradación *in vivo*. Estos implantes además, permiten la formación de hueso nuevo ya que histológicamente observan la penetración de tejido conectivo en la matriz; indican también que se aprecia una moderada reacción a cuerpo extraño, particularmente a la gelatina.

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 si 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).

Otra de las cerámicas que se ha investigado es el sulfato de calcio; sin embargo, hemos de señalar el reducido número de artículos publicados con este material. El sulfato de calcio se ha empleado como sustitutivo óseo en cirugía oral durante más de 30 años, pero en cirugía ortopédica fue reintroducido en 1996 y sólo existe un número limitado de estudios preclínicos sobre su forma de actuación en el hueso. Esta escasez de estudios se refleja también en el uso de este material como posible portador de antibióticos. Algunos autores han utilizado el sulfato cálcico para la preparación de implantes con gentamicina, estudiando, en animales de experimentación (conejos), los siguientes parámetros: controles bioquímicos, radiográficos e histológicos (Morales de Cano et al., 1995), hasta la reabsorción completa del

implante y regeneración ósea de la cavidad. Sin embargo, no se determinan los niveles de antibiótico en hueso a lo largo del ensayo; no se estudia por tanto, si este sistema puede ser eficaz para el tratamiento de la infección ósea.

Con lo expuesto anteriormente queda claro que es en la última década cuando más se ha trabajado en la utilización de las sales de calcio para que actúen como transportadoras de antibióticos, así como sustitutas del tejido óseo. Pero además de la biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para iniciar o estimular la osteogénesis (Yaylaoglu et al. 1998), el biomaterial ideal para sustituir al hueso debería tener unas propiedades mecánicas similar a él.

Si bien una serie de materiales, como polímeros, cerámicas e incluso metales, reúnen propiedades mecánicas parecidas al hueso, sólo un pequeño grupo consigue además, ser biocompatible y biodegradable. Este pequeño grupo está constituido por biopolímeros, como la gelatina y el colágeno, algunos polímeros sintéticos, como el poliláctico, poliglicólico y sus copolímeros, y minerales.

#### • Polímeros

Con respecto a los polímeros sintéticos, son dos de sus propiedades las que les hacen ser útiles como sustitutos óseos y transportadores de antibióticos:

- a) Su biodegradabilidad, por medios enzimáticos o celulares, así como por hidrólisis química.
- b) Su gran versatilidad en su estructura y composición.

## 1.- Polímeros como sustitutivos óseos

En este campo se han empleado tanto polímeros naturales como polímeros sintéticos; dentro de los primeros el más empleado ha sido el colágeno, sin embargo nosotros nos centraremos en los 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.

Otros polímeros que también se han estudiado en este sentido son los copolímeros del óxido de polietileno/tereftalato de polibutileno (PEO/PBT) y de polidioxanona con glicolida. Los primeros se han empleado para la elaboración de implantes porosos cilíndricos, observando que a las tres, seis, nueve, doce y veinticuatro semanas, tras su implantación en fémur de cabras, se produce un cierto crecimiento de tejido óseo, que se inicia en los poros del implante (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.

Centrándonos en los poli (alfa-hidroxiésteres), hemos de indicar que se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* su biocompatibilidad y su cierta capacidad osteoinductiva. 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.

Citaremos en primer lugar, el trabajo realizado por Vasenius et al. (1990) orientado fundamentalmente a la evaluación de la biocompatibilidad y velocidad de reabsorción de finos cilindros o agujas de PGA, material rápidamente degradado, recubiertos con otros polímeros con el fin de retrasar su biodegradación. Las agujas de PGA recubiertas con n-butil-2-cianoacrilato, polidioxanona (PDS), poli-beta-hidroxibutirato (PHBA) y ácido poli (L-láctico) (PLLA) se ensayan para la fijación de osteotomías en el tercio distal del fémur de conejos, no presentándose ningún problema de consolidación cuando se utilizan las agujas recubiertas de PLLA y PDS.

Entre los estudios orientados a probar la capacidad de osteogénesis de estos materiales, destacamos la publicación de Freed et al. (1993) que cultivan condrocitos sobre soportes de PLLA y PGA observando un aumento de la producción celular en ambos casos. Estos condrocitos cultivados *in vitro*, sobre el soporte de polímero, son implantados subcutáneamente en ratones observándose la formación de neocartilagos. Estos autores, señalan que tanto la porosidad como la geometría del soporte son factores a tener en cuenta para la optimización de su capacidad osteoinductiva. Chu et al. (1995) también emplean estos polímeros como soporte de células óseas que posteriormente son utilizados como relleno de defectos osteocondriales practicados en fémur de conejos, observando también crecimiento de tejido cartilaginoso reparador. Por otro lado, con el fin de buscar el fundamento de esta capacidad osteoregeneradora que presentan estos polímeros, Otto et al. (1996) observan que en cultivos celulares óseos en contacto con hilos de PLLA, la proliferación y diferenciación de células ósea *in vitro* puede ser modulada por la presencia del polímero, dependiendo de su grado de diferenciación, lo que apoya el uso de estos materiales como inductores de la formación de hueso nuevo *in vivo*.

Así mismo se han utilizado hilos de PLGA para rellenar defectos corticales en la tibia de conejos, obteniéndose una respuesta que fundamentalmente consistía en una neoformación vascular y crecimiento óseo (Winet et al., 1995). Entre otros sistemas elaborados con estos polímeros biodegradables tenemos membranas de PGA fabricadas por compresión rápida a elevada temperatura, que han sido diseñadas para el tratamiento de lesiones corticales óseas (Ashammakhi et al., 1995). Los estudios se llevaron a cabo colocando las membranas alrededor de la diáfisis femoral bien en el periostio o directamente en el hueso de ratas tras resección del periostio. Los resultados indicaron que las membranas fueron bien toleradas por la corteza ósea y estimulan la formación de hueso nuevo siendo totalmente reabsorbidas en 30 semanas, independientemente de su colocación en periostio o en el hueso.

También se han estudiado implantes cilíndricos de PLGA de distinta composición (García et al., 1996); el objetivo de este trabajo fue el seguimiento de la biodegradación y sustitución por tejido óseo de los sistemas implantados en hueso de ratas adultas. Los resultados mostraron una formación osteoide alrededor del implante, que va ocupando el espacio que se forma como consecuencia de la degradación del polímero y posteriormente se transforma en hueso maduro normal.

Como vemos, son varias las estructuras geométricas que se han empleado para inducir la reparación ósea con poliláctico y sus copolímeros. Thomson et al. (1995) emplean PLGA 50:50 para elaborar una espuma que actúa como soporte para inducir el crecimiento celular. La espuma consiste en una matriz de PLGA conteniendo microesferas de gelatina cuya proporción determina la porosidad del material. Se estudia el comportamiento de este sistema tanto *in vivo* como *in vitro* y los resultados pusieron de manifiesto que sus propiedades mecánicas dependen del peso molecular y 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.

Las propiedades mecánicas del PLA se han aprovechado para la fabricación de placas y tornillos, para su utilización en el tratamiento de fracturas (Losken et al. 1994). Ello supone grandes ventajas sobre los mismos implantes fabricados con metales, pues proporcionan la misma rigidez en la fijación durante el tiempo necesario para la consolidación ósea y, al ser biodegradables, no precisan una segunda intervención para su extracción. El uso de agujas de ácido poliláctico en Cirugía Ortopédica es frecuente. Estas agujas de poliláctico se han utilizado para fijaciones de artrodesis metacarpofalángicas del primer dedo de la mano (Voche et al., 1995), demostrándose que la reabsorción del polímero se inicia a las cuatro semanas de su colocación, y que su degradación puede prolongarse hasta tres años. Así, se han empleado agujas y tornillos de PGA para el tratamiento quirúrgico de fracturas de tobillo (Springer et al., 1998). Igualmente, se utilizan tornillos interferenciales de PLA para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior, con tendón patelar, obteniéndose los mismos resultados que con los tornillos metálicos (Abate et al., 1998).

También con un copolímero PLGA (85:15), se han fabricado anclajes para la sutura del manguito de los rotadores, en perros, obteniéndose neoformación ósea rodeando al implante a las seis semanas de su colocación, con una mínima respuesta inflamatoria (Balch et al., 1999). Con el mismo propósito, se utilizan botones de PLLA para la reparación quirúrgica de las inestabilidades glenohumerales, obteniéndose una aceptable fijación sin recidiva de la lesión (Yoneda et al., 1996).

Por último, hemos de indicar que estos materiales se han estudiado también como vehículos para proporcionar proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en defectos óseos importantes. La capacidad osteoinductiva de estos polímeros se potencia con esta asociación. Así, se han empleado implantes

microporosos de PLGA 50:50 como sistemas de liberación de BMPs en retardos de consolidación ó pseudoartrosis de fracturas (Agrawal et al., 1995). También se han estudiado discos de PLGA conteniendo BMPs para la reconstrucción de defectos practicados en cráneos de ratas, observando radiológica e histológicamente su evolución, obteniéndose una completa reparación del defecto en cuatro semanas (Miki e Imai, 1996). En la actualidad, esta es una línea de investigación que avanza rápidamente debido fundamentalmente a que se ha conseguido aislar y purificar las distintas BMPs así como su obtención por síntesis recombinante (Lee et al., 1994, Zegzula et al., 1997, Geesink et al., 1999).

Parece pues que el uso de polímeros como sustitutos del tejido óseo e inductores de la osteogénesis 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.

## **2.- Polímeros como vehículos de antibióticos**

El uso de materiales biodegradables presenta grandes ventajas, con respecto a otros tipos de soportes, fundamentalmente por las siguientes razones (Calhoun y Mader, 1997):

- Proporcionan concentraciones bactericidas del antibiótico durante el tiempo necesario para tratar la infección ósea.
- La gran variabilidad en la cinética de biodegradación, dependiendo del tipo y características del polímero (desde unas pocas horas hasta años), puede ser útil para el tratamiento de diferentes tipos de infecciones.
- No es necesario una segunda intervención para extraer el material implantado.

- El largo periodo de biodegradación permite que a medida que se degrada el polímero, el tejido óseo vaya invadiendo el espacio libre y se rellene el defecto con nueva formación ósea.

### **Poliláctico y sus copolímeros**

Por los motivos comentados anteriormente, 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. Uno de los primeros trabajos publicados con este fin fue el de Wei et al. (1991) que elaboran implantes de PLA con dideoxikanamicina B para ser implantados en fémur de conejos. Las concentraciones de antibiótico en cortical, en esponjosa y en médula ósea son superiores a las mínimas inhibitorias para los microorganismos que más frecuentemente producen infecciones ósea. Además, los autores señalan que el material es osteocompatible y al cabo de 9 semanas prácticamente ha desaparecido.

Perteneciente también al grupo de aminoglucósidos, uno de los antibióticos sobre el que más se ha investigado para el tratamiento de osteomielitis es la gentamicina. Si bien, las publicaciones con polímeros biodegradables *in vivo* son mucho más escasas que con cerámicas. Uno de estos trabajos se realiza en perros a los que se les ha producido una infección por *S.aureus* en la tibia para evaluar la eficacia de implantes de PLGA con gentamicina frente a la administración parenteral y a los implantes de polimetilmetacrilato (PMMA). Los autores concluyen que los implantes de PLGA son más eficaces, si bien no hay diferencias significativas con el grupo de animales tratados con PMMA-gentamicina (Garvin et al., 1994).

Dentro de los trabajos *in vivo*, comentaremos también el realizado por Schmidt et al. (1995), que elaboran dos tipos de implantes por compresión, unos con L-PLA y otros con mezcla de PLGA y dl-PLA, conteniendo un 10% de gentamicina. Los ensayos de cesión *in vitro* se comparan con las perlas de

PMMA comerciales y las formulaciones de polímero elaboradas son ensayadas también *in vivo* para demostrar su biocompatibilidad en tejido subcutáneo. Los autores concluyen que estos sistemas son unos buenos candidatos para la administración de antibióticos *in situ* en infecciones óseas.

Se ha comparado también, la cinética de cesión *in vitro* de gentamicina desde perlas biodegradables elaboradas con microesferas de PLA, con respecto a las perlas de PMMA con el mismo antibiótico. Las microesferas son preparadas empleando el método de fluidos supercríticos, que es la novedad de este estudio. El porcentaje máximo de gentamicina cedido desde las perlas de PMMA fue de un 10% en 8 semanas, no lográndose la liberación completa del fármaco, mientras que las de PLA-gentamicina liberan un 60% de la dosis en 4 meses. Los autores concluyen que las perlas de PLA son mejores que las de PMMA y podrían emplearse como sistemas de cesión de antibióticos para el tratamiento de la osteomielitis ya que presentan una cinética de cesión más adecuada, son biodegradables, soportan bien la esterilización por gases, pueden emplearse para un amplio número de antibióticos y pueden manipularse sin desintegrarse (Meyer et al., 1998). Soriano y Évora (2000) también comparan la cinética de cesión *in vitro* de gentamicina desde implantes elaborados con mezclas de fosfatos cálcicos y PLA, recubiertos con polímeros (PLA y PLGA), frente a las perlas de PMMA. Los resultados pusieron de manifiesto la importancia de la porosidad del sistema, y de la cinética de degradación de los polímeros, 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 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, resultados que, como vemos, no coinciden con los aportados por Meyer et al. (1998).

Recientemente se han estudiado 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.

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. Implantes elaborados con PGA como vehículos de ciprofloxacino fueron estudiados *in vivo* para comprobar la penetración del antibiótico en hueso, tras su inserción en el tercio proximal 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 las 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 se obtiene una buena penetración del fármaco y que los niveles de antibiótico pueden ser suficientes para erradicar una infección (Overbeck et al., 1995).

Posteriormente, Ramchandani y Robinson (1998) elaboran implantes por compresión de microesferas de PLGA con ciprofloxacino preparadas por 2 métodos distintos (con y sin disolventes orgánicos) y caracterizan la cesión del antibiótico *in vitro*, indicando que la cesión es bifásica y más lenta con las microesferas elaboradas sin disolvente orgánico. Los implantes elaborados con estas microesferas son ensayados *in vivo*, también en fémur de conejos, y encuentran que se mantienen concentraciones superiores a las mínimas inhibitorias durante un periodo de seis semanas a lo largo de 70 mm.

Otro antibiótico, de este mismo grupo, que ha sido ensayado para comprobar su eficacia en infecciones óseas es el ofloxacino incluido en una matriz de PLGA. En concreto, se llevó a cabo un estudio *in vivo* para valorar su eficacia en osteomielitis inducidas por *Pseudomonas aeruginosa* en el fémur de conejos, a los que se les hizo un seguimiento radiológico y estudio histopatológico, sugiriéndose que dicho polímero es un excelente vehículo para obtener concentraciones altas de antibiótico en el lugar de infección. Según señalan los autores, los resultados obtenidos fueron significativamente mejores que con el tratamiento antiinfeccioso por vía sistémica (Nie et al., 1998). Este mismo grupo de investigación (Nicolau et al., 1998) demuestra también la capacidad preventiva de estos implantes frente a la osteomielitis hematógena inducida en conejos.

Recientemente 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. Estos autores estudian 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 del antibiótico *in vitro*. El rendimiento de encapsulación se encuentra afectado por el volumen de fase interna mientras que la concentración de PVA no altera este parámetro; sin embargo, la cinética de cesión puede verse modificada por cualquiera de las variables estudiadas. Los autores concluyen 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 2kD 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 óseas; 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*.

Terminaremos este apartado comentando los resultados obtenidos por algunos autores con otros grupos de 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 cinética de cesión *in vitro* se caracteriza por una cesión inicial adecuada, de aproximadamente menos de un 5% de la dosis en los tres primeros días que continúa a lo largo de tres a seis semanas según la composición del sistema (Nakamura et al., 1995).

La eficacia de implantes de PLA (2kD, 5%) y PLGA (70:30, 95%) con Vancomicina para el tratamiento de osteomielitis provocada con *Staphylococcus aureus* en tibia de conejos, fue evaluada *in vitro* e *in vivo*. Los autores caracterizan la cinética de cesión *in vitro* mientras que *in vivo* valoran la evolución de la infección provocada dividiendo los animales en diferentes grupos según el tratamiento que recibían. Se comprobó que en el grupo de animales que fueron tratados con desbridamiento quirúrgico e implantes con antibiótico, la disminución del número de colonias fue significativamente

mayor que en los grupos no tratados o tratados mediante terapias antiinfecciosas convencionales (Calhoun y Mader, 1997).

### **Otros polímeros empleados como vehículos de antibióticos**

La gentamicina ha sido también empleada en implantes elaborados con polianhidridas (bis-carboxifenoxipropano y ácido sebaico 50:50) como sistemas de cesión del antibiótico en hueso infectado (Laurencin et al., 1993). El estudio se lleva a cabo en ratas a las que se les ha provocado una infección en tibia con *S.aureus* y se compara la eficacia de polianhidrida-gentamicina frente a implantes de PMMA-gentamicina e implantes blancos de ambos polímeros. 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.

Un tipo de polímero que recientemente se ha presentado, como alternativa al poliláctico y sus copolímeros, son los polihidroxiálcanoatos (Yagmurlu et al., 1999) para la preparación de sistemas de cesión de antibióticos *in situ*. En concreto, implantes de polihidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato (PHBV) conteniendo sulbactam-cefoperazona (Sulperazona) para el tratamiento de osteomielitis. Estos sistemas resultaron eficaces para tratar la infección provocada con *S. aureus* en tibia de conejos comprobándose que a las 4 semanas no se detectan colonias de bacterias en ningún animal. Además, demuestran que el material es totalmente biocompatible e incluso señalan que es un material más adecuado que el PLGA.

## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Como se desprende de los comentarios previos, algunas de las publicaciones se centran fundamentalmente en la evaluación de estos sistemas directamente *in vivo*, sin un previo análisis de las variables que van a condicionar la cinética de cesión del antibiótico y por tanto, la eficacia terapéutica del sistema. De hecho son sólo unas pocas publicaciones más recientes las que están orientadas a la caracterización *in vitro* de los sistemas pero carecen de su valoración *in vivo*.

Nuestro objetivo es la elaboración de un sistema biodegradable y osteointegrable de cesión sostenida de gentamicina para el tratamiento de la osteomielitis, con el doble propósito de reemplazar el tejido óseo resecaado y proporcionar niveles adecuados del antibiótico para erradicar la infección.

Las etapas a cubrir son:

1<sup>a</sup>.- Elaboración de implantes de gentamicina a partir de mezcla de fosfatos y PLA :

- a) Caracterización *in vitro*
- b) Caracterización tras su inserción en fémur de rata
- c) Estudio de la correlación *in vitro* – *in vivo*.

2<sup>a</sup>.- Adaptación de los implantes para su administración en conejos:

- a) Caracterización *in vitro* y selección de la formulación para ser ensayada *in vivo*.
- b) Caracterización tras su inserción en fémur de conejo
- c) Estudio de la correlación *in vitro* – *in vivo*.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **MATERIALES**

Los productos utilizados en la elaboración de los implantes fueron: hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (HAP), fosfato tricálcico,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (FTC) cedido gratuitamente por Traiber S.A., polímeros biodegradables, ácido DL-poliláctico (DL-PLA-30, Resomer® R203), ácido DL-poliláctico (DL-PLA-200, Resomer® R207) y ácido poli-DL-láctico-co-glicólico (PLGA, Resomer® RG506) de Boehringer Ingelheim KG y sulfato de gentamicina (SG) donado gratuitamente por Laboratorios Normon S.A.

## **CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS**

### **Análisis granulométrico de los fosfatos**

El diámetro medio y la distribución de tamaño de los fosfatos empleados en la elaboración de los implante, HAP y FTC, se realizó por difracción de luz láser utilizando un equipo Coulter®- LS 100. Se prepara para ello una suspensión diluida del polvo en agua destilada conteniendo Tween-80 al 0,001% 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.

### **Caracterización de los polímeros**

#### **a) Determinación de su peso molecular medio y polidispersividad:**

Los polímeros empleados en la elaboración de los implantes fueron suministrados por Boehringer Ingelheim: ácido DL-poliláctico (Resomer® R203), ácido DL-poliláctico (Resomer® R207) y ácido poli-DL-láctico-co-

glicólico (Resomer® RG506) con una viscosidad intrínseca declarada de 0,3, 1,5 y 0,8 dl/g respectivamente. Antes de su utilización se analizaron 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 determinaron sus pesos moleculares medios 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 µm) y desgasificado
- Flujo: 0,9 ml/min
- Tiempo de análisis: 50 min.
- Volumen de inyección: 25 µl (patrones y muestras)
- Concentración: 0,04% (p/v) patrones y 0,5% (p/v) muestras a analizar en THF.

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

b) Determinación de la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>):

Los polímeros fueron analizados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para su caracterización térmica. Se obtuvieron los termogramas correspondientes 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.

Las condiciones del análisis fueron:

Temperatura inicial: 30°C

Temperatura final: 200°C

Velocidad de calentamiento: 10°C/min

Caudal de nitrógeno: 100 ml/min

Resolución: < 7 μ W

c) Estructura cristalina:

Las muestras de fosfatos y polímeros fueron analizadas por difracción de rayos X a temperatura ambiente con un difractómetro de polvo (Philips XPER'T), 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  $0,04^\circ$  y un tiempo por paso de 0,5 s.

## **PREPARACIÓN DE LOS IMPLANTES**

Los implantes fueron preparados por compresión de un granulado siguiendo el método que se describe a continuación (Soriano y Évora, 2000).

- Preparación del granulado: para la obtención del granulado, se elabora en primer lugar una emulsión homogeneizando una disolución acuosa de SG con una disolución del polímero en diclorometano (DCM). La emulsión se prepara con un sonicador a una potencia de 42 vatios (output 4) (Sonicator® XL 2020) durante 5 minutos en un baño de hielo. Por otro

lado se prepara una pasta de fosfatos, HAP (25%) y FTC (75%), mezclándolos con volumen de agua igual al peso de la mezcla de fosfatos. La emulsión se vierte sobre la pasta de fosfatos, se mezcla y se seca durante 2 horas a 60°C. posteriormente se granula con un tamiz de 1,6 mm de luz de malla y se deja secar durante una noche a 40°C.

- Elaboración de los implantes: los implantes fueron preparados por compresión de 500 ó 1000 mg del granulado previamente seco utilizando un punzón de 12 mm usando una prensa hidráulica (Carver) a temperatura ambiente. Posteriormente los implantes de 500 mg fueron cortados en paralelepípedos de 6 x 2,5 x 1 mm y los de 1g en paralelepípedos de 10 x 4 x 5 mm.

Algunos de los implantes estudiados en este trabajo se recubrieron con una cubierta de polímero, en concreto con PLA-200 o PLGA-100. Para ello los implantes fueron sumergidos en una disolución al 10% p/v del polímero en diclorometano. Los implantes recubiertos permanecen 48 horas a temperatura ambiente, de esta forma se evapora el disolvente y se endurece la cubierta.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Las formulaciones destinadas a su implantación en hueso de conejo fueron elaboradas de acuerdo con un diseño experimental empleando la técnica de las matrices de Hadamard (Heydat y Wallis, 1978). Este método permite estudiar la influencia de ciertos factores sobre el proceso que nos interesa optimizar con el menor número posible de experimentos. En nuestro caso se aplicó este diseño con el objetivo de elegir la formulación óptima en cuando a velocidad de cesión de la gentamicina. Las matrices de Hadamard están formadas por n filas y n columnas, tomando valores de 1 y -1 todos sus

términos y siendo el producto de ella misma por su traspuesta igual al producto de n por la matriz unidad:

$$H \cdot H^{-1} = n \cdot I \quad (\text{ec. 1})$$

Una de las limitaciones de este tipo de matrices, que ha de tenerse en cuenta a la hora de su aplicación en diseños experimentales, es que el número de filas y columnas debe ser igual a 2 o a un múltiplo de 4. En nuestro caso, con el fin de optimizar la velocidad de cesión de las formulaciones elaboradas, se consideran tres factores:

$$Y = f(X_1, X_2, X_3) + e \quad (\text{ec. 2})$$

porcentaje de gentamicina ( $X_1$ ), peso molecular del poliláctico empleado ( $X_2$ ) y recubrimiento de polímero ( $X_3$ ), de los que se supone, depende la velocidad de cesión.

## **ENSAYOS *IN VITRO***

### **Método analítico. Determinación de GS *in vitro***

El método analítico usado para la determinación de gentamicina *in vitro*, fue el descrito por Zhang et al. (1994). El método se basa en la determinación del SG por espectrofotometría tras la derivatización con reactivo de o-naftaldialdehído (Sigma). El procedimiento de análisis consiste en añadir a 1 ml de muestra, 1 ml de alcohol isopropílico (Panreac) y 1 ml de disolución de reactivo de o-naftaldialdehído, se agita y se deja en reposo 45 minutos a temperatura ambiente. La concentración se determina por espectrofotometría UV a 334 nm frente a un blanco de agua destilada sometido al mismo proceso que las muestras a analizar.

### **Determinación del contenido de SG en los implantes**

El ensayo de uniformidad en contenido de gentamicina se llevó a cabo tomando 3 muestras de 25 mg de cada lote de granulado a las que se les añadió 1 ml de diclorometano para disolver el polímero y 5 ml de agua destilada para extraer la gentamicina, este último paso fue realizado por cuadruplicado. Alícuotas de los extractos acuosos fueron filtradas a través de filtros Gelman GHP Acrodisc de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y 1 ml de las mismas fue analizado por el método espectrofotométrico descrito en el apartado anterior. La eficiencia de contenido fue calculada como porcentaje de SG en el granulado con respecto a la cantidad inicial empleada en la elaboración de los mismos.

El método de extracción fue previamente validado con 5 mezclas diferentes de los componentes y una cantidad conocida de SG, con una eficiencia del  $99 \pm 2\%$ .

### **Ensayo 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. El sistema se mantuvo a 37°C con agitación horizontal a 80 rpm.

Los ensayos se realizaron por triplicado para cada formulación, en matraces Erlenmeyer. A tiempos previamente establecidos se tomaron alícuotas de 1 ml de medio para determinar la gentamicina cedida, previa filtración, por el método espectrofotométrico anteriormente descrito. El volumen extraído fue repuesto con 1 ml de medio de cesión fresco, manteniendo siempre las condiciones sumidero.

### **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. 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:

$$\text{Captación de agua (\%)} = ((\text{peso húmedo} - \text{peso final}) / \text{peso final}) \times 100$$

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = ((\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}) \times 100$$

### **Caracterización de la estructura microporosa**

La estructura y porosidad de los granulados y de las distintas formulaciones fueron determinadas por porosimetría de mercurio y microscopía electrónica de barrido (SEM).

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

La porosidad de los granulados y 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 3 cm<sup>3</sup> de volumen
- Volumen aproximado ocupado por la muestra: 30%
- Intervalo de presiones de trabajo: 0,6 - 25000 psi
- Replicados: 3

### **Microscopía electrónica de barrido**

Esta técnica fue usada para la caracterización morfológica de los granulados y para 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.

### **Estudios de degradación *in vitro* de los implantes**

Los ensayos de degradación *in vitro* fueron llevados a cabo en las mismas condiciones que los estudios de cesión. A los tiempos preestablecidos, los implantes fueron retirados del medio de cesión y una vez eliminado el exceso de agua, son mantenidos en un desecador con pentóxido de fósforo durante 7 días. Los implantes secos son almacenados en frascos herméticamente cerrados con silicagel (Merck), en nevera a 4°C .

En estos ensayos se evaluó tanto la degradación de los materiales empleados en la elaboración de los implantes como su evolución estructural a lo largo del tiempo.

El seguimiento de la degradación de los polímeros 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. Se utilizaron dos técnicas: la GPC para la determinación de los pesos moleculares y la DSC para las Tg.

- 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 de la matriz. Para estudiar la degradación del polímero recubridor, las cubiertas fueron retiradas por escisión y disueltas en THF. 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 tanto los polímeros como los fosfatos fueron analizados por calorimetría diferencial de barrido a lo largo del ensayo de cesión *in vitro* para determinar posibles cambios en la temperatura de transición vítrea de los mismos, 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. Las cubiertas fueron finamente divididas antes de su análisis.

## **ENSAYOS *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 dos especies de animales de experimentación: ratas y conejos.

Se emplearon 108 ratas macho Wistar, de un peso que oscilaba entre 250 y 280 gramos.

Los conejos machos fueron de la raza Neozelandesa albino con peso 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, realizamos un abordaje de unos centímetros (entre 1,5 y 2 cm en ratas y 2,5 cm en conejos),

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 dental de 1,2 mm para las ratas o con una fresa Shanon Burr de 6 mm, para los conejos, 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 se introduce en la cavidad así creada el implante (Figura 4), previamente pesado.

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, en el caso de las ratas se administra por vía subcutánea un analgésico postoperatorio, metamizol (60 mg/kg). En el caso de los conejos, éstos reciben cada 8-12 horas una dosis de buprenorfina de 25 µg/kg, durante las 36 primeras horas del periodo postoperatorio.



**Figura 1.-**Incisión paratibialiana 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.**

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.

Durante los cuatro primeros días del postoperatorio se aplica Povidona yodada a la herida operatoria y se controla el estado general de animal.

### **Protocolo de muestreo**

Se estudiaron un total de 108 ratas que se dividieron en grupos según el tipo de implante que se les colocaba. El estudio en conejos se llevó a cabo con un solo grupo de 30 animales.

- Muestras óseas: las ratas se subdividieron en grupos de 4 y fueron sacrificadas con una dosis letal de pentobarbital sódico, después de 1 y 3 días y, 1, 2, 3 y 4 semanas. Los conejos (grupos de 5 animales) fueron sacrificados después de 2 días, 1, 2, 4, 6 y 8 semanas, también con una dosis letal de pentobarbital sódico y 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.

De cada subgrupo de 4 o 5 animales, según la especie, se seleccionaba al azar un fémur para su estudio radiológico e histológico, manteniéndose la pieza en una disolución de formaldehído al 10% hasta la realización del mismo. El resto de las muestras, procedentes de los

otros tres o cuatro animales, son congeladas (-20 °C) hasta el momento de su valoración.

- Muestras de riñón: Los dos riñones son extraídos a través de una incisión media abdominal y conservados a -20°C, para la valoración posterior de la gentamicina acumulada en tejido renal.
- Muestras de sangre:
  - a) Ratas: A los tiempos previamente detallados para el sacrificio de los animales, se tomó una muestra de sangre por punción cardiaca.
  - b) Conejos: Las muestras de sangre fueron tomadas cada 48 horas, por punción de la vena marginal de la oreja, a lo largo de los ensayos de cesión.

Las muestras fueron conservadas a -20°C, previa centrifugación, hasta el momento de su valoración.

### **Determinación de gentamicina *in vivo***

La valoración de gentamicina, tanto la remanente en el implante como en las muestras biológicas, fue llevada a cabo empleando el método microbiológico que se describe posteriormente.

### **Tratamiento de muestras.**

- Tratamiento de las muestras óseas de ratas: Una vez extraído el fémur con el implante, se pulveriza todo el hueso y se incuban las muestras, bajo agitación continua, en 5 ml de NaOH (0,1 N) durante una noche, previa homogeneización durante 5 minutos (Silverson®, L4 RT), para extraer la gentamicina remanente.

- Tratamiento de las muestras óseas de conejos: Una vez extraído el fémur con el implante, el hueso es cortado longitudinalmente con una sierra acoplada a un motor eléctrico y, después de retirar el implante, se divide y se corta en cinco secciones: metáfisis distal, tercio diafisario distal, medio y proximal y, metáfisis proximal. Cada una de estas piezas es medida y pesada. Siendo posteriormente pulverizada y tratada con NaOH (0,1 N), para extraer la gentamicina.
- Tratamiento de las muestras de riñón (ratas y conejos): Los riñones son extraídos, según se detalló anteriormente, pesados y cortadas en pequeñas piezas y por último incubados en el medio de extracción.
- Tratamiento de los implantes: para extraer la gentamicina remanente en los implantes, éstos fueron finamente pulverizados y tratados igual que las muestras de hueso y riñón, previa pesada de los mismos.

Tanto las muestras de sangre como los medios de extracción de hueso, riñón e implantes fueron centrifugados y la gentamicina es determinada en el suero y en el sobrenadante respectivamente.

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

Los niveles de gentamicina 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 250µl 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 gentamicina 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.

### **Control de la función renal**

Como control de la función renal se llevó a cabo un seguimiento de la concentración de creatinina en suero 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 normales en cada una de las especies animales, se determinó la concentración sérica de creatinina en un grupo control.

Todas las muestras de sangre extraídas de los animales implantados fueron analizadas para la determinación de la concentración de creatinina en suero.

### **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**



El capítulo de resultados se presentará en tres secciones: la primera corresponde a la caracterización de las materias primas, la segunda dedicada a los resultados obtenidos con los implantes destinados a ratas y la tercera parte recogerá los resultados del estudio en conejos.

## SECCIÓN I: CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS

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

La tabla 2 muestra el diámetro medio en volumen y la distribución de tamaño de partícula de los fosfatos.

Muestra	Media ( $\mu\text{m}$ )	Percentil < ( $\mu\text{m}$ )		
		10 %	50 %	90 %
Hidroxiapatita	$9,3 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,02$	$5,9 \pm 0,1$	$21 \pm 2$
Fosfato tricálcico	$9,5 \pm 1,0$	$2,1 \pm 0,1$	$6,5 \pm 1$	$21 \pm 3$

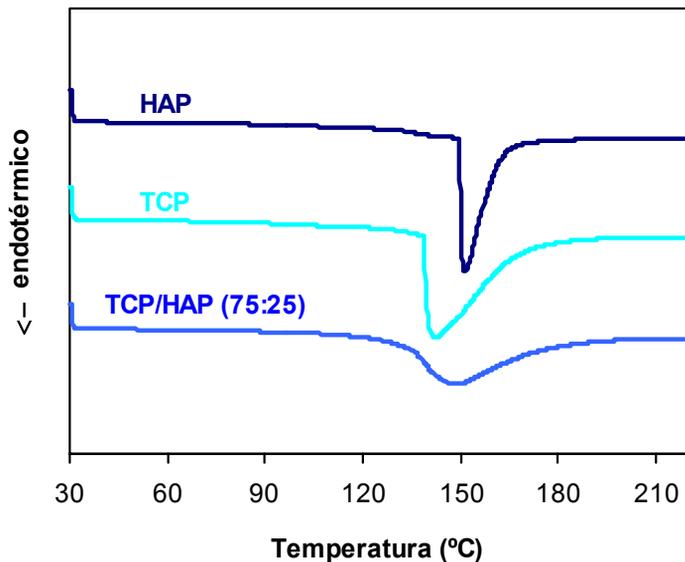
**Tabla 2.-** Diámetros medios en volumen correspondientes a la media y porcentajes acumulados del 10%, 50% y 90% para los fosfatos empleados en la elaboración de los implantes.

Los pesos moleculares medios, polidispersividad, temperatura de transición vítrea y áreas normalizadas de los polímeros utilizados en la preparación de los implantes, se recogen en la tabla 3.

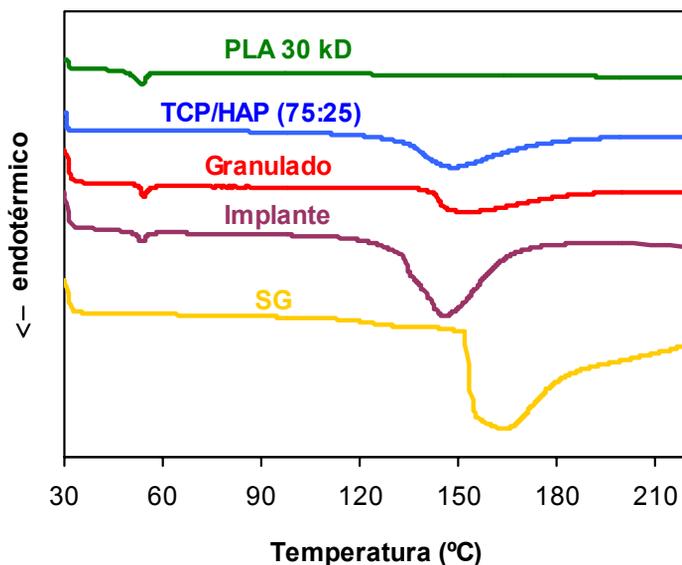
Los termogramas obtenidos por DSC de los fosfatos y su mezcla en la proporción 25:75, utilizada en la elaboración de los implantes se muestra en la figura 7. Los resultados de estos análisis correspondientes al PLA-30, gentamicina y granulado se reflejan en la figura 8.

Polímero	Mw	Mn	pd	Tg (°C)	A (J/g)
dl-PLA-30	28.600	18.650	1,58	53,8	7,67
dl-PLA-200	231.615	135.000	1,77	57,4	6,57
PLGA-100	99.000	63.800	1,55	47	n.d.
HAP				151,5	36,2
FTC				141,9	70,6
HAP/FTC				148	45,9
Gentamicina				164,2	201,8
Granulado				152	25,8

**Tabla 3.-** Propiedades de las materias primas: Mw, peso molecular medio en peso; Mn, peso molecular medio en número; pd, polidispersividad; Tg, temperatura de transición vítrea y A, área normalizada. (n.d., valor no determinado).

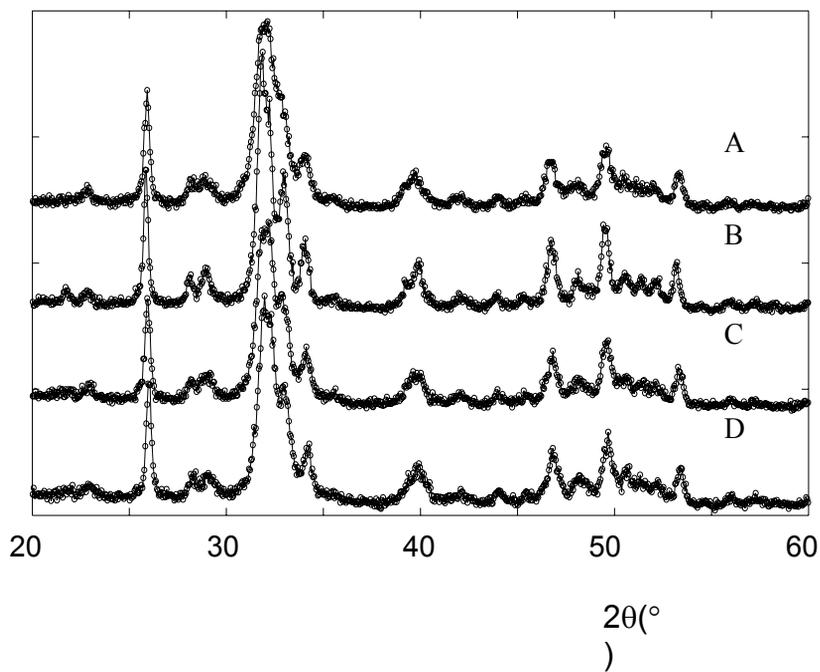


**Figura 7.-** Termogramas correspondientes a la hidroxiapatita, el fosfato tricálcico y la mezcla de ambos en la proporción utilizada.



**Figura 8 .-** Termogramas de los componentes (PLA 30 kD, mezcla de fosfatos, sulfato de gentamicina), del granulado y del implante obtenido por compresión de dicho granulado.

En la figura 9 se muestran los difractogramas de rayos X en polvo de los fosfatos que forman parte de la matriz de los implantes. Como se puede observar, el perfil de difracción de rayos X del fosfato tricálcico es bastante similar al del hidroxiapatita. Los perfiles del granulado y la mezcla física de fosfatos muestran que aquel está compuesto por la mezcla de HAP y FTC. No se detectaron impurezas cristalinas y, debido a la pequeña cantidad de gentamicina y a la forma amorfa del dl-PLA-30, éstos no fueron detectados en la difracción del granulado de mezcla fosfatos/ dl-PLA-30.



**Figura 9.-** Perfil de difracción de rayos X: A, FTC; B, HAP; C, Granulado; D, mezcla física 25% HAP / 75% FTC.

## SECCIÓN II: ESTUDIO EN RATAS

### ELABORACIÓN DE LOS IMPLANTES

Para este primer estudio se elaboró una sola formulación, F-1, obtenida por compresión de 500 mg de granulados aplicando una fuerza de 8 toneladas con un punzón de 12 mm. Los granulados fueron preparados en lotes de 10 g; para ello se prepara una emulsión con 0,5 ml de una disolución acuosa de SG (700 mg/ml) y una disolución de 1,9 g de dl-PLA-30 en 3,8 ml de DCM. Dicha emulsión se mezcla con una pasta de fosfatos (25/75) constituida por 1,9 g de HAP, 5,8 g de FTC y 7,7 ml de agua y se procede según se describió en el apartado Materiales y Métodos. Los implantes de 12 mm son cortados en paralelepípedos de 6 x 2,5 x 1 mm para adaptarlos al tamaño del fémur de rata.

Parte de estos implantes fueron recubiertos con dl-PLA-200, formulación F-1-PLA y con PLGA-100, formulación F-1-PLGA.

En la tabla 4 se recogen las características de los implantes elaborados para su inserción en fémur de rata.

	F-1	F-1-PLA	F-1-PLGA
% SG incorporado	2,66 ± 0,368	2,66 ± 0,368	2,66 ± 0,368
Peso (SR) (mg)	38,6 ± 1,69	48,4 ± 5,08	46,5 ± 4,29
Peso (R) (mg)		56,1 ± 5,60	54,6 ± 3,71
Peso Cubierta (mg)		7,68 ± 1,79	8,11 ± 1,64

**Tabla 4.-** Características de los implantes elaborados para su inserción en fémur de ratas. Pesos medios de los implantes sin recubrir (SR), recubiertos (R) y de las cubiertas.

## ENSAYOS DE CESIÓN *IN VITRO*

En las tablas 5, 6 y 7 se recogen las cantidades de gentamicina cedidas desde los implantes F-1, F-1-PLA y F-1-PLGA, respectivamente, valoradas por espectrofotometría. En las figuras 10, 11 y 12 se representan los correspondientes perfiles de cesión expresados en porcentajes cedidos acumulados.

Tiempo (semanas)	A	B	C	Media	s.d.
0	0	0	0	0	0
0,143	5,91	5,03	5,43	5,46	0.44
0,429	5,9	5,96	5,99	5,93	0.046
1	6,37	5,92	6,58	6,29	0.34
2	6,4	6,21	6,46	6,36	0.13
3	6,6	6,74	6,82	6,72	0.11
4	6,96	6,66	6,98	6,86	0.18
5	7	6,51	7	6,84	0.28

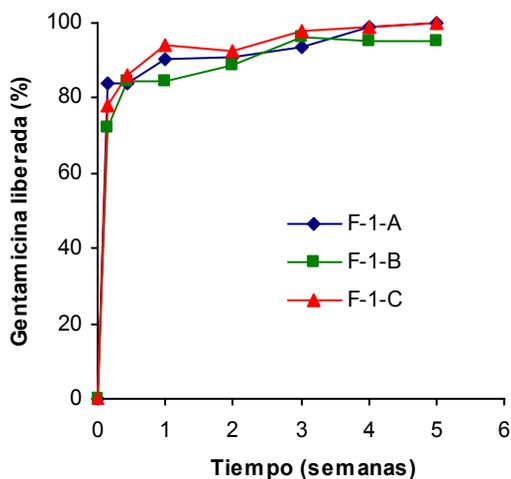
**Tabla 5.-** Cantidad de gentamicina (mg) liberada en los estudios de cesión con la formulación F-1 (7,04, 6,99 y 6,97 mg iniciales de SG), en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% azida sódica.

Tiempo (semanas)	A	B	C	Media	s.d.
0	0	0	0	0	0
0,143	1,65	1,67	1,23	1,52	0.25
0,429	2,23	2,23	1,78	2,08	0.26
1	3,63	3,87	2,93	3,48	0.49
2	4,44	4,54	4,27	4,41	0.14
3	4,94	4,87	5,04	4,93	0.085
4	5,02	4,9	4,92	4,95	0.064

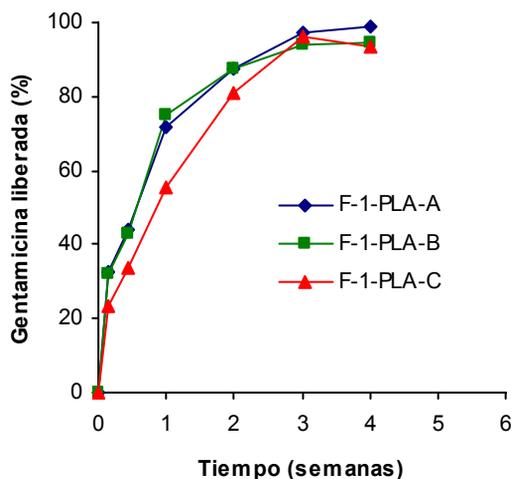
**Tabla 6.-** Cantidad de gentamicina (mg) liberada en los estudios de cesión con la formulación F-1-PLA (5,08, 5,18 y 5,25 mg iniciales de SG), en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% azida sódica.

Tiempo (semanas)	A	B	C	Media	s.d.
0	0	0	0	0	0
0,143	1,7	1,74	1,5	1,65	0.13
0,429	2,47	2,44	2,19	2,36	0.15
1	3,92	3,82	3,54	3,76	0.19
2	4,37	4,1	4,16	4,21	0.14
3	4,44	4,44	4,75	4,54	0.18
4	4,62	4,56	4,83	4,67	0.14

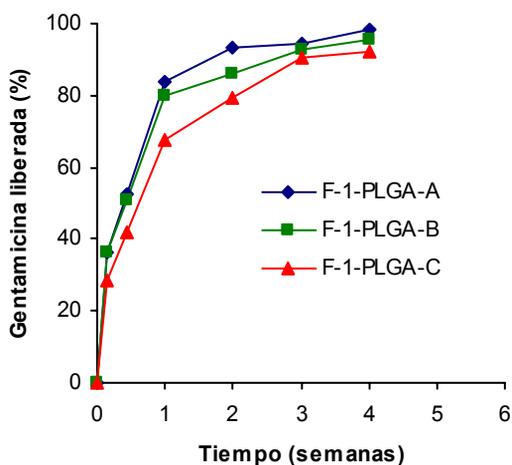
**Tabla 7.-** Cantidad de gentamicina (mg) liberada en los estudios de cesión con la formulación F-1-PLGA (4,69, 4,77 y 5,24 mg iniciales de SG), en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% azida sódica.



**Figura 10.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-1:  $263 \pm 1,26$  mg de implantes ( $6,99 \pm 0,036$  mg SG), en 25 ml de medio de cesión.



**Figura 11.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-1-PLA:  $263 \pm 1,26$  mg de implantes ( $6,99 \pm 0,036$  mg SG), en 25 ml de medio de cesión.



**Figura 12.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-1-PLGA:  $217 \pm 8,79$  mg de implantes ( $4,903 \pm 0,295$  mg SG), en 25 ml de medio de cesión.

## ENSAYOS *IN VIVO*

- **Ensayos de cesión de gentamicina**

Los porcentajes cedidos de SG desde los diferentes implantes, una vez insertados en el fémur de ratas, se muestran en las tablas 8, 9 y 10; su representación gráfica se refleja en las figuras 13, 14 y 15.

Tiempo (semanas)	I	II	III	Media	s.d.
0	0	0	0	0	0
0,143	74,78	72,18	73,03	73,33	1,33
0,429	80,34	81,75	81,86	81,32	0,85
1	97,3	95,28	96,95	96,12	1,18
2	97,81	97,93	97,96	97,9	0,08
3	95,8	95,14	97,67	96,2	1,31
4	97,93	98,85	98,2	98,33	0,47
5	97,33	97,16	97,3	97,23	0,09

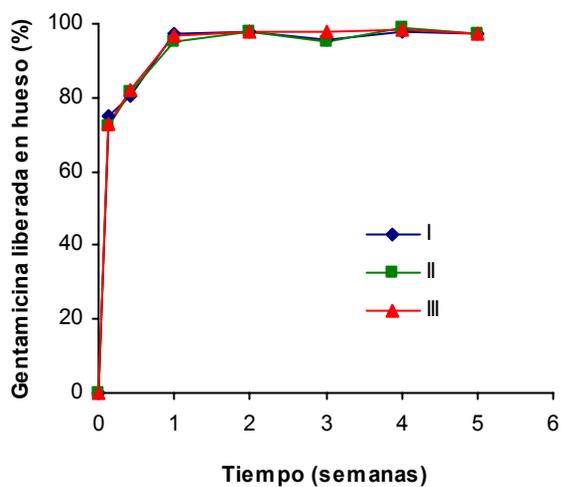
**Tabla 8.-** Porcentajes acumulados de gentamicina liberada en hueso desde la formulación F-1, una vez insertada en el fémur de ratas.

Tiempo (semanas)	I	II	III	Media	s.d.
0	0	0	0	0	0
0,143	11,84	12,16	12,48	12,16	0,45
0,429	42,98	58,05	50,52	50,52	7,53
1	42,6	66,67	83,84	64,37	20,71
2	67,51	85,15	90,83	81,16	12,16
3	88,06	85,58	90,38	88,01	2,4
4	95,23	98,46	97,63	97,11	1,68

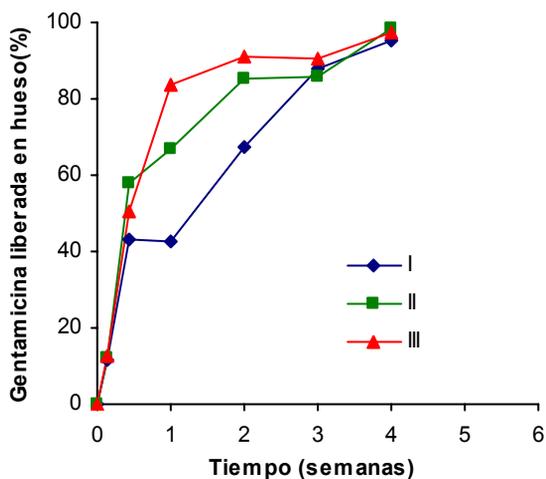
**Tabla 9.-** Porcentajes acumulados de gentamicina liberada en hueso desde la formulación F-1-PLA, una vez insertada en el fémur de ratas.

tiempo (semanas)	I	II	III	Media	s.d.
0	0	0	0	0	0
0,143	11,41	52,5	25,52	29,81	20,88
0,429	48,89	69,61	29,42	49,31	20,11
1	90,79	97,54	96,93	95,09	3,73
2	99,06	96,94	97,53	97,84	1,09
3	99,14	97,81	98,72	98,56	0,68
4	98,89	99,19	97,72	98,61	0,77

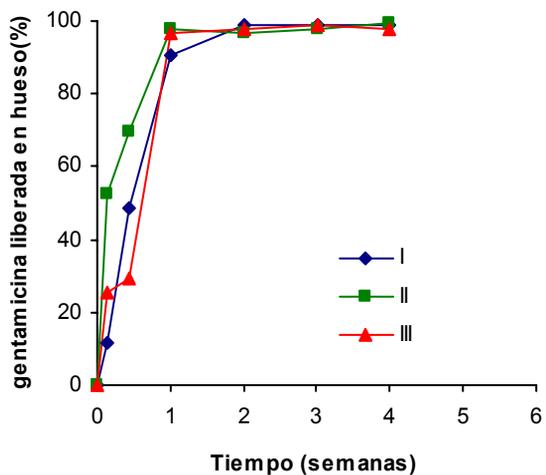
**Tabla 10.-** Porcentajes acumulados de gentamicina liberada en hueso desde la formulación F-1-PLGA, una vez insertada en el fémur de ratas.



**Figura 13.-** Porcentajes acumulados de SG liberada en fémur a partir de la formulación F-1.



**Figura 14.-** Porcentajes acumulados de SG liberada en fémur a partir de la formulación F-1-PLA.



**Figura 15.-** Porcentajes acumulados de SG liberada en fémur a partir de la formulación F-1-PLGA.

- **Gentamicina en suero y riñón**

Los niveles de gentamicina en suero no fueron detectables a lo largo del ensayo.

Las concentraciones de SG alcanzadas en riñón tras la colocación de los implantes, F-1, F-1-PLA y F-1-PLGA se recogen en las tablas 11, 12 y 13 respectivamente. Así mismo, las curvas de niveles renales - tiempo se encuentran representadas en las figuras 16, 17 y 18.

Tiempo (semanas)	I	II	III	IV	Media	s.d.
0,143	29,12	48,51	42,99	30,86	37,87	9,39
0,429	57,51	37,31	63,92	39,95	49,66	13,05
2	9,9	8,8	9,76	11,61	10,02	1,17
4	1,5	3,7	1,8	2,54	2,38	0,98
5	3,67	2,83	3,75	2,93	3,17	0,51
7	0,009	0,006	1,22	0,007	0,311	0,61
10	0,01				0,01	
15	0,2				0,2	
20	0,03				0,03	

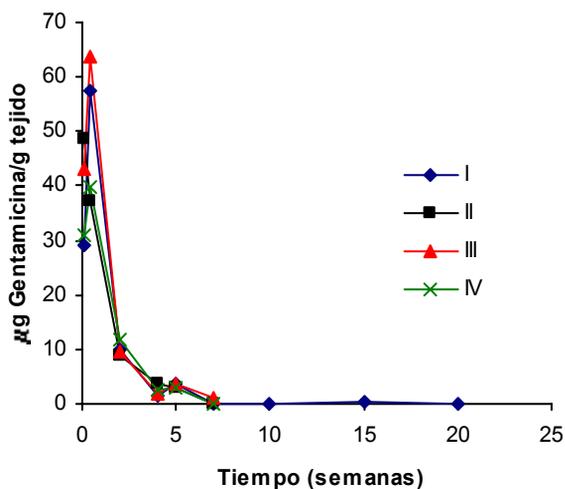
**Tabla 11.-** Cantidades de gentamicina en riñón, expresadas en microgramos de SG por gramo de tejido, tras la implantación de la formulación F-1.

Tiempo (semanas)	I	II	III	IV	Media	s.d.
0,143	22,01	24,18	25,53	25,08	24,2	1,56
0,429	30,48	48,79	54,54	61,53	48,84	13,3
1	31,54	39,66	28,12	30,94	32,57	4,96
2	25,27	20,88	20,52	13,26	19,98	4,97
3	17,96	13,38	18,1	11,04	15,12	3,49
4	12,71	11,82	12,11	12,78	12,35	0,47
7	0,01	5,27	3,28	0,18	2,18	2,55
10	0,01				0,01	
15	0,22				0,22	
20	0,03				0,03	

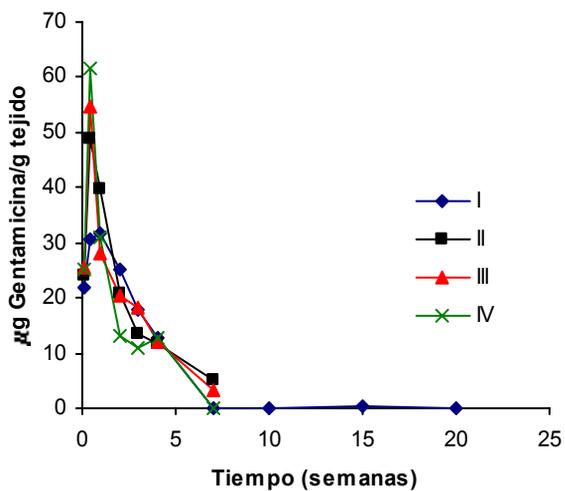
**Tabla 12.-** Cantidades de gentamicina en riñón, expresadas en microgramos de SG por gramo de tejido, tras la implantación de la formulación F-1-PLA.

Tiempo (semanas)	I	II	III	IV	Media	s.d.
0,143	25,25	11,09	25,55	37,77	24,92	10,91
0,429	44,49	43,56	48,98	49,91	46,74	3,17
3	7,51	4,84	2,64	6,02	5,24	2,05
4	2,49	2,41	0	1,82	1,67	1,16
5	2,95	3,28	0,24	3,11	2,39	1,44
6	0,19	0,25	0,01	0,22	0,14	0,11
7	0,2	0,2	0,01	0,2	0,15	0,09
10	1,2				1,2	
15	0,18				0,18	
20	0,03				0,03	

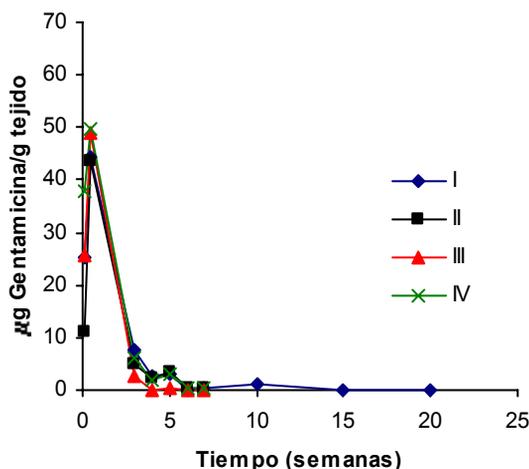
**Tabla 13.-** Cantidades de gentamicina en riñón, expresadas en microgramos de SG por gramo de tejido, tras la implantación de la formulación F-1-PLGA.



**Figura 16.-** Niveles de SG alcanzados en riñón tras la implantación de la formulación F-1 en el fémur de ratas.



**Figura 17.-** Niveles de SG alcanzados en riñón tras la implantación de la formulación F-1-PLA en el fémur de ratas.



**Figura 18.-** Niveles de SG alcanzados en riñón tras la implantación de la formulación F-1-PLGA en el fémur de ratas.

- **Control de la función renal**

Los valores de concentración de creatinina en suero correspondientes a las ratas implantadas con las formulaciones F-1, F-1-PLA y F-1-PLGA, oscilaron entre 0,475 y 0,87 mg/dl a lo largo de todo el ensayo, siendo similares al valor basal ( $0,816 \pm 0,041$  mg/dl).

- **Resultados del estudio radiológico**

A continuación se muestran las radiografías de fémur, realizadas tras la implantación de las distintas formulaciones: F-1, F-1-PLA y F-1-PLGA.

Como ya hemos indicado, se obtenía el fémur derecho de los animales para su estudio radiológico y posteriormente el anatomopatológico. Por lo tanto, se obtuvieron radiografías a las 24 y 72 horas de la colocación del implante y a la 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> semanas.

Atendiendo a los parámetros citados en material y métodos, se obtuvieron los siguientes resultados:

- ❖ 24 horas: en los tres grupos de animales lo único que se aprecia es un aumento de las partes blandas tal y como se puede ver en la figura 19, donde se recogen los resultados obtenidos con la F-1 a título de ejemplo.
- ❖ 72 horas: se puede ver todavía el aumento de las partes blandas debido al trauma quirúrgico, y en las tres muestras aparece un ligero halo radiolúcido periimplante, atribuible a la hemorragia intraósea y a la destrucción de la medular es decir, al trauma quirúrgico. No hay reacción perióstica y el aspecto de la medular y de las corticales es normal. Los implantes están íntegros todavía y se diferencian claramente del tejido óseo (Figuras 20, 21 y 22).



**Figura 19.**-Rx obtenida a las 24 horas de la inserción del implante F-1



**Figura 20.**-Rx obtenida a las 72 horas de la inserción del implante F-1.



**Figura 21.**-Rx obtenida a las 72 horas de la inserción del implante F-1-PLGA



**Figura 22.-** Rx obtenida a las 72 horas de la inserción del implante F-1-PLA.

- ❖ 1 semana: en las radiografías realizadas a la semana de la colocación del implante no se observan grandes cambios radiológicos. Disminuye o no se aprecia el aumento de los tejidos periarticulares; no hay reacción perióstica y desaparece el halo periimplante (Figura 23).
- ❖ 2 semanas: se empiezan a ver diferencias entre los distintos implantes. Así, en los de F-1-PLA observamos un tabique óseo que los atraviesa y en los de F-1, comienzan a fragmentarse (Figuras 24 y 25).
- ❖ 3 semanas: en los implantes de F-1-PLA se siguen observando los tabiques óseos que se inician en sus bordes y penetran en su interior. Los de la formulación F-1 aparecen fragmentados, apreciándose también la existencia de tabiques o espículas óseas que lo atraviesan (Figuras 26 y 27). Los implantes de la formulación F-1-PLGA presentan irregularidades en su periferia, con penetración del tejido óseo en su interior.



**Figura 23.**-Rx obtenida a la semana de la inserción del implante F-1-PLGA



**Figura 24.**-Rx obtenida a las 2 semanas de la inserción del implante F-1-PLA



*Figura 25.-Rx obtenida a las 2 semanas de la inserción del implante F-1*



*Figura 26.-Rx obtenida a las 3 semanas de la inserción del implante F-1-PLA*



**Figura 27.**-Rx obtenida a las 3 semanas de la inserción del implante F-1

- ❖ 4 semanas: en el implante de la formulación F-1-PLA observamos claramente la presencia de un tabique que lo atraviesa; la diferencia entre el tejido óseo cortical y el propio implante no es neta, no pudiendo señalarse claramente los límites de éste (Figura 28). En los de la formulación F-1 destaca la pérdida de nitidez del contorno del propio implante (Figura 29) y en los de la formulación F-1-PLGA se ve nuevamente la presencia de tabiques (Figura 30).



**Figura 28.**-Rx obtenida a las 4 semanas de la inserción del implante F-1-PLA



**Figura 29.**-Rx obtenida a las 4 semanas de la inserción del implante F-1



**Figura 30.-** Rx obtenida a las 4 semanas de la inserción del implante F-1-PLGA.

- ❖ 5 semanas: tanto los implantes de la formulación F-1 (Figura 31), como los de la F-1-PLGA (Figura 32) aparecen más disgregados que los de la F-1-PLA (Figura 33), que presenta un aspecto más homogéneo. Es de destacar que los de la F-1-PLA, aún diferenciándose claramente del tejido óseo circundante, parece que van integrándose y asemejándose a éste, especialmente en el borde que contacta con la cortical. En los implantes de la formulación F-1, la neoformación ósea es evidente, fundamentalmente en sus bordes, dando la impresión de que están totalmente englobados en el tejido óseo. El implante de la F-1-PLGA se presenta disgregado, con neoformación ósea, también más notable en sus extremos y su densidad es idéntica a la de la cortical ósea, no diferenciándose los límites entre ambos.



**Figura 31.**-Rx obtenida a las 5 semanas de la inserción del implante F-1.



**Figura 32.**-Rx obtenida a las 5 semanas de la inserción del implante F-1-PLGA



*Figura 33.-Rx obtenida a las 5 semanas de la inserción del implante F-1-PLA*

- ❖ 6 semanas: las diferencias entre los tres tipos de implante son claras. En el de la formulación F-1-PLA (Figura 34), apreciamos que su densidad se va asemejando al hueso circundante. Continuamos viendo tabiques y su integración en el tejido óseo es evidente, sí bien no tan llamativa como en los otros. El de la F-1 (Figura 35) está disgregado, fragmentado y su densidad es igual a la del hueso cortical. El de la F-1-PLGA (Figura 36) aparece fragmentado, con bordes erosionados y su periferia es menos densa que el centro.
- ❖ 7 semanas: el implante de la formulación F-1-PLA (Figura 37) aparece integrado en el hueso circundante, con neoformación ósea en la periferia y zonas radiotransparentes en su interior, de densidad parecida a la del hueso esponjoso. El de la F-1 (Figura 38) presenta una densidad casi igual a la del hueso y el de la F-1-PLGA (Figura 39) es radiológicamente de densidad igual a la del hueso, con neoformación ósea periimplante.



**Figura 34.**-Rx obtenida a las 6 semanas de la inserción del implante F-1-PLA



**Figura 35.**-Rx obtenida a las 6 semanas de la inserción del implante F-1



*Figura 36.-Rx obtenida a las 6 semanas de la inserción del implante F-1-PLGA*



*Figura 37.-Rx obtenida a las 7 semanas de la inserción del implante F-1-PLA*



*Figura 38.-Rx obtenida a las 7 semanas de la inserción del implante F-I*



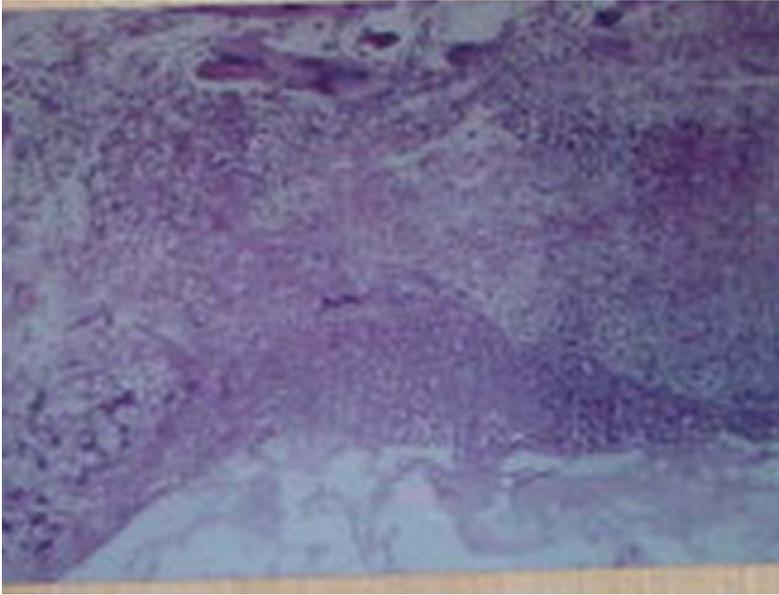
*Figura 39.-Rx obtenida a las 7 semanas de la inserción del implante F-I-PLGA*

- **Resultados del estudio histológico**

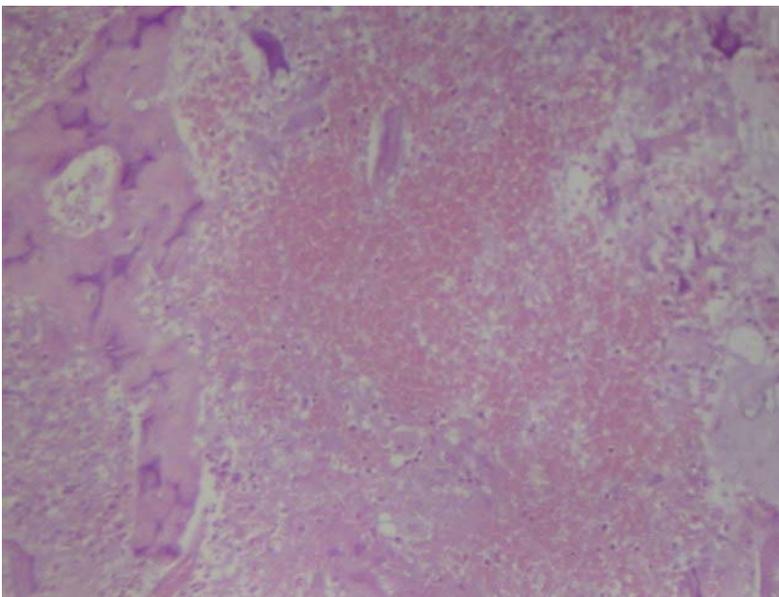
Los resultados del análisis histológico, a lo largo del ensayo de cesión *in vivo* de la gentamicina desde los implantes F-1, F-1-PLA y F-1-PLGA, se muestran en las figuras 40 a 48.

Tras la preparación de las piezas, tal como se indicó en Materiales y Métodos, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

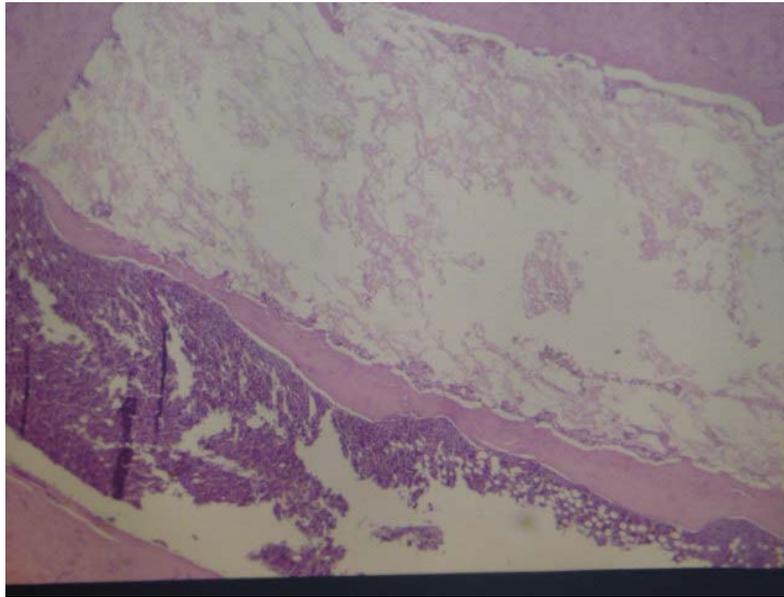
- ❖ 24 horas: los hallazgos fueron idénticos en los tres tipos de implantes y consistían en fracturas y desestructuración del tejido óseo periimplante, con presencia de hemorragia, así como acúmulos laminares de polimorfonucleares (Figura 40).
- ❖ 72 horas: tampoco se aprecian grandes diferencias entre los tres tipos de implantes. En líneas generales, se siguen viendo los mismos fenómenos que a las 24 horas. Es de destacar la ausencia de células inflamatorias. No se observa proliferación vascular (Figura 41).
- ❖ 1 semana: en todas las preparaciones aparece neoformación ósea inmadura periimplante (Figura 42). En los implantes de la F-1, se puede ver la presencia de tractos conectivo-capilares que penetran en él desde la periferia y están rodeados de fibroblastos e histiocitos (Figura 43).
- ❖ 2 semanas: los implantes están rodeados de hueso maduro (Figura 44).
- ❖ 3 semanas: la única diferencia con respecto al punto anterior es que ha aumentado el tejido óseo que rodea al implante (Figura 45).
- ❖ 4 semanas: en este momento lo más notable es la presencia de tractos conectivos, sin tejido óseo, que partiendo de la periferia, penetran y lo atraviesan (Figura 46).
- ❖ 5 semanas: los tractos aparecen ya osificados (Figura 47).
- ❖ 6 y 7 semanas: aparece una franca calcificación intrainplante (Figura 48).



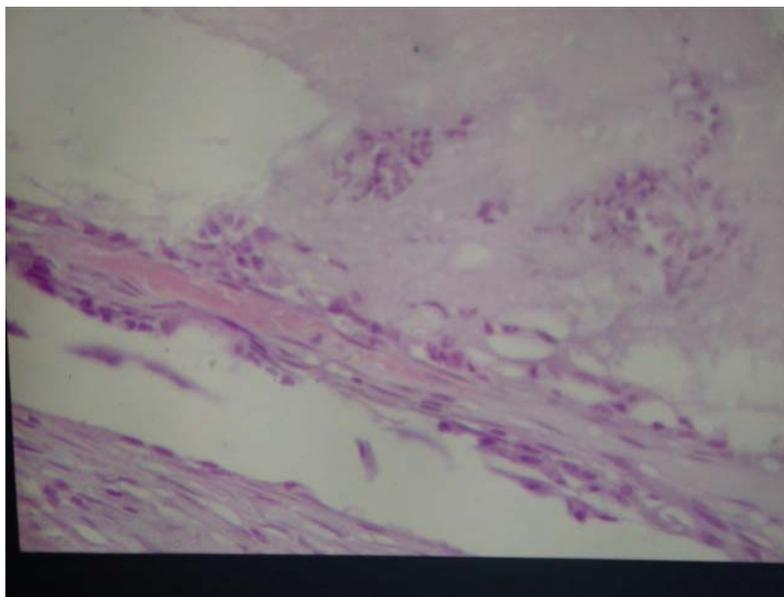
**Figura 40.-** Área de hemorragia a las 24 horas de la colocación del implante



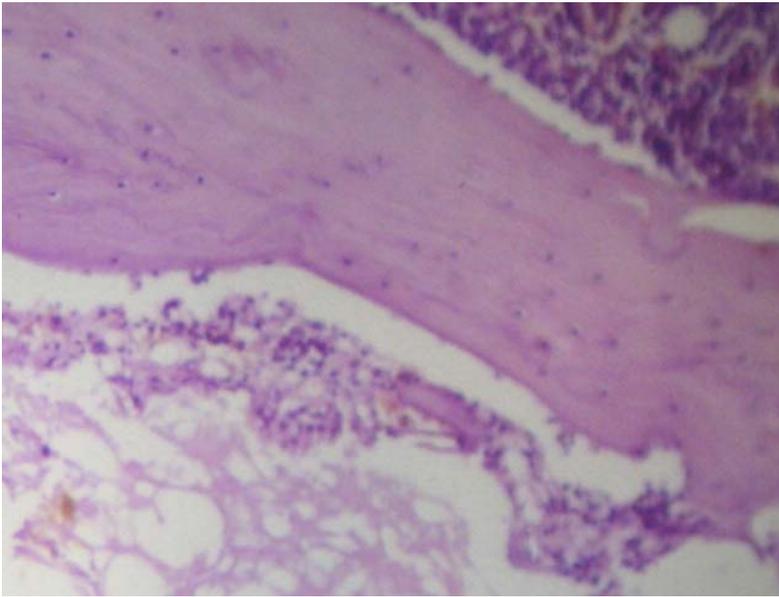
**Figura 41.-** Área de hemorragia a las 72 horas de la colocación del implante. Desestructuración de la arquitectura ósea.



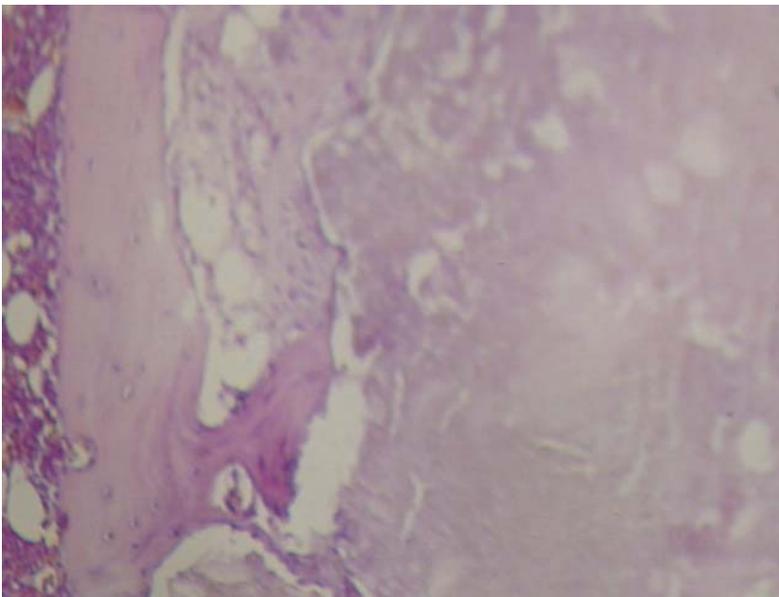
**Figura 42.-** Hueso inmaduro rodeando el implante a la semana de su colocación



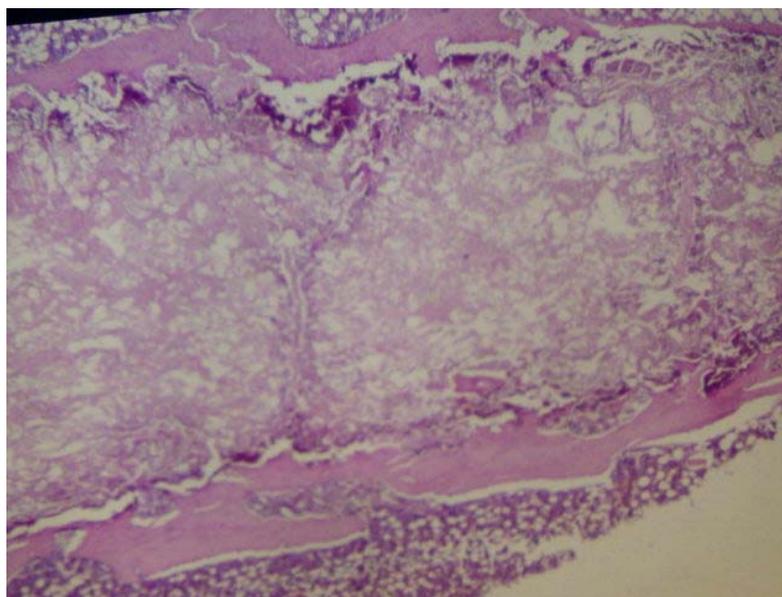
**Figura 43.-** Tracto fibrovascular que penetra en el implante a la semana de su colocación.



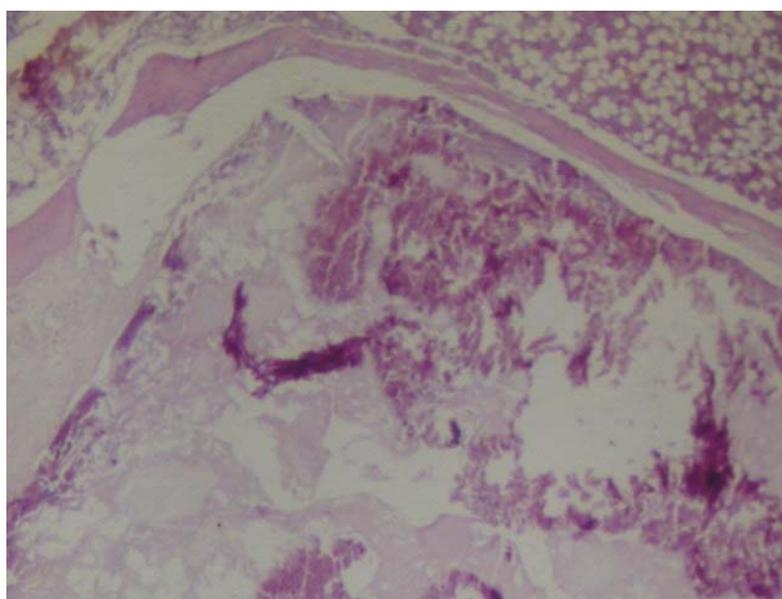
**Figura 44.-** Tejido óseo maduro rodeando al implante a las dos semanas de su colocación.



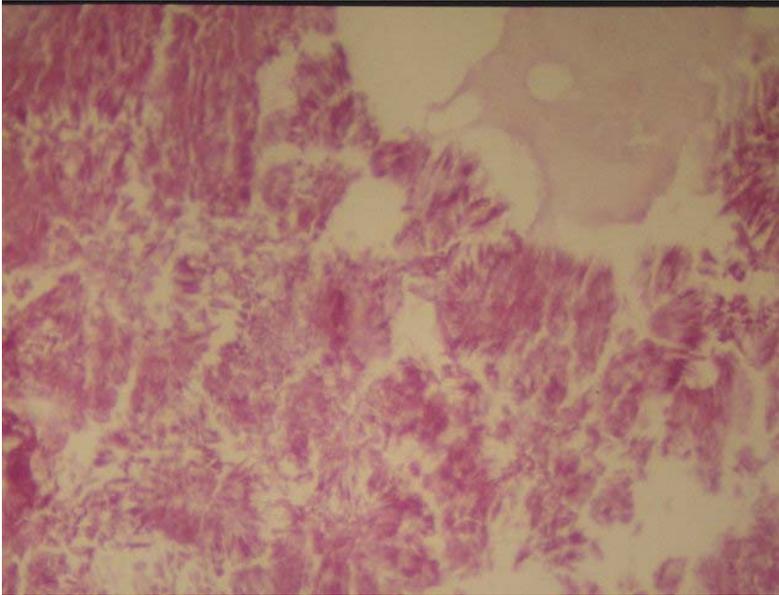
**Figura 45.-** Hueso maduro rodeando al implante del que se inicia tracto óseo a las tres semanas de su colocación.



**Figura 46.-** Tractos de tejido óseo atravesando el implante a las cuatro semanas de su colocación.



**Figura 47.-** Se inicia calcificación intraimplante a las cinco semanas de su colocación.



**Figura 48.** - *Implante calcificado a las siete semanas de su colocación*

### SECCIÓN III: ESTUDIO EN CONEJOS

#### ESTUDIO PRELIMINAR

- **Elaboración de los implantes**

El estudio en conejos se inicia con la elaboración de tres formulaciones: F-1C, F-2C y F-3C. La composición y características de estas formulaciones se muestran en la tabla 14. Todas se obtuvieron por compresión de 1g de granulados aplicando una fuerza de 6 toneladas con un punzón de 12 mm. Los granulados fueron preparados en lotes de 10 g. La concentración de la disolución acuosa de SG se mantuvo en 700 mg/ml y el contenido teórico en un 3,5%. La concentración del polímero en el DCM varió entre 1g/ml para el PLA-30 y 0,5 g/ml para el PLA-200. La relación entre los fosfatos (HAP/FTC) se mantuvo constante, 25/75 y la pasta de fosfatos con agua mantiene la proporción descrita anteriormente. Después de la compresión, los implantes de 12 mm son cortados en paralelepípedos para adaptarlos al tamaño del fémur de conejo.

		F-1C	F-2C	F-3C
Polímero / fosfatos		20/80	50/50	50/50
PM del PLA (kD)		30	30	200
% SG incorporado		3,14 ± 0,158	2,84 ± 0,258	2,32 ± 0,08
R.I. (%)		89,7 ± 4,52	81,0 ± 7,38	66,3 ± 2,35
Peso (mg)		346,6 ± 45,4	285,3 ± 23,8	331,1 ± 22,0
Dimensiones (mm)	Largo	9,92 ± 0,684	9,69 ± 0,118	9,94 ± 0,019
	Alto	4,00 ± 0,073	4,13 ± 0,009	4,09 ± 0,016
	Ancho	4,90 ± 0,445	4,94 ± 0,013	4,94 ± 0,078

**Tabla 14.-** Composición y características de los implantes correspondientes a las formulaciones F-1C, F-2C y F-3C; R.I. = Rendimiento de incorporación.

- **Ensayos de cesión *in vitro***

En las tablas 15, 16 y 17 se recogen las cantidades de gentamicina cedidas, valoradas por espectrofotometría, desde las formulaciones F-1C, F-2C y F-3C respectivamente. Así mismo en las figuras 49, 50 y 51 se muestran los correspondientes perfiles de cesión.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
1	5,00	4,63	4,80	4,81	0,19
2	5,27	5,39	5,61	5,42	0,17
3	6,05	5,87	6,36	6,09	0,25
5	6,31	6,17	6,30	6,26	0,08
7	6,78	6,74	7,09	6,87	0,19
10	6,87	6,65	7,72	7,08	0,56
15	7,10	7,11	7,50	7,24	0,23
21	7,40	7,12	7,56	7,36	0,22
28	7,85	7,53	7,74	7,71	0,16
35	7,61	8,11	7,93	7,88	0,25
42	7,70	7,58	7,77	7,68	0,10
49	8,61	7,60	7,88	8,03	0,52
56	7,77	7,52	7,69	7,66	0,13
63	7,78	7,62	7,95	7,78	0,16
70	8,01	7,26	7,91	7,72	0,41
77	8,39	7,14	8,04	7,86	0,65
84	8,17	7,11	8,23	7,84	0,63

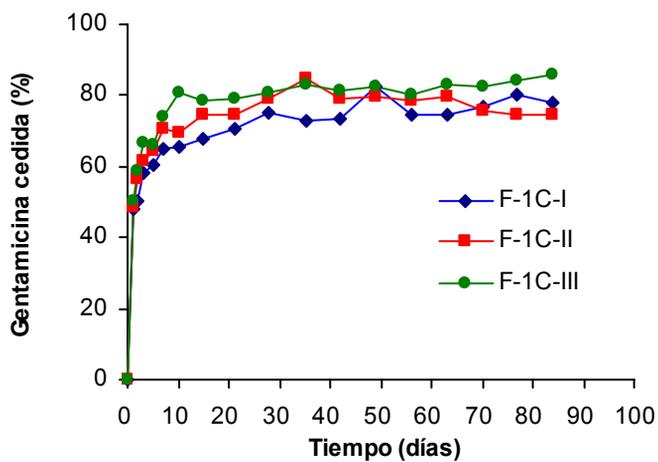
**Tabla 15.-** Resultados de los estudios de cesión de gentamicina con la formulación F-1C (10,44, 9,56 y 9,56 mg iniciales de SG para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica y a 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	4,60	5,80	5,47	5,29	0,62
2	5,43	6,74	6,71	6,29	0,75
3	5,78	7,15	7,14	6,69	0,79
5	6,15	7,53	7,57	7,09	0,81
7	6,12	7,84	7,29	7,09	0,88

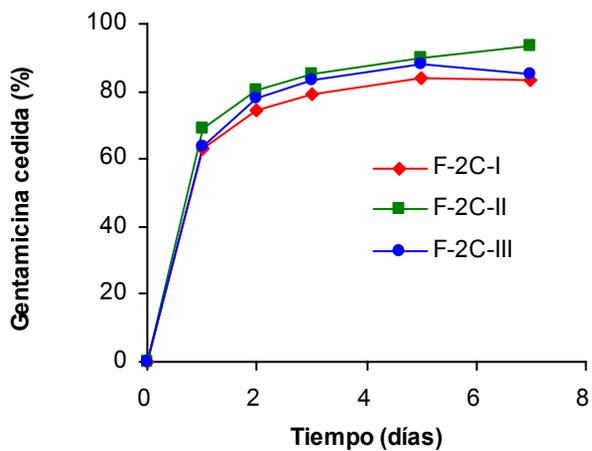
**Tabla 16.-** Resultados de los estudios de cesión de gentamicina con la formulación F-2C (7,33, 8,38 y 8,6 mg iniciales de SG para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica y a 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	5,74	7,10	5,09	5,98	1,03
2	5,87	6,98	5,26	6,04	0,88
3	5,98	7,47	5,58	6,34	1,00
5	6,07	7,53	5,35	6,32	1,11
7	6,09	7,56	5,38	6,34	1,12

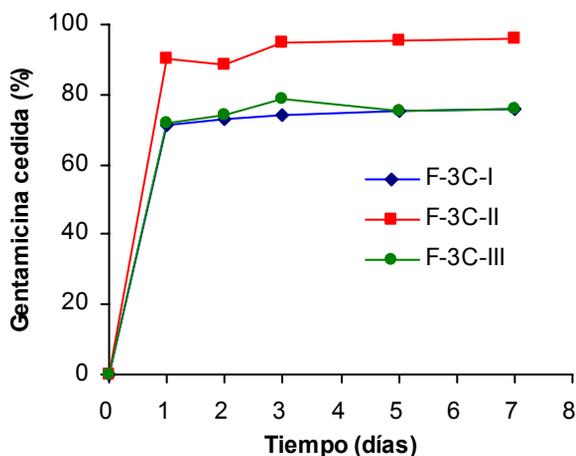
**Tabla 17.-** Resultados de los estudios de cesión de gentamicina con la formulación F-3C (8,06, 7,89 y 7,1 mg iniciales de SG para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica y a 37°C.



**Figura 49.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-1C.



**Figura 50.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-2C.



**Figura 51.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-3C.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Como ya hemos indicado en Materiales y Método, en el diseño de las formulaciones a administrar en conejos se tuvieron en cuenta tres factores: porcentaje de gentamicina, peso molecular del poliláctico y recubrimiento de los implantes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios previos, la fuerza de compresión se fijó en 6 toneladas y la proporción HAP/FTC permaneció en un 25/75. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio preliminar anteriormente descrito, la proporción polímero/fosfatos se mantuvo en 20/80. Como ya hemos mencionado previamente, el peso de los implantes se mantuvo en 1 g, que una vez cortados osciló entre 350-375 mg. Los valores límites de los factores a estudiar se fijaron de la siguiente manera: porcentaje de gentamicina entre un 3,5% y un 7%, para evitar la toxicidad renal. El peso molecular entre 30 kD, polímero de bajo peso molecular y como máximo 200 kD y finalmente se considera como valor máximo del tercer factor la presencia de recubrimiento y como valor mínimo, el no recubrimiento.

La matriz de Hadamard utilizada (4 x 4) fue del tipo:

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 \end{pmatrix}$$

La primera columna denota las formulaciones a elaborar; los valores 1 y -1 indican los valores máximos y mínimos de cada uno de los parámetros,  $P_1$  (porcentaje de sulfato de gentamicina),  $P_2$  (peso molecular del poliláctico) y  $P_3$  (recubrimiento del implante), que se corresponden con los valores de la 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> columnas, respectivamente. De acuerdo con este diseño las cuatro formulaciones a elaborar, con un peso teórico de 1 g y aplicando 6 toneladas a temperatura ambiente, son:

- **Formulación F-A** (1, 1, 1)

Composición:	Gentamicina	7 %
	Peso molecular del poliláctico	200 kD
	Recubrimiento con PLA-200	Sí
	Relación HAP/FTC	25/75
	Relación polímero / fosfatos	20/80

- **Formulación F-B** (1, -1, -1)

Composición:	Gentamicina	7 %
	Peso molecular del poliláctico	30 kD
	Recubrimiento con PLA-200	No
	Relación HAP/FTC	25/75
	Relación polímero / fosfatos	20/80

- **Formulación F-C (-1, 1, -1)**

Composición:	Gentamicina	3,5 %
	Peso molecular del poliláctico	200 kD
	Recubrimiento con PLA-200	No
	Relación HAP/FTC	25/75
	Relación polímero / fosfatos	20/80

- **Formulación F-D (-1, -1, 1)**

Composición:	Gentamicina	3,5 %
	Peso molecular del poliláctico	30 kD
	Recubrimiento con PLA-200	Sí
	Relación HAP/FTC	25/75
	Relación polímero / fosfatos	20/80

La matriz de Hadamard utilizada para el diseño de las formulaciones quedó de la siguiente forma:

$$\begin{pmatrix} \text{F-A} & 7\% & 200 & \text{R} \\ \text{F-B} & 7\% & 30 & \text{NR} \\ \text{F-C} & 3,5\% & 200 & \text{NR} \\ \text{F-D} & 3,5\% & 30 & \text{R} \end{pmatrix}$$

donde R indica implantes recubiertos y NR, no recubiertos.

Del modelo propuesto se deducen las siguientes ecuaciones:

$$y_1 = \theta_0 + \theta_1 + \theta_2 + \theta_3 + e_1 \quad (\text{ec. 3})$$

$$y_2 = \theta_0 + \theta_1 - \theta_2 - \theta_3 + e_2 \quad (\text{ec. 4})$$

$$y_3 = \theta_0 - \theta_1 + \theta_2 - \theta_3 + e_3 \quad (\text{ec. 5})$$

$$y_4 = \theta_0 - \theta_1 - \theta_2 + \theta_3 + e_4 \quad (\text{ec. 6})$$

donde:  $y_1$ ,  $y_2$ ,  $y_3$  e  $y_4$  son los valores obtenidos para el parámetro a optimizar en las distintas formulaciones:  $\theta_1$ ,  $\theta_2$  y  $\theta_3$  son los valores de los parámetros  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ ;  $\theta_0$  es la media general y,  $e_1$ ,  $e_2$ ,  $e_3$  y  $e_4$  son los errores asociados a cada formulación.

Para poder prever en qué sentido van a influir los factores elegidos sobre la variable a optimizar, una vez conocida ésta, es necesario conocer los valores de las distintas  $\theta$ , despejando de las ecuaciones anteriores (ec. 3-6).

En la tabla 18, se recogen las características de los implantes elaborados de acuerdo con el diseño experimental.

		F-A	F-B	F-C	F-D
% SG incorporado		5.73 ± 0.170	5.86 ± 0.090	3.01 ± 0.05	3.14 ± 0.158
R.I. (%)		81.8 ± 2.43	83.7 ± 1.29	86.0 ± 1.40	89.7 ± 4.52
Peso (NR) (mg)		374.2 ± 12.5	353.3 ± 22.0	366.6 ± 16.2	352.6 ± 42.8
Peso (R) (mg)		403.7 ± 13.1			378.5 ± 44.5
Dimensiones (NR) (mm)	Largo	9.69 ± 0.118	9.42 ± 0.489	9.62 ± 0.385	10.1 ± 0.659
	Alto	4.41 ± 0.012	4.04 ± 0.050	4.38 ± 0.031	4.03 ± 0.081
	Ancho	5.36 ± 0.292	5.18 ± 0.247	5.29 ± 0.172	4.97 ± 0.428
Dimensiones (R) (mm)	Largo	10.2 ± 0.109			10.7 ± 0.595
	Alto	4.78 ± 0.050			4.58 ± 0.276
	Ancho	5.86 ± 0.155			5.41 ± 0.473

**Tabla 18.-** Características de los implantes correspondientes a las formulaciones F-A, F-B, F-C y F-D; R.I. = Rendimiento de incorporación. Para las formulaciones F-A y F-D se muestran el peso y dimensiones de los implantes no recubiertos (NR) y recubiertos (R).

## ENSAYOS *IN VITRO*

### ENSAYOS DE CESIÓN

En las tablas 19, 20, 21 y 22, se encuentran recogidos los resultados de los ensayos de cesión *in vitro*, expresados en cantidades cedidas acumuladas, para las formulaciones F-A, F-B, F-C y F-D, respectivamente. Así mismo en las figuras 52, 53, 54 y 55 se han representado las curvas de cesión expresadas en porcentajes cedidos acumulados, por triplicado para estas cuatro formulaciones.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1,00	1,83	1,71	1,51	0,45
2	3,19	4,53	4,25	3,99	0,71
3	4,98	7,05	7,16	6,40	1,23
5	8,59	10,2	9,34	9,39	0,83
7	10,6	12,2	11,0	11,3	0,86
10	11,9	13,9	11,8	12,5	1,20
15	13,1	15,2	12,8	13,7	1,32
21	14,9	17,5	14,8	15,7	1,50
28	16,2	18,2	15,8	16,7	1,26
35	17,0	19,7	16,4	17,7	1,79
42	17,0	19,5	16,7	17,7	1,55
49	17,6	20,0	17,4	18,3	1,46
56	17,5	19,5	17,7	18,2	1,14
63	17,9	18,9	17,4	18,1	0,80

**Tabla 19.-** Resultados de los estudios de cesión de gentamicina con la formulación F-A (21,4, 22,2 y 20,8 mg iniciales de SG para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica y a 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	14,6	15,3	15,6	15,1	0,51
2	16,4	16,6	17,0	16,6	0,31
3	14,9	18,4	15,9	16,4	1,83
5	17,6	16,2	17,0	16,9	0,73
7	18,3	17,3	18,6	18,1	0,70
10	18,7	18,4	18,8	18,6	0,25
15	18,2	19,0	19,2	18,8	0,50
21	19,1	18,9	20,7	19,6	1,01
28	18,6	18,7	20,1	19,1	0,88
35	19,3	19,8	20,5	19,9	0,63
42	18,6	19,2	20,1	19,3	0,76
49	20,7	19,5	19,0	19,7	0,83
56	18,78	18,48	19,49	18,92	0,52
63	19,09	19,53	19,41	19,34	0,23

**Tabla 20.-** Resultados de los estudios de cesión de gentamicina con la formulación F-B (21,6, 21,8 y 22,0 mg iniciales de SG para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica y a 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	4,36	4,77	4,35	4,49	0,24
2	5,10	5,44	4,94	5,16	0,25
3	6,69	7,14	6,95	6,93	0,23
5	6,59	7,18	6,60	6,79	0,34
7	6,92	7,38	7,51	7,27	0,31
10	7,34	7,74	7,52	7,53	0,20
15	7,61	8,08	7,75	7,81	0,24
21	7,89	8,19	7,97	8,02	0,16
28	7,91	8,28	8,08	8,09	0,19
35	8,83	8,68	9,38	8,96	0,37
42	8,22	8,53	8,30	8,35	0,16
49	8,34	9,62	8,15	8,70	0,80
56	8,40	8,55	8,25	8,40	0,15
63	8,29	8,72	8,42	8,48	0,22

**Tabla 21.-** Resultados de los estudios de cesión de gentamicina con la formulación F-C (11,4, 11,6 y 11,7 mg iniciales de SG para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica y a 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	s.d.
	I	II	III		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,13	0,04	0,07
3	0,05	0,14	0,61	0,27	0,30
5	0,27	0,50	1,45	0,74	0,62
7	0,63	1,01	2,25	1,29	0,85
10	1,15	1,54	3,18	1,96	1,08
15	2,24	2,83	4,36	3,14	1,09
21	3,47	3,78	4,80	4,02	0,70
28	4,45	4,85	4,82	4,71	0,22
35	5,59	5,84	5,79	5,74	0,13
42	5,51	6,03	5,54	5,69	0,29
49	5,95	6,29	5,45	5,90	0,42
56	6,03	6,18	5,52	5,91	0,35
64	6,32	6,24	5,61	6,06	0,39
70	6,69	6,61	5,74	6,35	0,53
77	6,76	6,43	5,91	6,37	0,43
84	7,25	6,78	6,18	6,73	0,54
91	7,17	6,62	6,04	6,61	0,57
98	7,93	6,41	6,07	6,80	0,99
105	7,05	6,29	6,49	6,61	0,39

**Tabla 22.-** Resultados de los estudios de cesión de gentamicina con la formulación F-D (10,1, 10,6 y 10,5 mg iniciales de SG para cada replicado, respectivamente) en tampón fosfato (0,066 M), pH 7,4 isotónico con 0,02% de azida sódica y a 37°C.

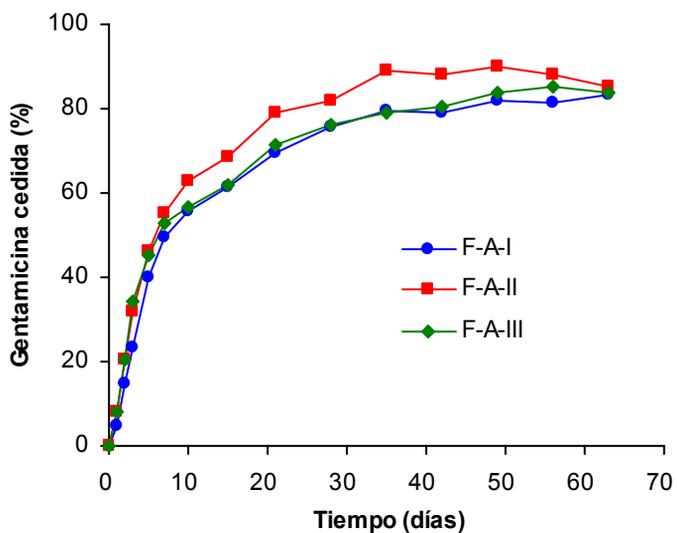


Figura 52.- Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-A.

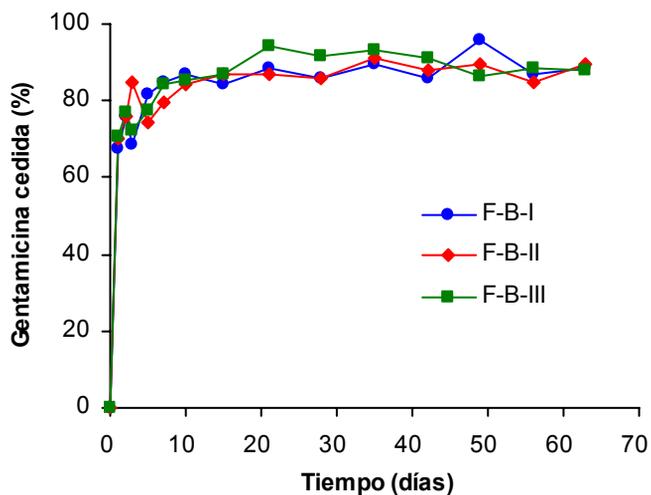
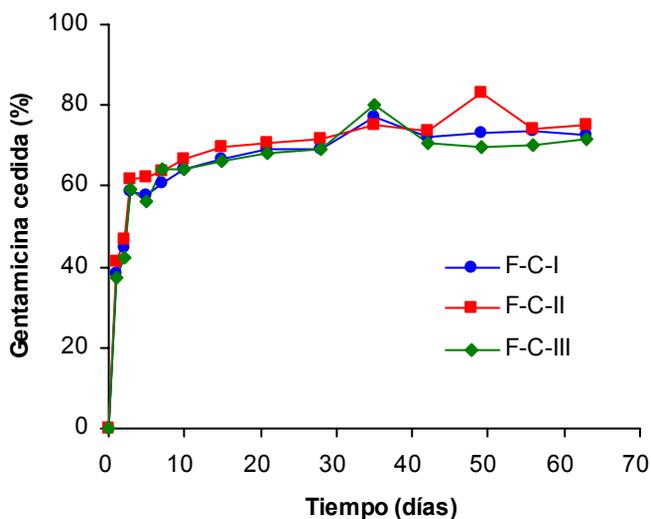
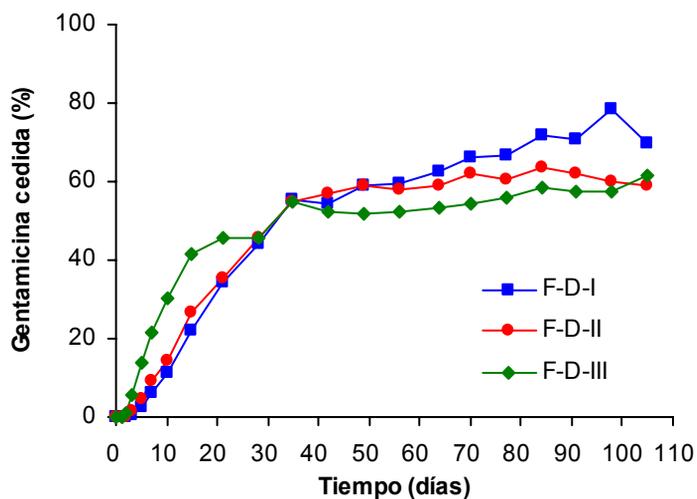


Figura 53.- Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-B.



**Figura 54.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-C.



**Figura 55.-** Porcentajes acumulados de SG liberada a partir de la formulación F-D.

De acuerdo con los resultados de cesión obtenidos se eligió la formulación F-D como formulación que más se aproxima a los objetivos buscados.

Para comprobar el efecto del recubrimiento sobre la velocidad de cesión de la gentamicina, se llevó a cabo la caracterización tanto de los implantes correspondientes a la formulación F-D como la de los implantes, igualmente formulados, pero sin recubrir, que corresponden a la formulación F-1C. En las tablas 15 y 22 y figuras 49 y 55 se recogen los resultados obtenidos en los ensayos de cesión *in vitro* de ambas formulaciones.

### CAPTACIÓN DE AGUA Y PÉRDIDA DE PESO

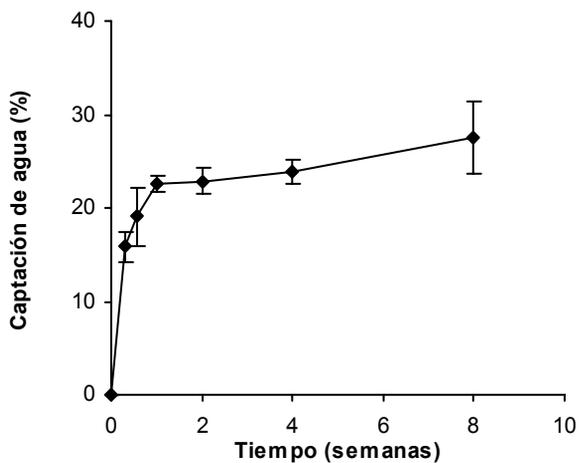
En las tablas 23 y 24 se recogen los porcentajes de agua captada por los implantes de las formulaciones F-D y F-1C y en las figuras 56 y 57 su representación gráfica a lo largo de 8 semanas.

Tiempo (semanas)	Peso (húmedo) (mg)	Peso (seco) (mg)	Captación de agua (%)
0,286	402,9 ± 13,3	347,5 ± 10,3	15,9 ± 1,60
0,571	402,9 ± 30,7	338,8 ± 31,4	19,1 ± 3,10
1	434,8 ± 38,9	354,8 ± 31,8	22,6 ± 0,92
2	449,8 ± 33,9	365,9 ± 29,0	22,9 ± 1,41
4	431,8 ± 54,1	348,5 ± 44,2	23,9 ± 1,34
8	426,2 ± 65,9	335,2 ± 56,2	27,5 ± 3,89

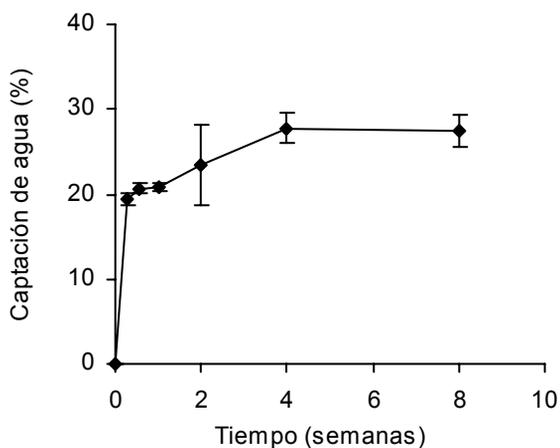
**Tabla 23.-** Pesos y porcentaje medio de agua captada por los implantes de la formulación F-D ± desviación estándar (n = 12).

Tiempo (semanas)	Peso (húmedo) (mg)	Peso (seco) (mg)	Captación de agua (%)
0,286	366,7 ± 76,2	307,1 ± 64,2	19,4 ± 0,72
0,571	383,2 ± 72,6	317,7 ± 61,3	20,7 ± 0,53
1	351,5 ± 10,6	291 ± 7,8	20,8 ± 0,41
2	414,4 ± 53,5	335,2 ± 35,7	23,4 ± 4,8
4	397,6 ± 51,0	311,6 ± 43,2	27,8 ± 1,84
8	399,8 ± 60,7	313,7 ± 45,8	27,4 ± 1,91

**Tabla 24.-** Pesos y porcentaje medio de agua captada por los implantes de la formulación F-1C ± desviación estándar (n = 12).



**Figura 56.-** Perfil de captación de agua de los implantes de la formulación F-D; cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo (n = 12).

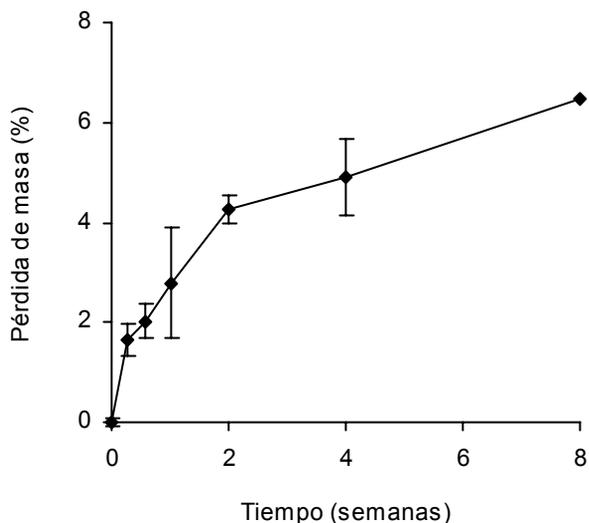


**Figura 57.-** Perfil de captación de agua de los implantes de la formulación F-1C; cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo ( $n = 12$ ).

Los porcentajes de pérdida de masa de los implantes F-D, corregidos por la cantidad de gentamicina cedida, se recogen en la tabla 25 y su representación gráfica frente al tiempo en la figura 58. En la tabla 26 se encuentran los resultados de pérdida de masa correspondiente a la formulación F-1C y en la figura 59 su correspondiente representación.

Tiempo (semanas)	Peso (inicial) (mg)	P. inicial - SG (mg)	Peso (seco) (mg)	Pérdida de masa (%)
0,286	353,4 ± 10,3	353,4 ± 10,3	347,5 ± 10,3	1,66 ± 0,07
0,571	346,5 ± 31,1	345,8 ± 31,1	338,8 ± 31,4	2,03 ± 0,31
1	366,3 ± 33,6	365,0 ± 33,6	354,8 ± 31,8	2,79 ± 0,33
2	389,3 ± 31,8	386,2 ± 31,8	369,7 ± 30,9	4,26 ± 1,10
4	371,2 ± 46,9	366,5 ± 46,9	348,5 ± 44,2	4,91 ± 0,29
8	364,4 ± 60,1	358,5 ± 60,1	335,2 ± 56,2	6,47 ± 0,78

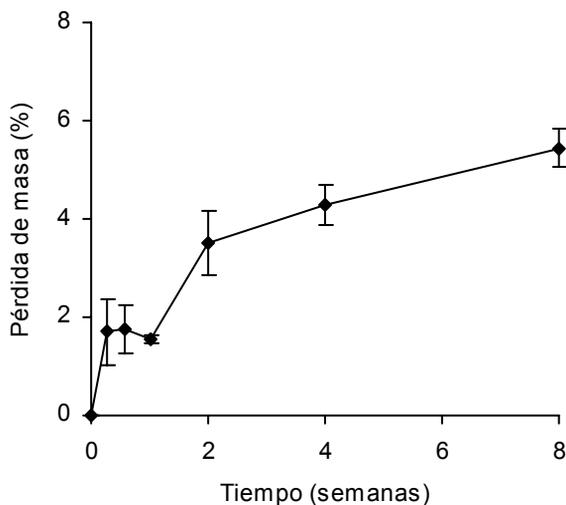
**Tabla 25.-** Pesos y porcentaje medio de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-D ± desviación estándar ( $n = 12$ ).



**Figura 58.-** Perfil de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-D; cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo ( $n = 12$ ).

Tiempo (semanas)	Peso (inicial) (mg)	P.Inicial - SG (mg)	Peso (seco) (mg)	Pérdida de masa (%)
0,286	317,7 ± 66,9	312,7 ± 66,9	307,1 ± 64,2	1,70 ± 0,69
0,571	329,8 ± 64,1	323,6 ± 64,1	317,7 ± 61,3	1,76 ± 0,5
1	302,4 ± 7,94	295,5 ± 7,94	291 ± 7,83	1,53 ± 0,08
2	354,7 ± 38,2	347,4 ± 38,2	335,2 ± 35,7	3,49 ± 0,66
4	333,4 ± 46,1	325,7 ± 46,1	311,6 ± 43,2	4,30 ± 0,42
8	339,6 ± 49,6	331,9 ± 49,6	313,7 ± 45,8	5,44 ± 0,38

**Tabla 26.-** Pesos y porcentaje medio de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-1C ± desviación estándar ( $n = 12$ ).

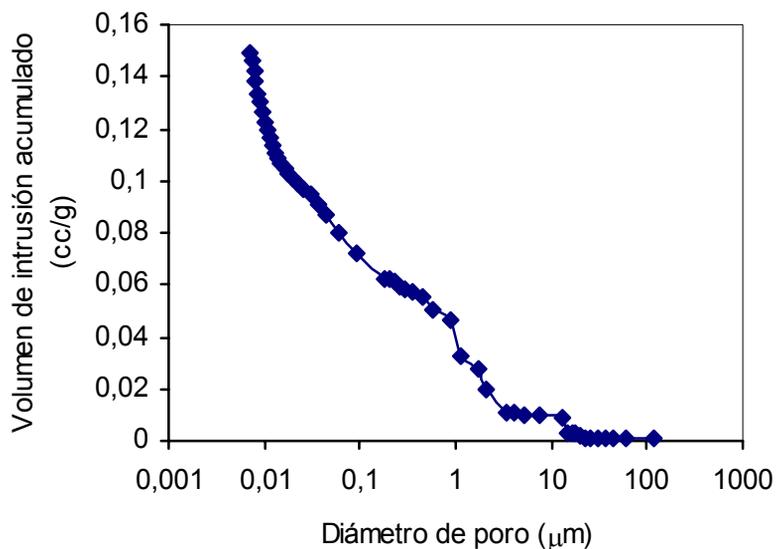


**Figura 59.-** Perfil de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-1C; cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo ( $n = 12$ ).

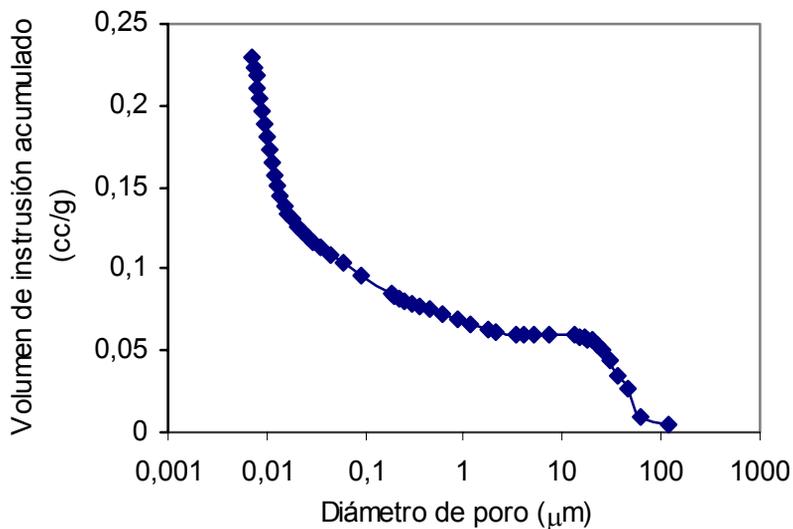
## ESTRUCTURA DE LOS IMPLANTES

Las curvas de distribución de tamaño de poro a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*, correspondientes a tiempos: 0, 2, 4 y 8 semanas se recogen en las figuras 60, 61, 62 y 63 para la formulación F-D y en las figuras 64, 65, 66 y 67 para la F-1C. Así mismo, en la tabla 27 se recoge el diámetro medio de poro y la porosidad a los tiempos mencionados para ambas formulaciones.

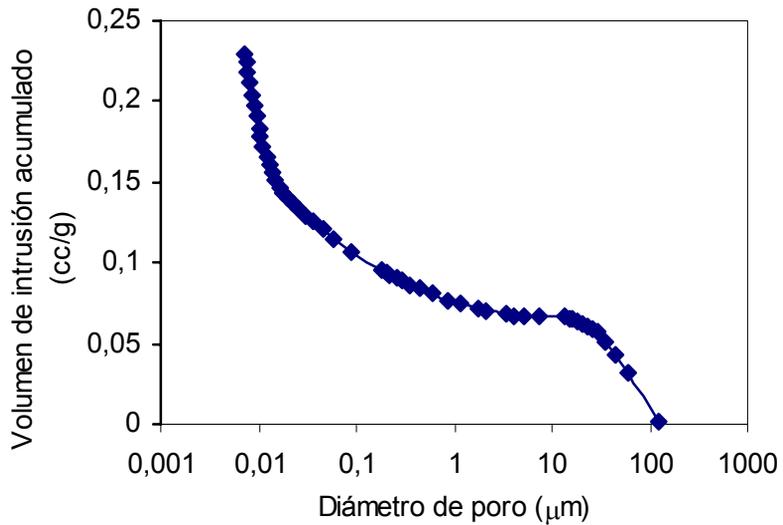
En las figuras 68 y 69 se presentan las microfotografías, realizadas por SEM a lo largo del ensayo de cesión, del implante completo y de las secciones transversales, respectivamente, para la formulación F-D. Estos mismos resultados para la formulación F-1C se encuentran en las figuras 70 y 71.



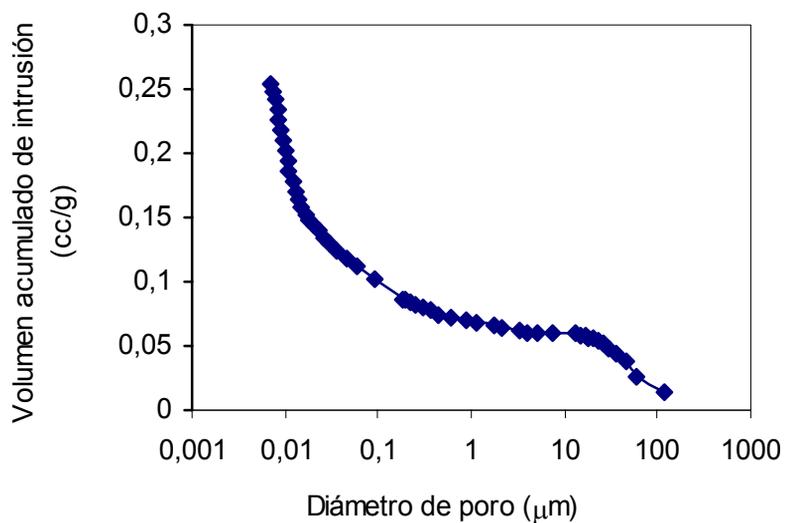
**Figura 60.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-D recién comprimidos,  $t = 0$ .



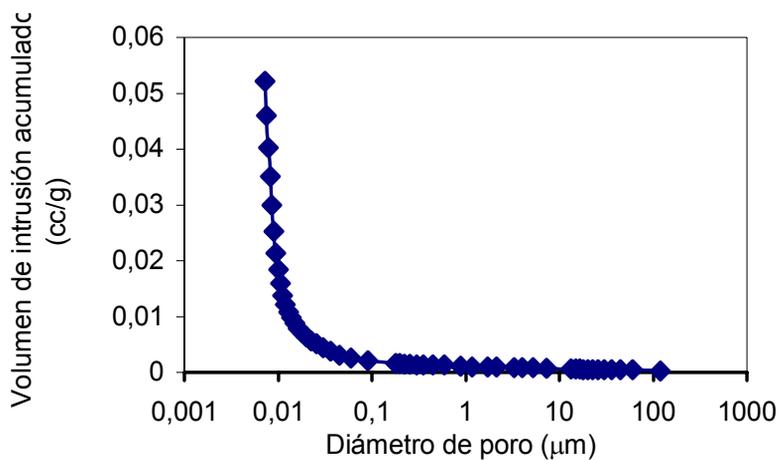
**Figura 61.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-D después de 2 semanas de incubación en tampón fosfato.



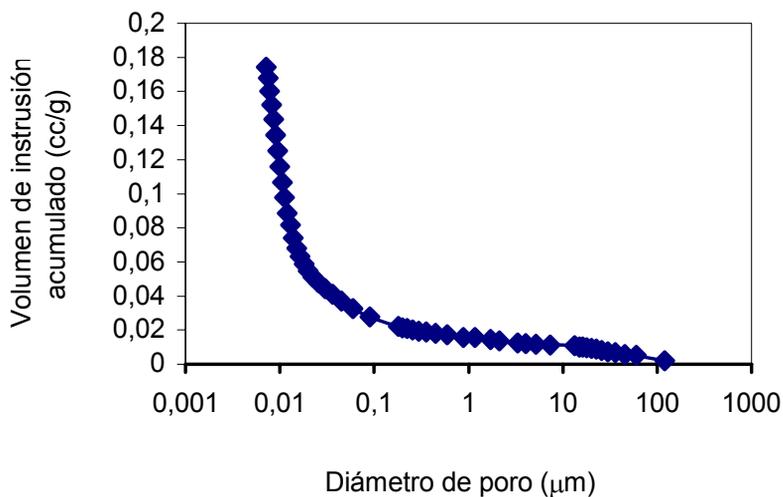
**Figura 62.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-D después de 4 semanas de incubación en tampón fosfato.



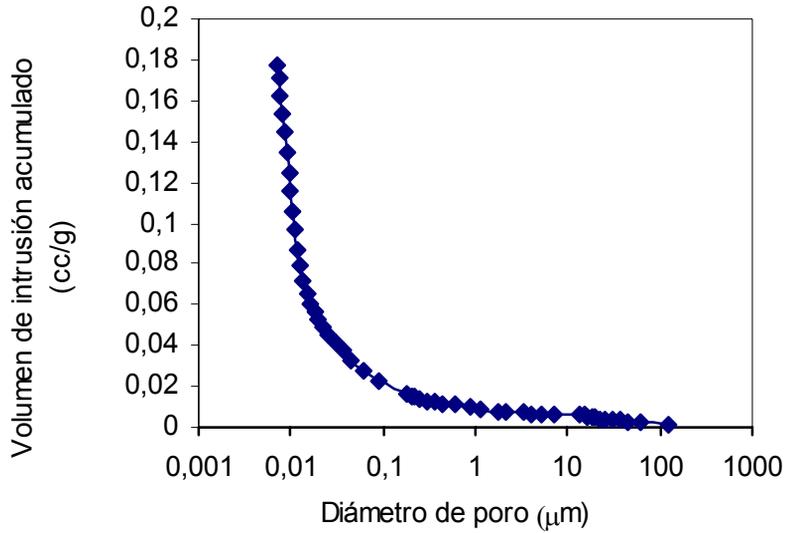
**Figura 63.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-D después de 8 semanas de incubación en tampón fosfato.



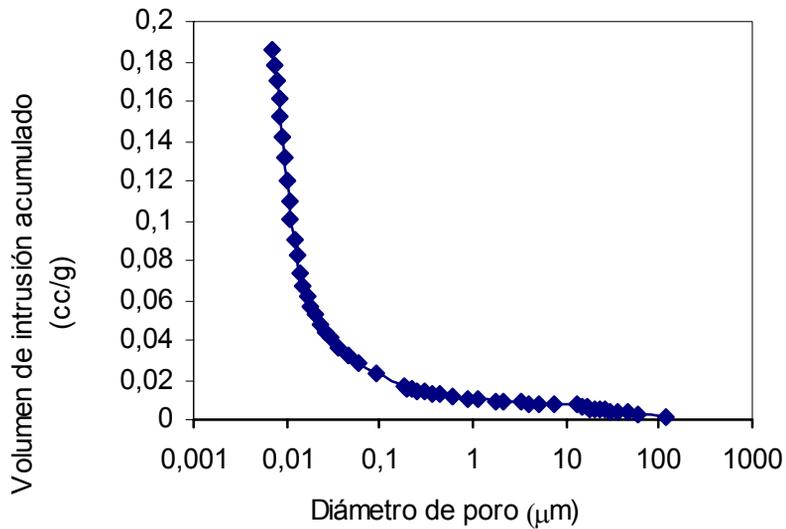
**Figura 64.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implante F-1C recién comprimidos,  $t = 0$ .



**Figura 65.-** Volumen de intrusión acumulada frente a diámetro de poro de los implantes F-1C después de 2 semanas de incubación en tampón fosfato.



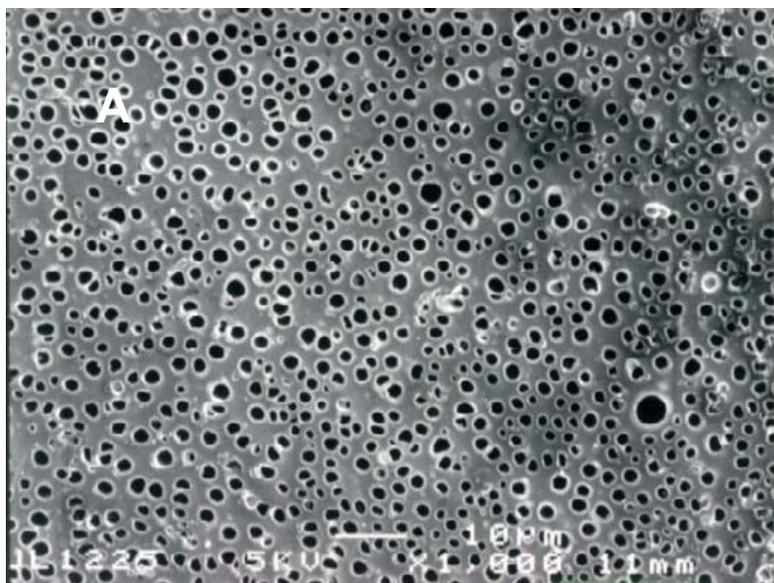
**Figura 66.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-1C después de 4 semanas de incubación en tampón fosfato.

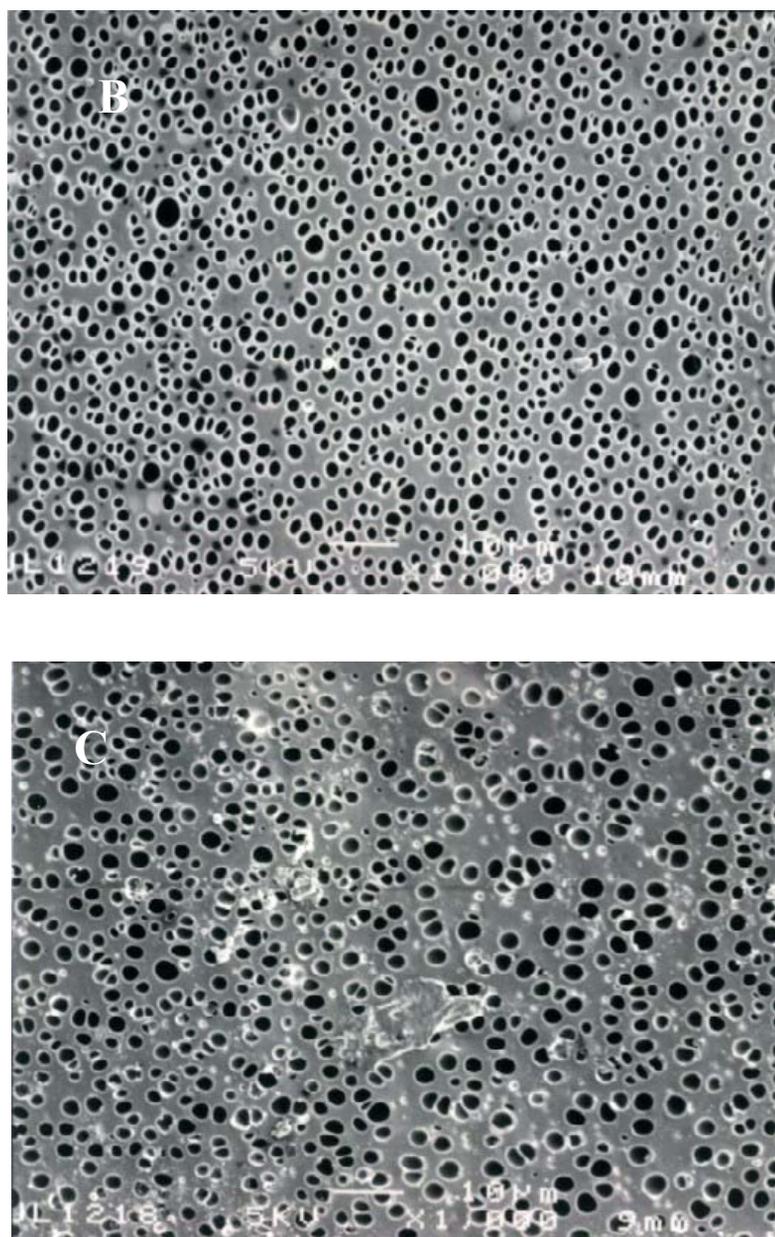


**Figura 67.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-1C después de 8 semanas de incubación en tampón fosfato.

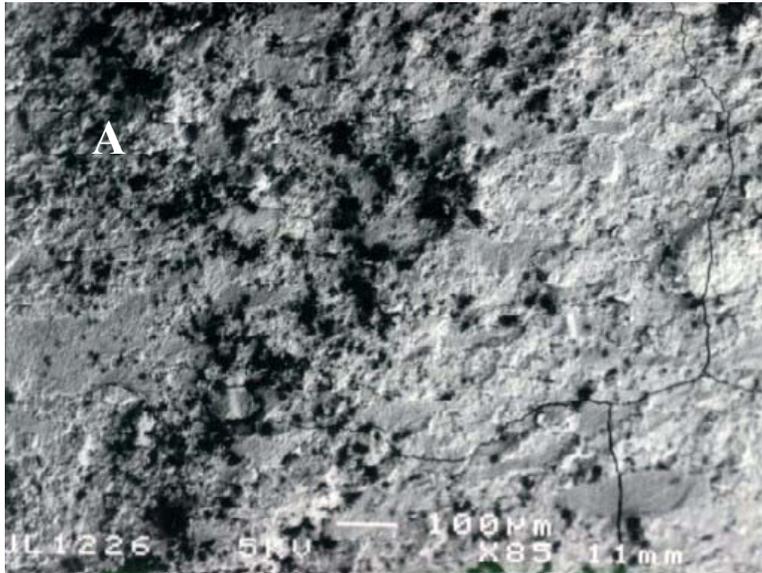
Tiempo (semanas)	F-1C		F-D	
	Diámetro medio de poro ( $\mu\text{m}$ )	Porosidad (%)	Diámetro medio de poro ( $\mu\text{m}$ )	Porosidad (%)
0	0,0098	8,56	0,0256	19,9
2	0,0137	24,1	0,0206	29,0
4	0,0132	24,3	0,0229	28,9
8	0,0131	25,5	0,0207	30,7

**Tabla 27.-** Diámetro medio de poro y porosidad de los implante de las formulaciones F-1C y F-D a lo largo de los ensayos *in vitro*.



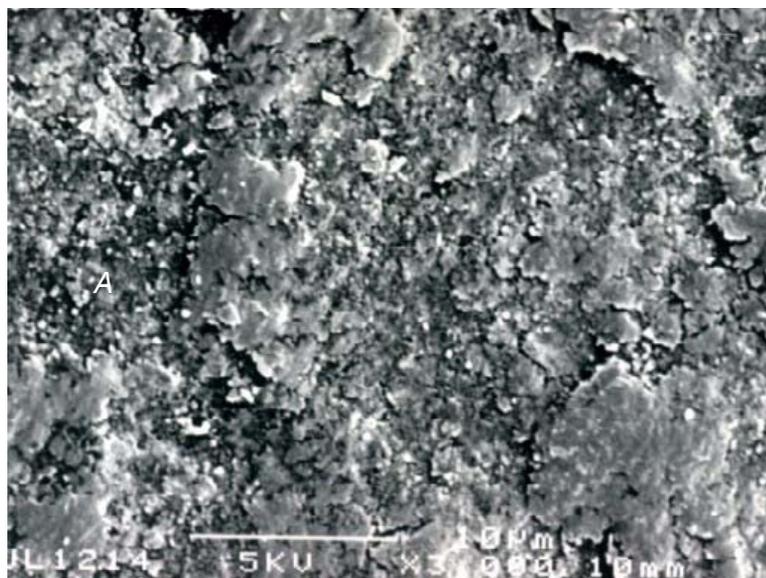


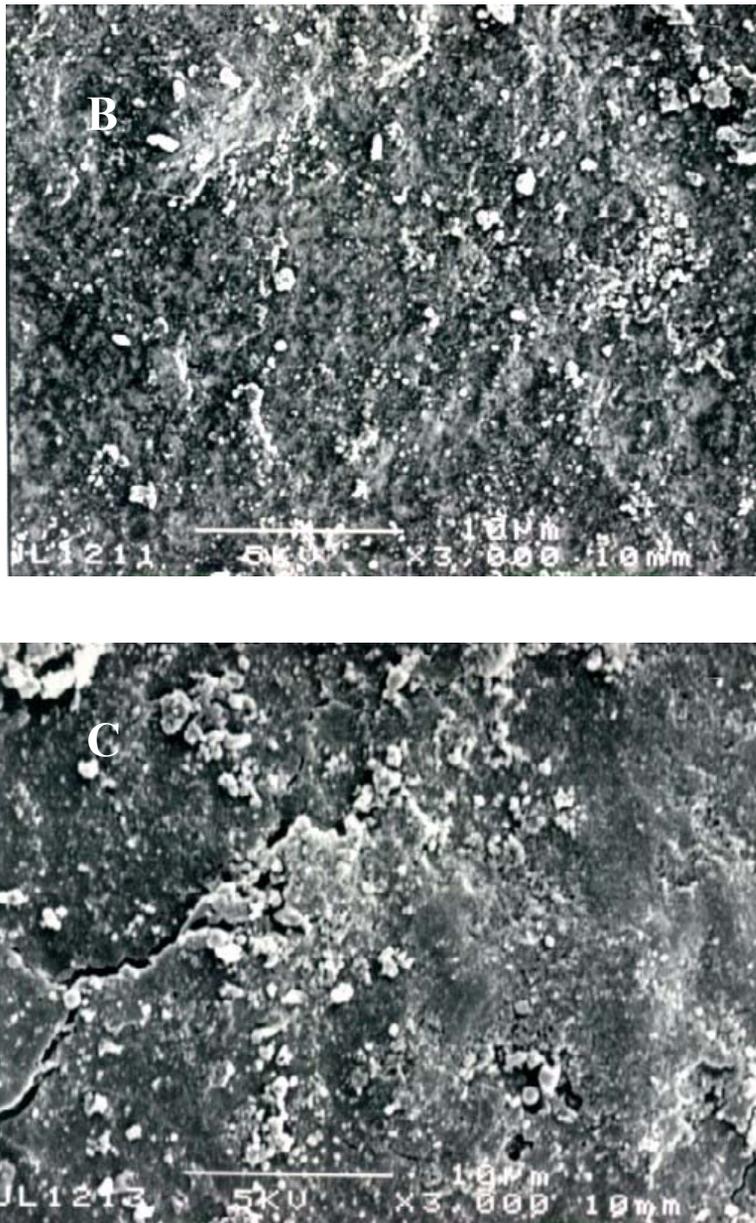
**Figura 68.-** Microfotografías del exterior del implante de la formulación F-D, a lo largo del ensayo de cesión. A,  $t = 0$  semanas; B,  $t = 2$  semanas; C,  $t = 8$  semanas.



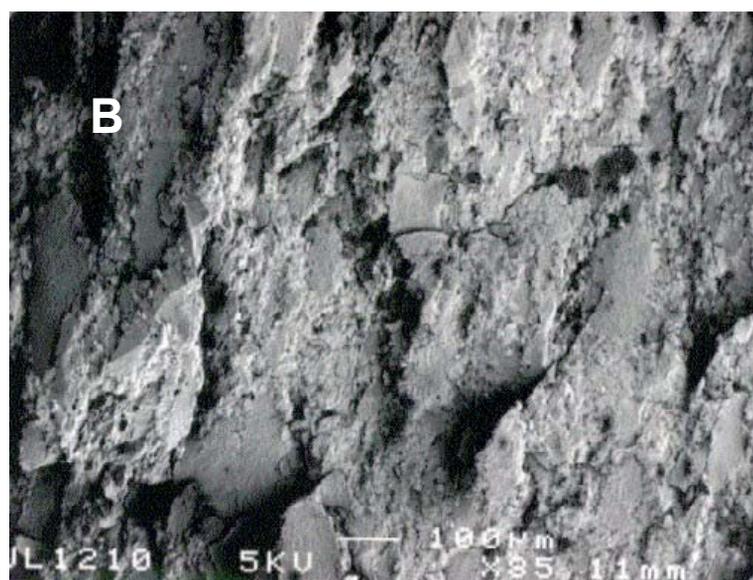


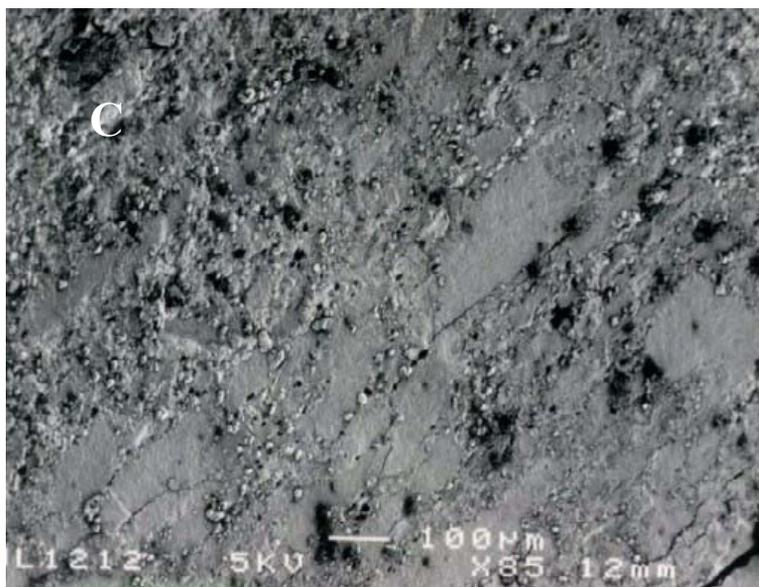
**Figura 69.-** Microfotografías correspondientes al corte transversal de implantes de la formulación F-D, a lo largo del ensayo de cesión. A, t = 0 semanas; B, t = 2 semanas; C, t = 8 semanas.





**Figura 70.-** Microfotografías del exterior del implante de la formulación F-1C, a lo largo del ensayo de cesión. A,  $t = 0$  semanas; B,  $t = 2$  semanas; C,  $t = 8$  semanas.





**Figura 71.** - Microfotografías correspondientes al corte transversal de implantes de la formulación F-1C, a lo largo del ensayo de cesión. A,  $t = 0$  semanas; B,  $t = 2$  semanas; C,  $t = 8$  semanas.

## RESULTADOS DE DEGRADACIÓN

El seguimiento de los cambios sufridos por los polímeros y los restantes componentes de las formulaciones, consecuencia de su incubación en tampón fosfato a lo largo de ocho semanas, se llevó a cabo determinando los pesos moleculares y la  $T_g$  de los mismos durante los ensayos de cesión *in vitro*.

En las tablas 28 y 29, se recoge la evolución de los pesos moleculares medios en peso ( $M_w$ ) y en número ( $M_n$ ), así como la polidispersividad, correspondientes al dl-PLA-30 (polímero constituyente de la matriz) y dl-PLA-200 (polímero de recubrimiento) para la formulación F-D. Los resultados de degradación del dl-PLA-30 durante el ensayo de cesión *in vitro* de los implantes no recubiertos (F-1C) se encuentran en la tabla 30. La representación gráfica de la variación del peso molecular y polidispersividad

de los polímeros PLA-30 y PLA-200 constituyentes de los implantes F-D, se muestra en las figuras 72 y 73. Estos mismos resultados para el PLA-30 de la formulación F-1C se reflejan en la figura 74.

Tiempo (semanas)	Mw (kD)	Mn (kD)	pd
0	25,027 ± 0,258	15,280 ± 0,521	1,639 ± 0,039
2	22,985 ± 1,231	13,899 ± 0,750	1,654 ± 0,001
4	24,356 ± 2,244	14,997 ± 1,829	1,627 ± 0,049
8	22,563 ± 0,204	13,727 ± 0,591	1,646 ± 0,086

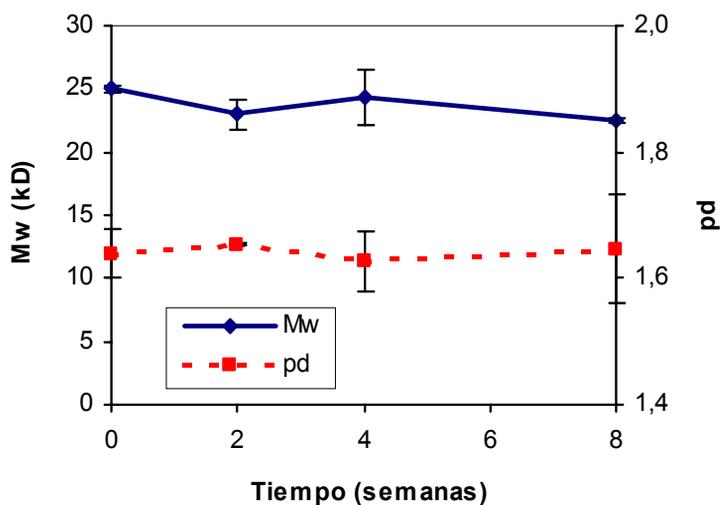
**Tabla 28.-** Evolución de los pesos moleculares y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión *in vitro*.

Tiempo (semanas)	Mw (kD)	Mn (kD)	pd
0	222,430 ± 5,735	114,988 ± 10,671	1,940 ± 0,130
2	212,539 ± 13,825	121,225 ± 19,071	1,766 ± 0,164
4	209,014 ± 5,763	113,710 ± 1,972	1,839 ± 0,083
8	196,570 ± 7,946	109,614 ± 1,452	1,794 ± 0,096

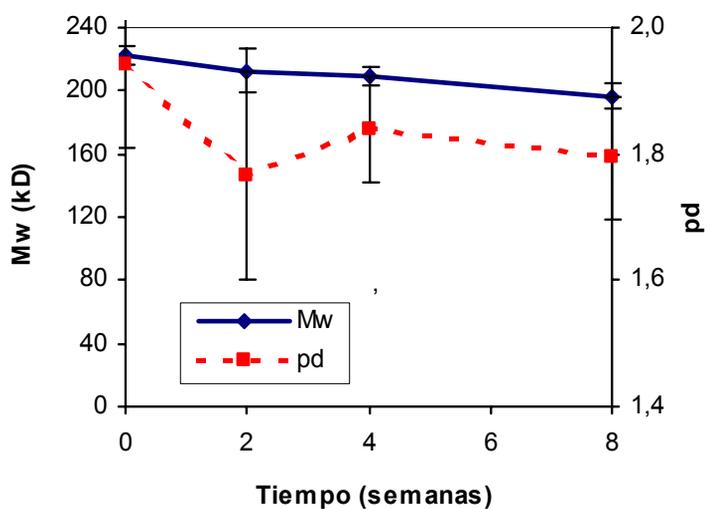
**Tabla 29.-** Evolución de los pesos moleculares y polidispersividad del PLA-200 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión *in vitro*.

Tiempo (semanas)	Mw (kD)	Mn (kD)	pd
0	24,820 ± 0,136	14,860 ± 0,374	1,671 ± 0,051
2	27,028 ± 0,027	16,859 ± 0,549	1,604 ± 0,051
4	27,266 ± 0,481	17,067 ± 0,063	1,598 ± 0,034
8	26,562 ± 0,118	16,252 ± 0,839	1,637 ± 0,092

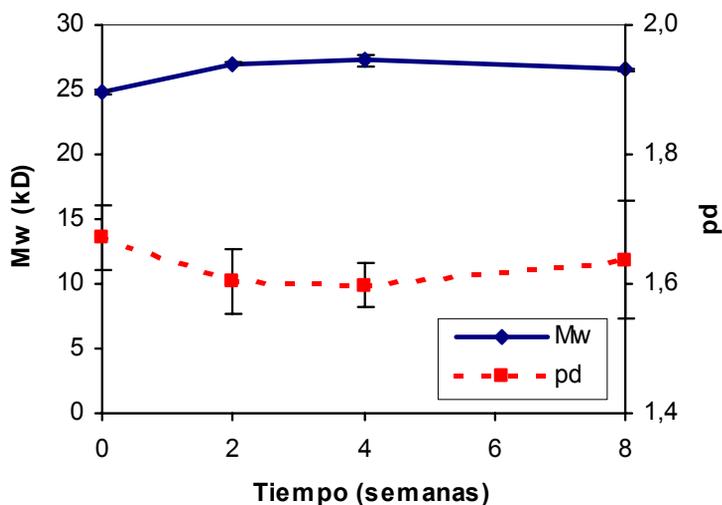
**Tabla 30.-** Evolución de los pesos moleculares y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-1C durante el ensayo de cesión *in vitro*.



**Figura 72.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión in vitro.

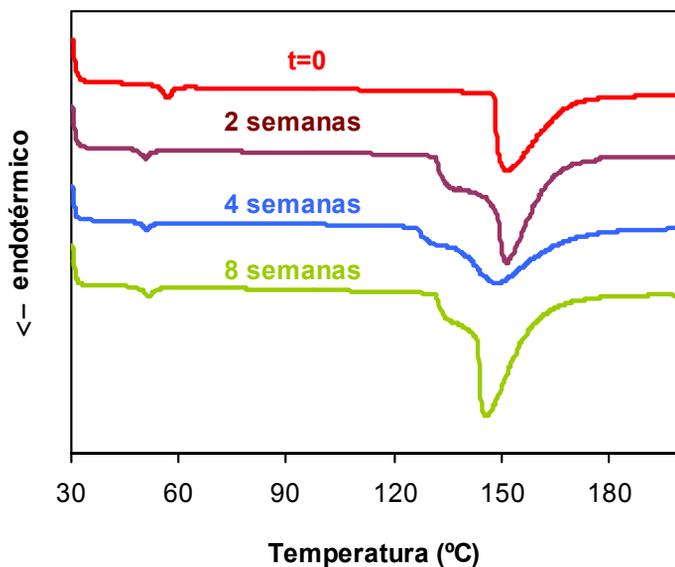


**Figura 73.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polidispersividad del PLA-200 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión in vitro.

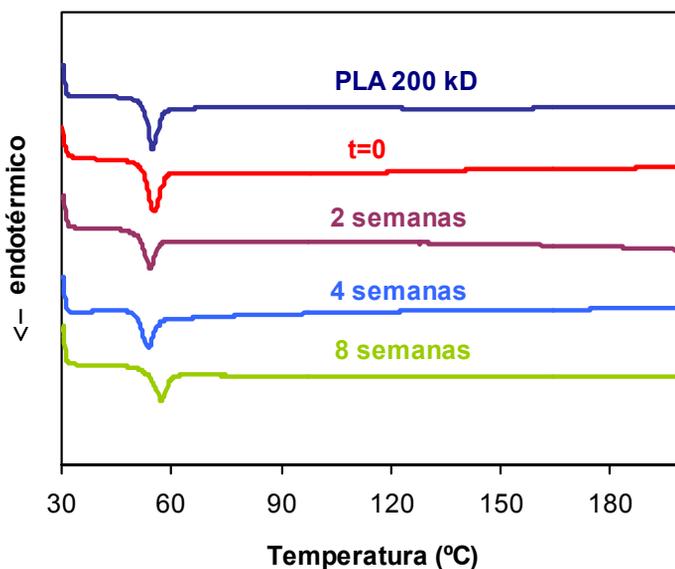


**Figura 74.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polidispersidad del PLA-30 de la formulación F-1C durante el ensayo de cesión *in vitro*.

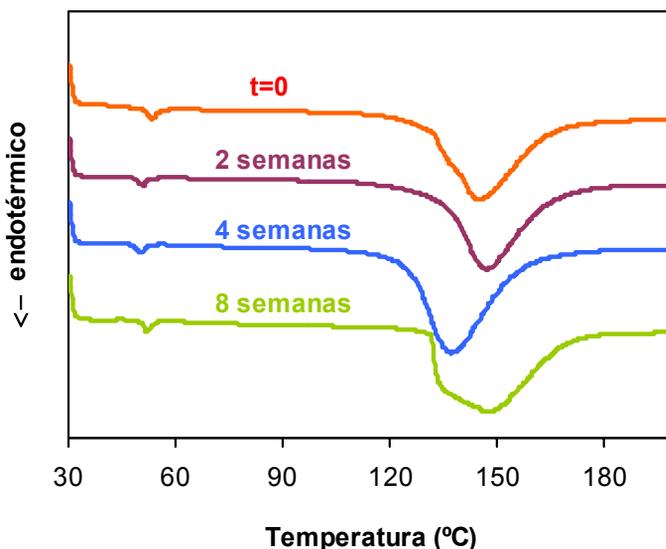
Los termogramas obtenidos por DSC, a lo largo del ensayo de cesión *in vitro* para la formulación F-D se muestran en la figura 75; estos mismos resultados para el PLA-200 de la cubierta se reflejan en la figura 76. Los análisis térmicos correspondientes a la formulación F-1C se encuentran en la figura 77. En las tablas 31 y 32 se recogen los valores de las Tg y áreas normalizadas de ambas formulaciones, correspondientes a estos mismos ensayos.



**Figura 75 .-** Termogramas correspondientes a los implantes del lote F-D a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*.



**Figura 76 .-** Termogramas correspondientes al PLA-200 de la cubierta y su evolución durante el ensayo de cesión *in vitro* de los implantes del lote F-D.



**Figura 77.-** Termogramas correspondientes a los implantes del lote F-1C a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*.

Tiempo (semanas)	Componentes de la matriz				Cubierta	
	PLA-30		HAP/FTC		PLA-200	
	Tg (°C)	Área (J/g)	Tg (°C)	Área (J/g)	Tg (°C)	Área (J/g)
0	57,2	1,29	152,8	31,0	55,2	8,26
2	50,8	0,86	151,4	49,8	53,6	5,92
4	51,2	0,88	148,6	44,5	54,2	5,55
8	51,5	0,94	145,8	49,6	54,9	9,52

**Tabla 31.-** Evolución de la temperatura de transición vítrea (Tg) y área normalizada de los componentes de la matriz y de la cubierta de la formulación F-D durante el ensayo de cesión *in vitro*.

Tiempo (semanas)	PLA-30		HAP/FTC	
	Tg (°C)	Área (J/g)	Tg (°C)	Área (J/g)
0	53,5	1,28	145,1	53,5
2	50,9	0,80	146,8	52,5
4	50,2	0,79	137,4	60,8
8	52,2	0,93	147,3	61,8

**Tabla 32.-** Evolución de la temperatura de transición vítrea (Tg) y área normalizada de los implantes de la formulación F-1C durante el ensayo de cesión *in vitro*.

## ENSAYOS *IN VIVO*

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo con la formulación recubierta F-D.

- **Ensayos de cesión de gentamicina**

Los porcentajes de SG remanente en los implantes de la formulación F-D, una vez insertados en fémur de conejos, se recogen en la tabla 33.

Tiempo (semanas)	% remanente				Media	s.d.
	I	II	III	IV		
0,286	74,0	91,9	89,0	89,0	86,0	8,1
1	79,3	75,0	79,1	85,9	79,8	4,51
2	66,1	46,0	63,0	50,2	56,3	9,73
4	29,1	23,7	15,2	53,6	30,4	16,5
6	35,3	21,2	4,15	42,7	25,8	17
8	7,00	16,0	13,0	6,63	10,7	4,6

**Tabla 33.-** Porcentajes remanentes de gentamicina en los implantes de la formulación F-D. Media  $\pm$  desviación estándar.

- **Gentamicina en hueso**

En las tablas 34, 35, 36 y 37 se recogen los niveles de gentamicina alcanzados en las distintas zonas del fémur a lo largo de 8 semanas tras la colocación de implantes de la formulación F-D.

Tiempo (semanas)	Metáfisis distal				Media	s.d.
	I	II	III	IV		
0,286	0	0	0	0	0	0
1	7,14	8,33	2,32	10,7	7,12	3,52
2	4,75	0,36	4,90	3,64	3,41	2,11
4	0,32	0,85	0,16	7,60	2,23	3,59
6	2,75	0,49	0,82	0	1,02	1,21
8	2,16	0,80	2,62	0,87	1,61	0,92

**Tabla 34.-** Niveles de gentamicina ( $\mu\text{g}$  de gentamicina/g de tejido) en la zona de metáfisis distal del fémur de conejos. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	Diáfisis distal				Media	s.d.
	I	II	III	IV		
0,286	0	0	0	0	0	0
1	21,4	9,41	17,2	21,3	17,3	5,63
2	29,5	2,70	4,31	17,3	13,2	12,8
4	0,53	20,5	2,24	0	5,82	9,83
6	1,98	1,8	0	2,94	1,68	1,23
8	0	16,9	0	0	4,23	8,45

**Tabla 35.-** Niveles de gentamicina ( $\mu\text{g}$  de gentamicina/g de tejido) en la zona de la diáfisis distal del fémur de conejos. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	Diáfisis proximal				Media	s.d.
	I	II	III	IV		
0,286	0	0	0	0	0	0
1	2,53	4,40	1,74	0	2,17	1,83
2	2,54	0	1,5	0	1,01	1,24
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0

**Tabla 36.-** Niveles de gentamicina ( $\mu\text{g}$  de gentamicina/g de tejido) en la zona de la diáfisis proximal del fémur de conejos. Media  $\pm$  desviación estándar.

Tiempo (semanas)	Metáfisis proximal				Media	s.d.
	I	II	III	IV		
0,286	0	0	0,94	0	0,235	0,47
1	0	0,39	0	0	0,098	0,195
2	0,18	0	0	0	0,045	0,09
4	0,12	0	0	0	0,03	0,06
6	0	0	0	1,71	0,428	0,855
8	0	0	0	0	0	0

**Tabla 37.-** Niveles de gentamicina ( $\mu\text{g}$  de gentamicina/g de tejido) en la zona de metáfisis proximal del fémur de conejos. Media  $\pm$  desviación estándar.

- **Gentamicina en suero y riñón**

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

Los niveles de gentamicina en riñón, expresados por gramo de tejido, obtenidos tras la colocación del implante de la formulación F-D, se encuentran

en la tabla 38. A tiempos cortos (2 días y 1 semana) y tiempos mayores de 4 semanas no se detectaron niveles.

Tiempo (semanas)	µg de gentamicina/g de tejido				Media	s.d.
	I	II	III	IV		
2	0,16	0,13	---	---	0,145	0,021
4	0,04	0,06	0,05	0,05	0,05	0,008

**Tabla 38.- Niveles de gentamicina en riñón. Media  $\pm$  desviación estándar.**

- **Control de la función renal**

En la tabla 39 se recogen los niveles de creatinina en suero correspondientes a los conejos implantados con la formulación F-D. El valor de concentración basal en los animales estudiados está comprendido entre 1,1 - 1,5 mg/dl, lo que concuerda con lo recogido en la bibliografía para conejos adultos: 0,8 - 1,8 mg/dl (Wolford et al., 1986).

Tiempo (semanas)	Concentración de creatinina en suero			
	I	II	III	IV
0,286	0,9 - 1,0	1,1 - 1,3	1,4 - 1,5	1,2 - 1,3
1	0,9 - 1,3	1,1 - 2,0	1,2 - 1,8	1,1 - 1,3
2	1,2 - 1,4	1,1 - 1,3	1,1 - 1,3	1,0 - 1,5
4	1,1 - 1,5	1,2 - 1,5	0,9 - 2,2	1,1 - 1,7
6	1,1 - 1,6	1,1 - 1,7	1,0 - 1,7	1,1 - 1,4
8	1,2 - 1,5	1,0 - 1,6	1,2 - 1,6	1,1 - 1,4

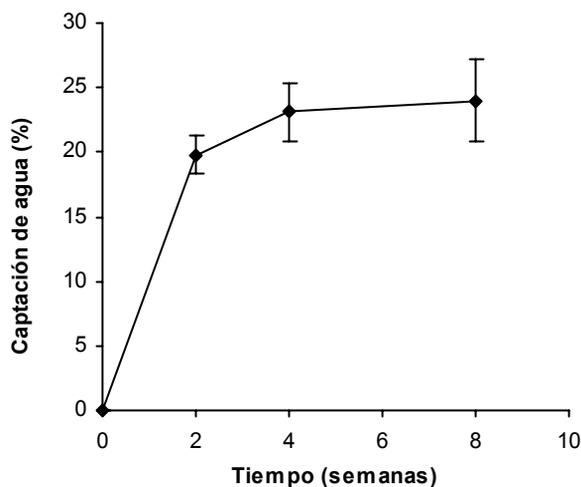
**Tabla 39.- Intervalos de concentraciones de creatinina en suero (mg/dl) de cada uno de los conejos durante el ensayo de cesión con la formulación F-D.**

## CAPTACIÓN DE AGUA Y PÉRDIDA DE PESO

En la tabla 40 se recoge los porcentajes de agua captada por los implantes de la formulación F-D y en la figura 78 su representación gráfica a lo largo de 8 semanas.

Tiempo (semanas)	Peso (húmedo) (mg)	Peso (seco) (mg)	Captación de agua (%)
2	370,3 ± 44,7	309,1 ± 37,7	19,8 ± 1,43
4	379,2 ± 49,7	308,2 ± 41,2	23,1 ± 2,30
8	428,1 ± 38,9	345,3 ± 30,0	24,0 ± 3,19

**Tabla 40.-** Pesos y porcentaje de agua captada por los implantes de la formulación F-D. Media ± desviación estándar (n = 12).

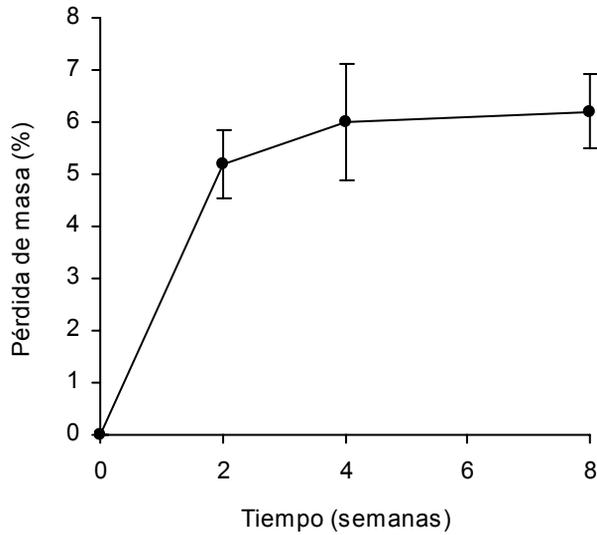


**Figura 78.-** Perfil de captación de agua de los implantes de la formulación F-D; cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo (n = 12).

Los porcentajes de pérdida de masa de los implantes F-D, corregidos por la cantidad cedida de SG, se recogen en la tabla 41 y su representación gráfica frente al tiempo en la figura 79.

Tiempo (semanas)	Peso (inicial) (mg)	P.Inicial - SG (mg)	Peso (seco) (mg)	Pérdida de masa (%)
2	329,9 ± 40,5	326,2 ± 40,5	309,1 ± 37,7	5,19 ± 0,64
4	334,0 ± 45,0	328,1 ± 45,0	308,2 ± 41,2	5,99 ± 1,11
8	376,7 ± 32,8	368,2 ± 32,8	345,3 ± 30,0	6,20 ± 0,70

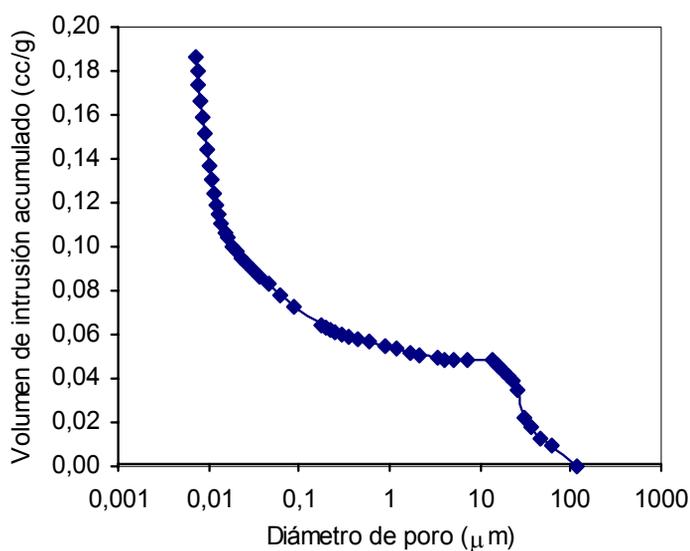
**Tabla 41.-** Pesos y porcentaje de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-D. Media ± desviación estándar (n = 12).



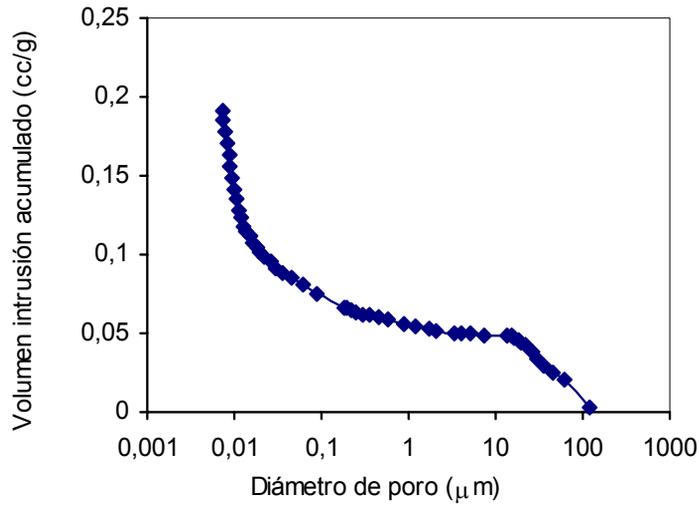
**Figura 79.-** Perfil de pérdida de masa de los implantes de la formulación F-D; cada punto representa el valor medio y desviación estándar para cada tiempo (n = 12).

## ESTRUCTURA DE LOS IMPLANTES

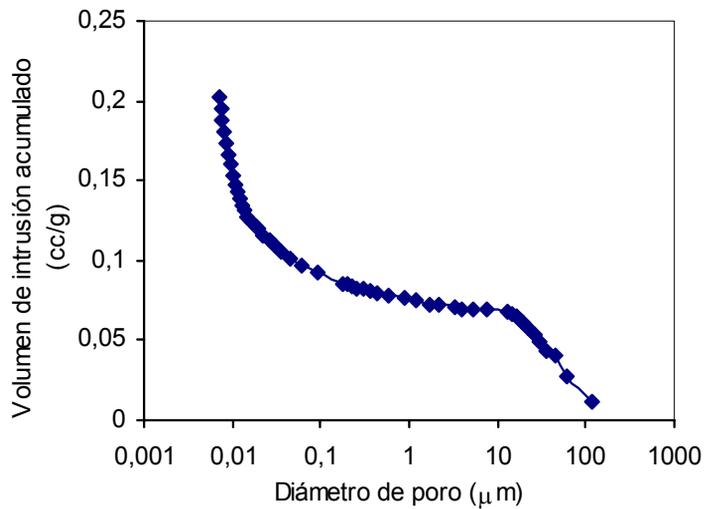
Las curvas de distribución de tamaño de poro a lo largo del ensayo de cesión *in vivo* para la formulación F-D, correspondientes a tiempos 2, 4 y 8 semanas, se recogen en las figuras 80, 81 y 82; en la tabla 42 se recoge el diámetro medio de poro y la porosidad a los tiempos mencionados para esta formulación.



**Figura 80.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-D después de 2 semanas de su colocación en el fémur de conejos.



**Figura 81.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-D después de 4 semanas de su colocación en el fémur de conejos.

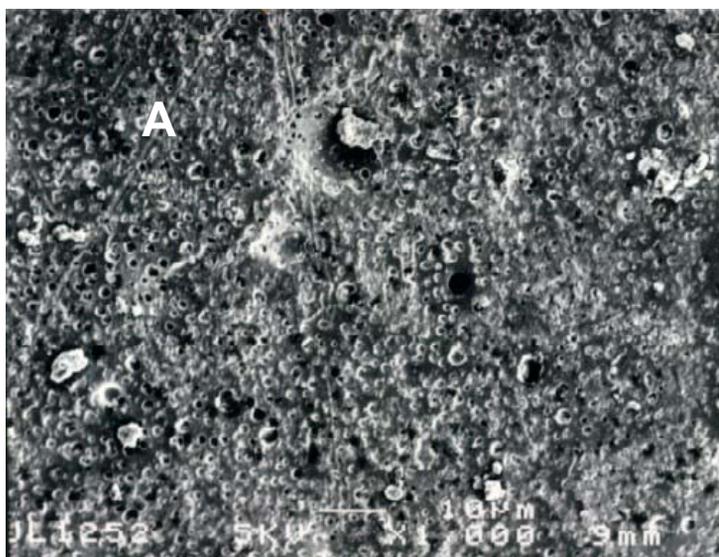


**Figura 82.-** Volumen de intrusión acumulado frente a diámetro de poro de los implantes F-D después de 8 semanas de su colocación en el fémur de conejos.

F-D		
Tiempo (semanas)	Diámetro medio de poro ( $\mu\text{m}$ )	Porosidad (%)
0	0,0256	19,9
2	0,0188	24,2
4	0,019	24,6
8	0,0225	24,2

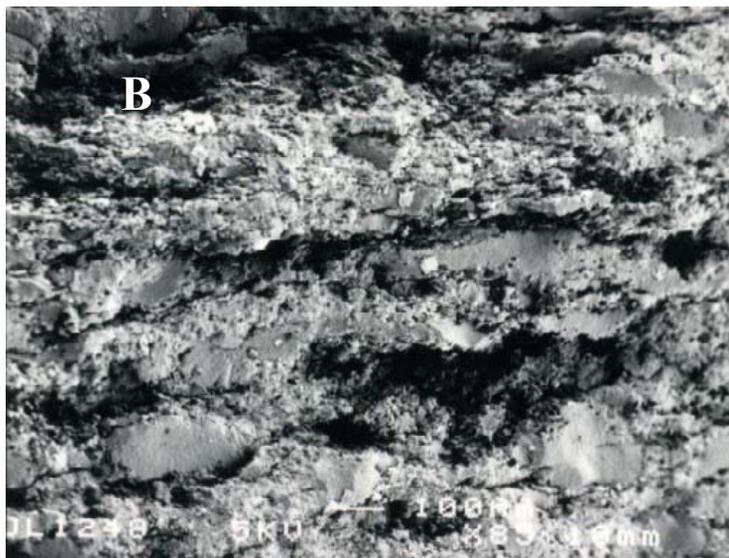
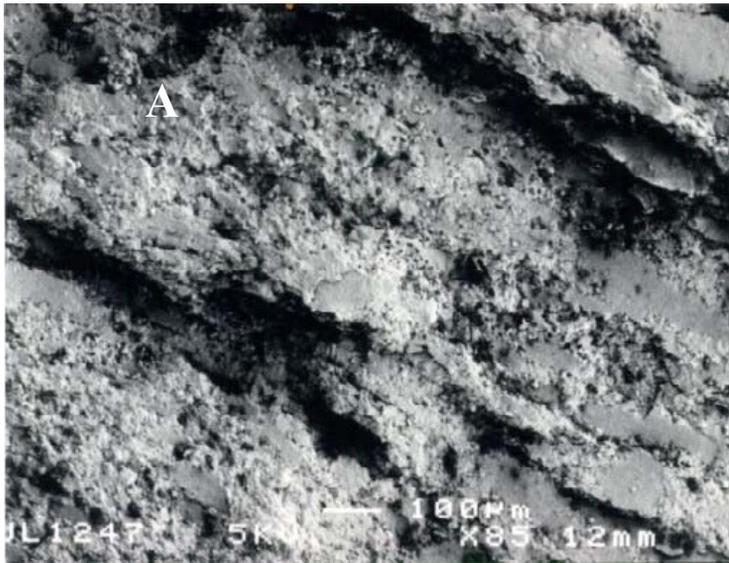
**Tabla 42.-** Diámetro medio de poro y porosidad de los implante de la formulación F-D a lo largo del ensayo *in vivo*.

En las figuras 83 y 84 se muestran las microfotografías realizadas por SEM a lo largo del ensayo de cesión, del implante completo y de las secciones transversales respectivamente, para la formulación F-D.





**Figura 83.-** Microfotografías del exterior del implante de la formulación F-D, a lo largo del ensayo *in vivo*. A,  $t = 2$  semanas; B,  $t = 4$  semanas; C,  $t = 8$  semanas.





**Figura 84.-** Microfotografías correspondientes al corte transversal de los implantes de la formulación F-D, a lo largo del ensayo in vivo. A,  $t = 2$  semanas; B,  $t = 4$  semanas; C,  $t = 8$  semanas.

## RESULTADOS DE DEGRADACIÓN

Los cambios sufridos por los polímeros y los restantes componentes de la formulación F-D, en el interior del fémur de conejos a lo largo de las ocho semanas que duró el ensayo, se evaluaron mediante la determinación de los pesos moleculares y la Tg de los mismos.

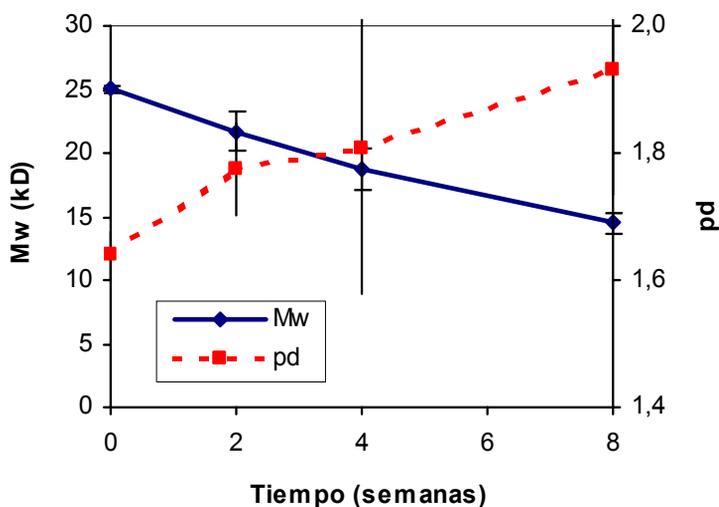
En las tablas 43 y 44 se recoge la evolución de los pesos moleculares medios en peso (Mw) y en número (Mn), así como la polidispersividad, correspondientes al dl-PLA-30 y dl-PLA-200 para la formulación F-D. La representación gráfica de la variación del peso molecular y polidispersividad de ambos polímeros se muestra en las figuras 85 y 86.

Tiempo (semanas)	Mw (kD)	Mn (kD)	pd
0	25,027 ± 0,258	15,280 ± 0,521	1,639 ± 0,039
2	21,711 ± 1,540	12,255 ± 1,370	1,776 ± 0,073
4	18,707 ± 1,625	10,493 ± 2,225	1,807 ± 0,228
8	14,503 ± 0,783	7,568 ± 1,178	1,932 ± 0,197

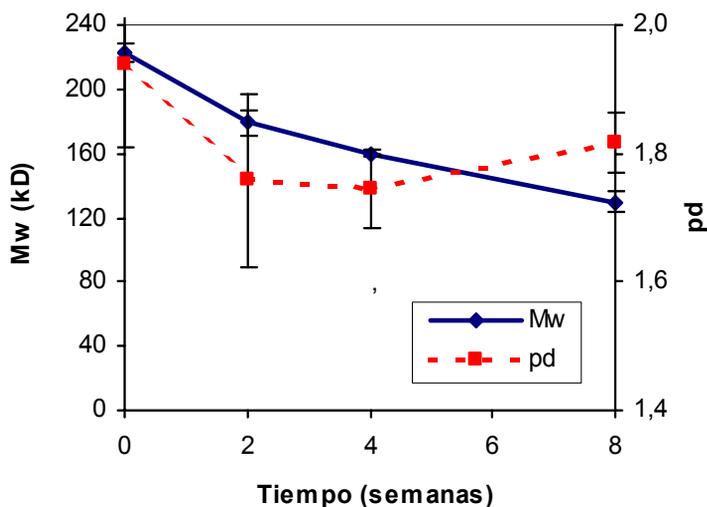
**Tabla 43.-** Evolución de los pesos moleculares y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión in vivo.

Tiempo (semanas)	Mw (kD)	Mn (kD)	pd
0	222,430 ± 5,735	114,988 ± 10,671	1,940 ± 0,130
2	179,055 ± 8,004	101,962 ± 3,243	1,758 ± 0,134
4	158,885 ± 0,273	91,117 ± 3,070	1,745 ± 0,062
8	129,470 ± 6,558	71,258 ± 1,775	1,816 ± 0,047

**Tabla 44.-** Evolución de los pesos moleculares y polidispersividad del PLA-200 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión in vivo.

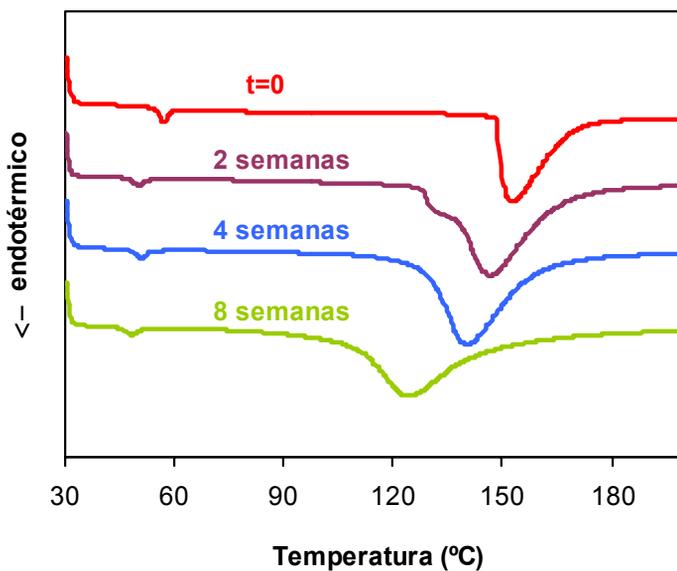


**Figura 85.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polidispersividad del PLA-30 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión in vivo.

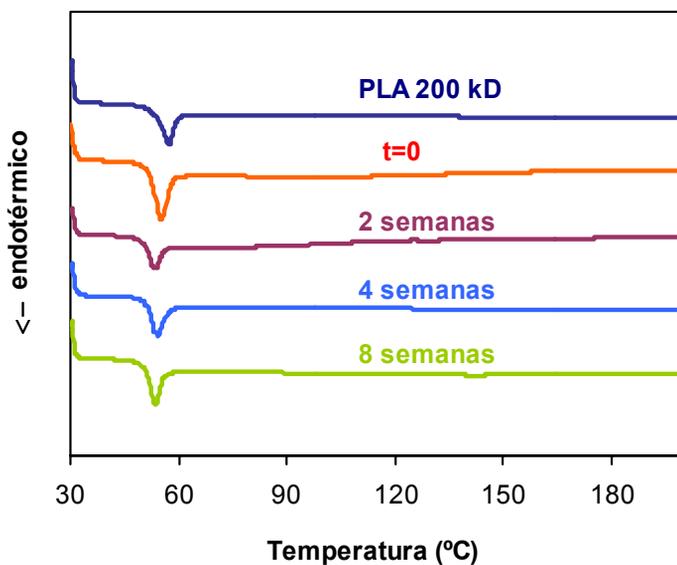


**Figura 86.-** Evolución del peso molecular medio en peso y polidispersividad del PLA-200 de la formulación F-D durante el ensayo de cesión *in vivo*.

En las figuras 87 y 88 se muestran los termogramas obtenidos por DSC a lo largo del ensayo de cesión *in vivo*, correspondientes al implante y cubierta respectivamente, de la formulación F-D. En la tabla 45 se recogen los valores de las  $T_g$  y áreas normalizadas de esta formulación, correspondientes a los mismos ensayos.



**Figura 87.-** Termogramas correspondientes a los implantes del lote F-D a lo largo del ensayo de cesión in vivo.



**Figura 88.-** Termogramas correspondientes al PLA-200 de la cubierta y su evolución durante el ensayo de cesión in vivo de los implantes del lote F-D.

Tiempo (semanas)	Componentes de la matriz				Cubierta	
	PLA-30		HAP/FTC		PLA-200	
	Tg (°C)	Área (J/g)	Tg (°C)	Área (J/g)	Tg (°C)	Área (J/g)
0	57,2	1,29	152,8	31,0	55,2	8,26
2	50,3	0,82	146,4	55,2	53,4	4,50
4	51,0	0,81	140,3	52,6	54,1	6,55
8	48,3	0,70	124,5	43,6	53,6	6,26

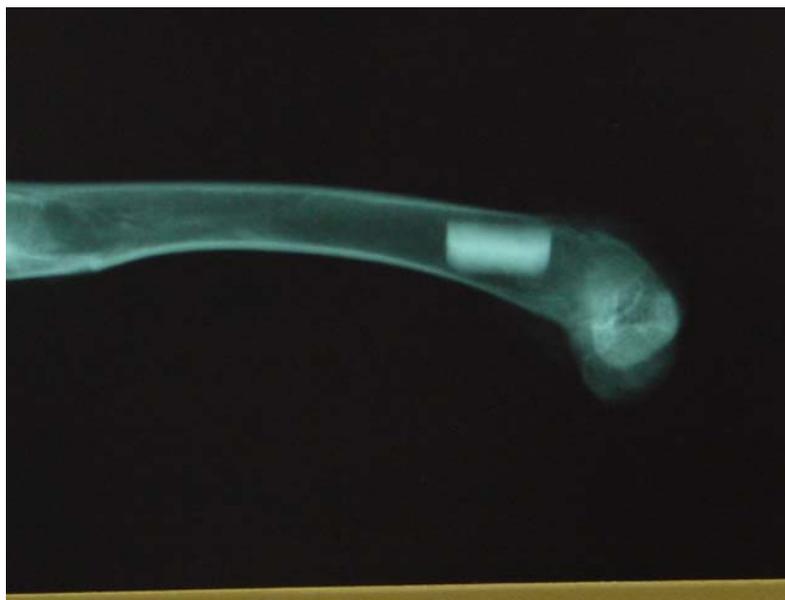
**Tabla 45.-** Evolución de la temperatura de transición vítrea (Tg) y área normalizada de los componentes de la matriz y de la cubierta de la formulación F-D durante el ensayo de cesión *in vivo*.

## RESULTADOS RADIOLÓGICOS

Las muestras reservadas para el estudio radiológico se analizaron a lo largo de 12 semanas tras la colocación del implante, apreciándose los siguientes resultados:

- ❖ 48 horas: se observa la presencia de un leve halo periimplante, posiblemente debido a la agresión quirúrgica. No hay reacción perióstica (Figura 89).
- ❖ 1 semana: el implante permanece intacto y bien diferenciado del hueso. No hay reacción perióstica y ha desaparecido el halo periimplante (Figura 90).
- ❖ 2 semanas: destaca la neoformación ósea periimplante. El implante se diferencia claramente del hueso, presentando una densidad mayor incluso que la de las corticales (Figura 91).
- ❖ 4 semanas: la densidad del implante se parece más a la de las corticales. No se observan tabiques ni espículas óseas que penetren en él, aunque la zona periférica aparece menos densa que la central (Figura 92).

- ❖ 6 semanas: vemos tejido óseo radiológicamente maduro que rodea al implante. Éste parece tener conexiones con la cortical posterior, no pudiendo delimitar claramente los límites entre ambos (Figura 93).
- ❖ 8 semanas: no se aprecian grandes cambios con respecto a la fase anterior, si bien la relación del implante con el hueso cortical es más evidente (Figura 94).
- ❖ 12 semanas: destaca la pérdida de densidad en la periferia del implante, como si se iniciara su disgregación. Se observan, aunque no claramente, la presencia de espículas que penetran en él, perpendiculares a su eje mayor (Figura 95).



**Figura 89** .-Rx obtenida a las 48 horas de la colocación del implante



**Figura 90.-** Rx obtenida a la semana de la colocación del implante



**Figura 91.-** Rx obtenida a las 2 semanas de la colocación del implante



**Figura 92.-** Rx obtenida a las 4 semanas de la colocación del implante



**Figura 93.-** Rx obtenida a las 6 semanas de la colocación del implante



**Figura 94.-** Rx obtenida a las 8 semanas de la colocación del implante

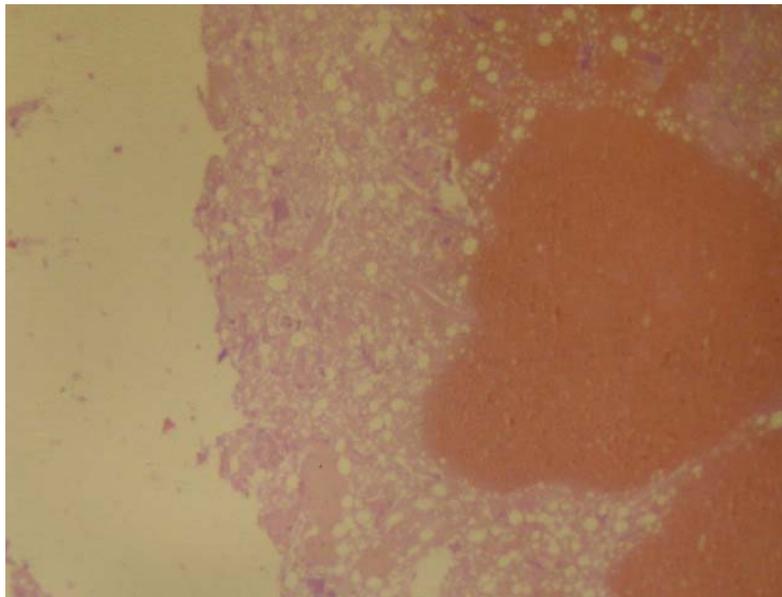


**Figura 95.-** Rx obtenida a las 12 semanas de la colocación del implante

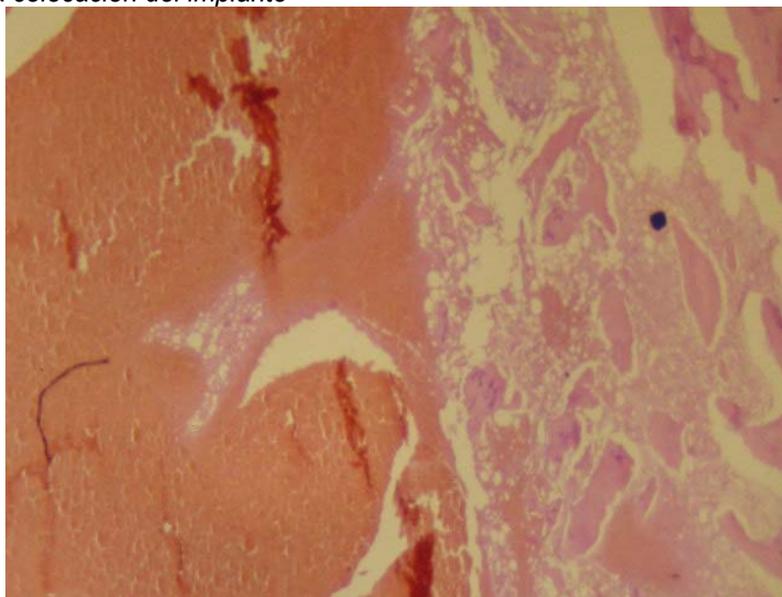
## RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Los resultados del análisis histológico de los huesos implantados se detallan a continuación:

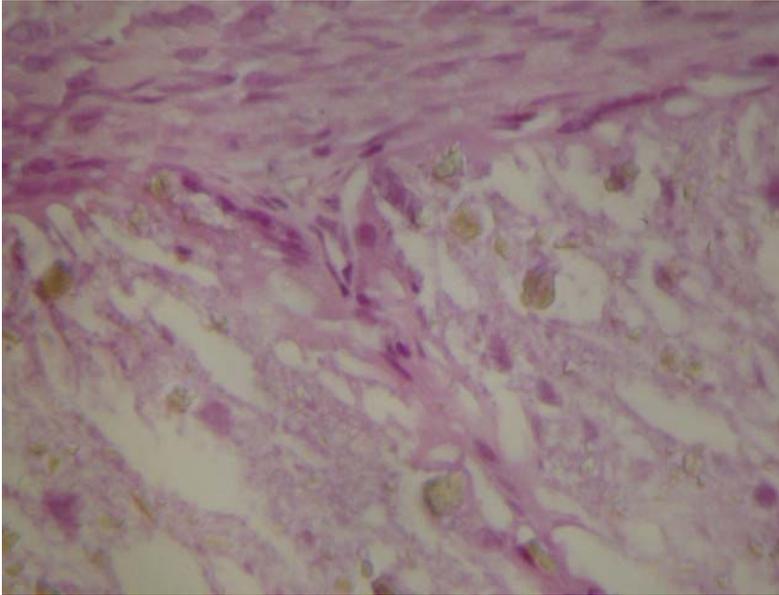
- ❖ 2 días: aparece un infarto hemorrágico periimplante, con fracturas de las trabéculas óseas y desestructuración del tejido óseo periimplante (Figuras 96 y 97).
- ❖ 1 semana: se aprecia tejido de granulación inmaduro periimplante (Figura 98).
- ❖ 2 semanas: es notable la presencia de tejido óseo inmaduro, periimplante, así como septos fibrosos que parecen profundizar en él (Figuras 99 y 100).
- ❖ 4 semanas: el tejido óseo que rodea al implante es un tejido óseo maduro (Figura 101).
- ❖ 6 semanas: aparece una delgada membrana de tejido conectivo-vascular periimplante (Figura 102).
- ❖ 8 semanas: hay una mínima respuesta conectivo-vascular periimplante, con zonas de calcificación intrainplante (Figura 103).
- ❖ 12 semanas: la respuesta conectivo-vascular periimplante es aún menor y han aumentado las calcificaciones intrainplante (Figura 104).



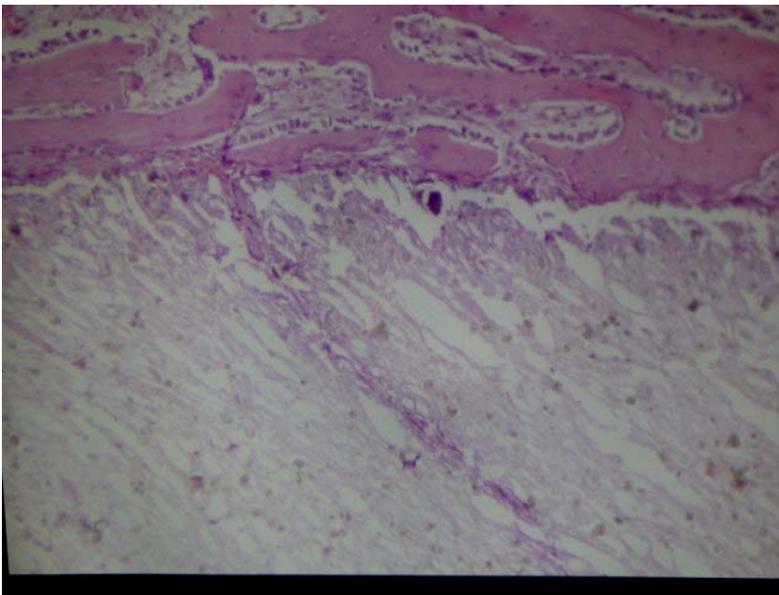
**Figura 96.-** Área de hemorragia y desestructuración del tejido óseo a los dos días de la colocación del implante



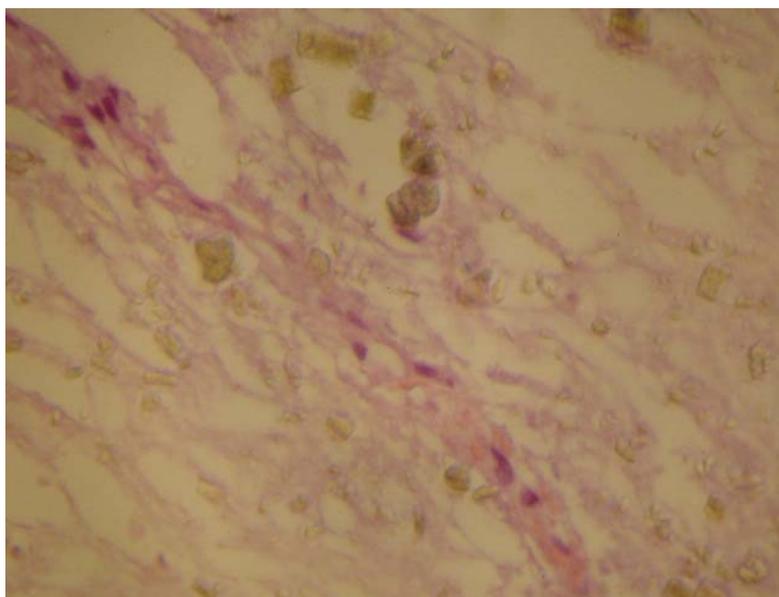
**Figura 97.-** Desestructuración del tejido óseo, a los dos días de la colocación del implante.



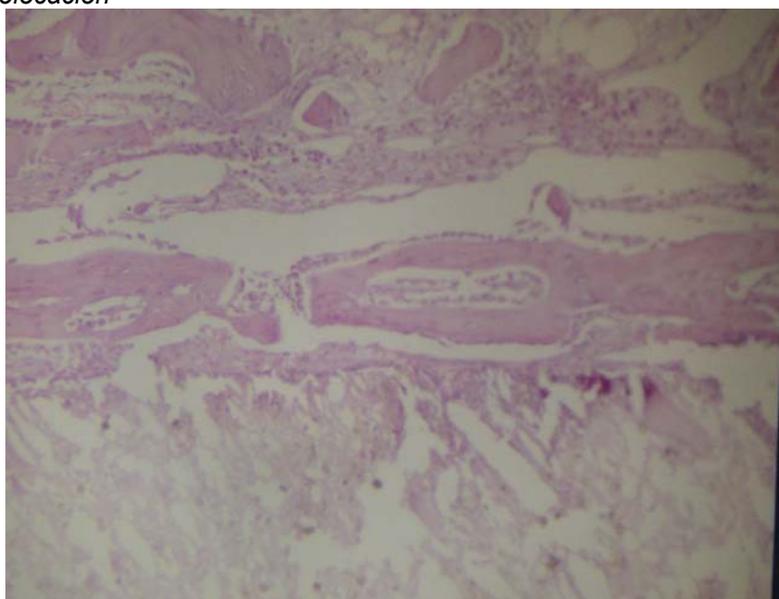
**Figura 98.-** Tejido de granulación periimplante, a la semana de su colocación



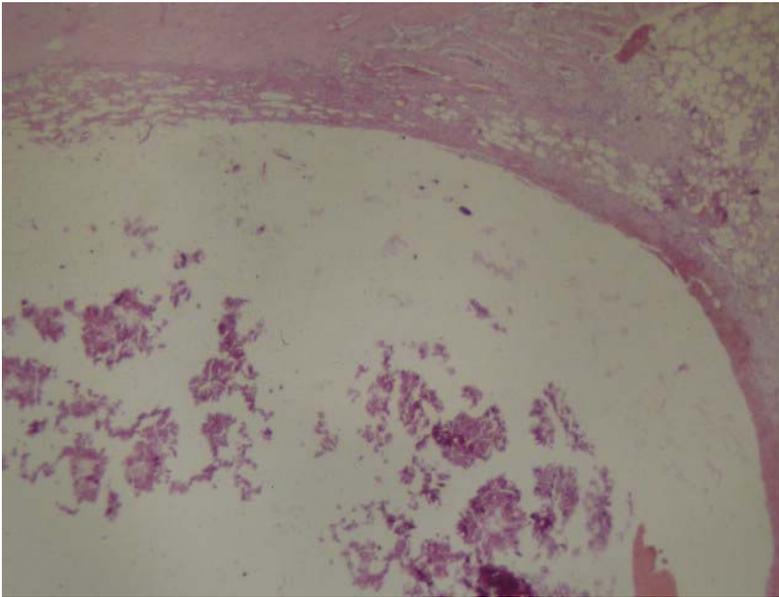
**Figura 99.-** Septo fibroso que penetra en el implante, a las dos semanas de su colocación. Éste aparece rodeado de tejido óseo inmaduro.



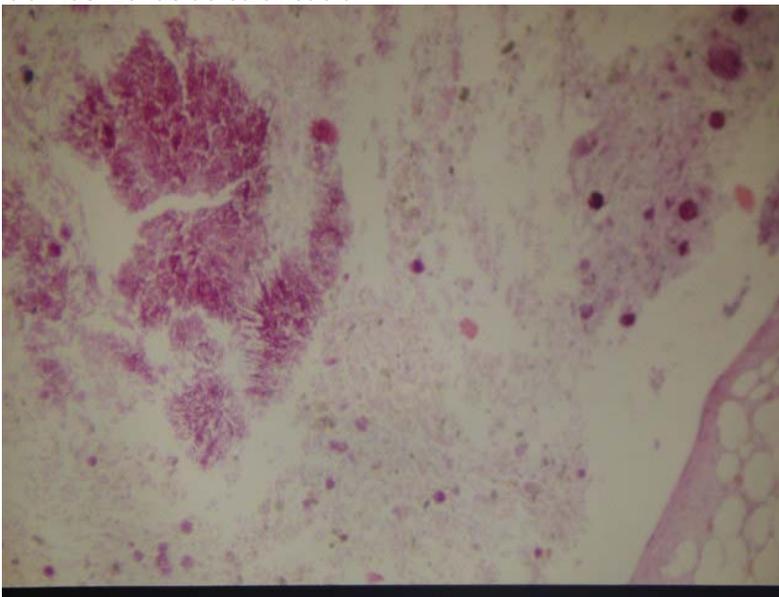
**Figura 100.-** Mayor detalle de un tracto fibrovascular, a las dos semanas de su colocación



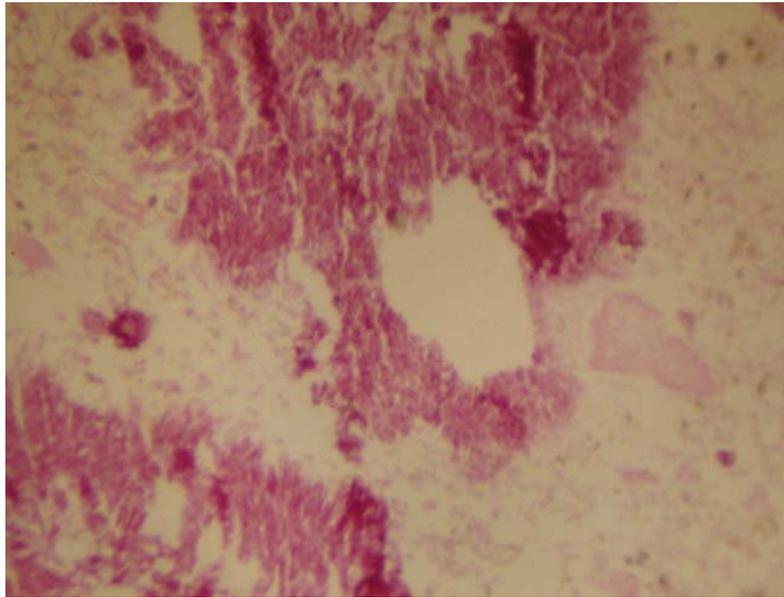
**Figura 101.-** Implante rodeado de tejido óseo maduro, a las 4 semanas de su colocación.



**Figura 102.-** Ligeramente membrana periimplante, a las seis semanas de su colocación. Se inician las zonas de calcificación.



**Figura 103.-** Implante con zonas de calcificación, a las ocho semanas de su colocación.



**Figura 104.-** *Implante con grandes áreas de calcificación a las 12 semanas de su colocación.*



## **DISCUSIÓN**



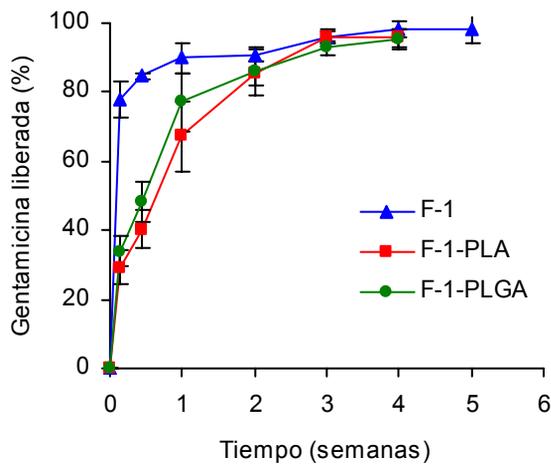
El trabajo que constituye esta tesis doctoral es parte de un proyecto de investigación destinado a la elaboración y optimización de sistemas de cesión controlada de antibióticos para el tratamiento de la osteomielitis. Previamente al estudio en ratas se había publicado un trabajo en el cual se elaboraron una serie de implantes (2,5 x 12 mm) a partir de fosfatos y polímeros biodegradables que fueron caracterizados desde un punto de vista morfológico, estructura interna, rayos X, reproducibilidad del método de elaboración, degradación y cesión *in vitro*. Los resultados obtenidos fueron comparados con una especialidad, Septopal<sup>®</sup>, que se encuentra actualmente en el mercado. Este primer trabajo permitió elegir el método de elaboración, la proporción de fosfatos óptima, HAP:FTC de 25:75 y la fuerza de compresión para alcanzar cesiones de gentamicina más prolongadas *in vitro* que la especialidad comercial.

## **ESTUDIO EN RATAS**

La primera parte de esta tesis consiste en la adaptación de la formulación elegida a un tamaño adecuado para su implantación en fémur de ratas (6 x 2,5 x 1mm) y el estudio de la cesión de gentamicina *in vitro* e *in vivo* así como, su valoración histológica y radiológica. Los resultados que se discuten en esta parte son los obtenidos con los implantes F-1, F-1-PLA y F-1-PLGA. Su composición, como se detalla en el apartado de Resultados, fue una mezcla de fosfatos (HAP:FTC = 25:75) y PLA-30 en una proporción 80:20 con un contenido en gentamicina del 3,5 %, sin recubrir F-1, y F-1-PLA y F-1-PLGA recubiertos con PLA-200 y PLGA-100, respectivamente.

### Ensayo de cesión de gentamicina *in vitro*

Los perfiles de cesión de gentamicina acumulada obtenidos con los implantes estudiados se muestran en la figura 105; aproximadamente un 30, 33 y 78% se cede en las primeras 24 horas desde los implantes F-1-PLA, F-1-PLGA y F-1, respectivamente. Se puede observar que el recubrimiento es



**Figura 105.-** Perfiles de cesión *in vitro* de gentamicina.

capaz de frenar la cesión inicial de gentamicina. En los tres primeros días tanto los implantes recubiertos con PLA como los cubiertos con PLGA ceden alrededor del 40 y 50%, respectivamente. Al cabo de una semana se cede entre un 60% (F-1-PLA) y un 70% (F-1-PLGA), mientras que los implantes sin recubrir han liberado el 95% de la dosis de SG. Aunque el PLA retrasa de forma más acusada que el PLGA la cesión, al cabo de 4 semanas se ha liberado prácticamente la totalidad de la dosis contenida en ambas formulaciones.

### **Ensayos *in vivo***

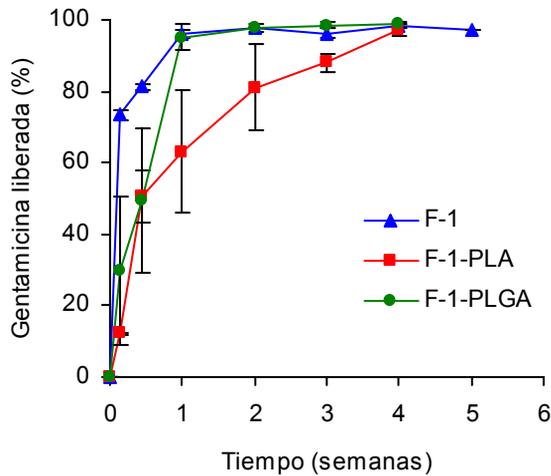
Una vez valorada la cesión de SG *in vitro* desde los implantes elaborados en esta parte de la memoria, F-1, F-1-PLA y F-1-PLGA, se procedió a su evaluación *in vivo*.

El primer paso fue optimizar la técnica quirúrgica. En las primeras intervenciones se siguió el método descrito por Thoma et al. (1991). Se abordaba la cara externa del tercio medio del fémur y se practicaba un defecto en la cortical externa para acceder a la medular. En dicho defecto se colocaba el implante y se procedía a la sutura por planos. Sin embargo, esta técnica se abandonó porque generalmente el fémur acababa fracturándose. Por este motivo se siguió definitivamente el método propuesto por Wei et al. (1991), en el que se accede a la medular a través de una artrotomía de rodilla, tal y como se describió en el apartado de Materiales y Método.

### **Ensayo de cesión en fémur de ratas**

Los perfiles de cesión de SG en hueso de ratas se encuentran reflejados en la figura 106. Las diferencias entre los tres tipos de implantes son mucho más apreciables *in vivo* que *in vitro*. El implante no recubierto (F-1) no es capaz de modular la cesión y presenta un perfil muy similar al observado *in vitro* es decir, al cabo de una semana se ha liberado la totalidad de la dosis. La cesión desde F-1-PLA y F-1-PLGA inicialmente es muy similar, durante los primeros tres días ceden aproximadamente el 50% de la dosis de SG. Sin embargo, a partir de este tiempo, la velocidad de cesión desde el implante F-1-PLGA se mantiene y en una semana se cede prácticamente toda la dosis de gentamicina. Por el contrario, los implantes recubiertos con PLA presentan un perfil de cesión bifásico, caracterizado por una primera fase con una velocidad de liberación elevada, similar a la mostrada por la F-1-PLGA en los tres primeros días y una segunda etapa, a partir de este tiempo,

con una velocidad de cesión mucho más lenta que permite una liberación gradual del antibiótico a lo largo de cuatro semanas.



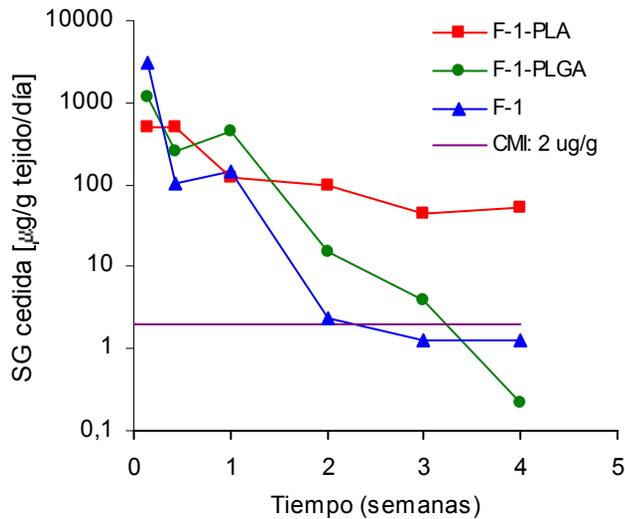
**Figura 106.-** Perfiles de cesión *in vivo* de gentamicina

Por tanto, el PLGA no resulta eficaz para controlar la cesión a largo plazo, como se puede observar en la figura 106. Al cabo de una semana los porcentajes de gentamicina cedidos desde los implantes no recubiertos y desde los implantes recubiertos con PLGA son muy próximos y rondan el 95%. El recubrimiento con PLA permite una liberación más sostenida del SG, siendo liberado el 95% de la dosis a lo largo de cuatro semanas.

Como ha sido puesto de manifiesto previamente por nuestro equipo de investigación (Soriano y Évora, 2000), el comportamiento de las películas de recubrimiento de PLA-200 y PLGA-100 *in vitro* es muy diferente. El PLGA es un polímero más hidrofílico y tiene una mayor capacidad para captar agua que el PLA lo que se traduce en una acusada degradación durante el ensayo de cesión. El peso molecular del PLGA disminuye rápidamente lo que lleva a un aumento de su hidrofilia intrínseca y por tanto a un incremento continuo de

su capacidad para captar agua del medio. El agua por su polaridad, su pequeño tamaño y su temperatura de transición vítrea baja, penetra en la estructura amorfa del polímero reduciendo el valor de la Tg de éste, actuando por tanto como plastificante. En el caso del PLGA su Tg disminuye incluso por debajo de la temperatura del medio, originando un estado gomoso con grandes incrementos en la movilidad molecular tanto del sólido como del agua lo que lleva a una destrucción rápida de la cubierta. Por el contrario, el PLA es un polímero más hidrofóbico y mantiene la estructura de la cubierta así como, su peso molecular y su Tg a lo largo del ensayo de cesión. Por ello la cesión de la gentamicina en este caso, está gobernada no sólo por la difusión a través de la matriz sino que también, debe estar implicado un proceso de difusión a través de la película de recubrimiento, lo que dificulta la liberación del antibiótico y favorece la cesión más sostenida de gentamicina desde los implantes recubiertos con el PLA.

Para evaluar la potencial eficacia de estos implantes en el tratamiento de la osteomielitis debemos tener en cuenta que las bacterias que más frecuentemente producen este tipo de infecciones son *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de gentamicina frente a estos microorganismos son: 0,03 - 0,12 µg/g frente al *S. aureus*, 0,25 – 1 µg/g para *E. coli* y 0,25 - 2 µg/g frente a *P. aeruginosa* (Lambert y O'Grady, 1992). En la figura 107 se muestra, en escala semilogarítmica, la cantidad de gentamicina disponible por gramo de tejido óseo frente al tiempo tras la administración de cada tipo de implante, conjuntamente con la CMI frente a *P. aeruginosa*, que es la más elevada. Como se puede apreciar, los implantes recubiertos con PLA (F-1-PLA) proporcionan niveles eficaces de gentamicina durante todo el ensayo, mientras que las concentraciones alcanzadas con los implantes sin recubrir y los recubiertos con PLGA disminuyen más rápidamente.



**Figura 107.-** Niveles de gentamicina en hueso obtenidos con las tres formulaciones estudiadas y CMI para *P. aeruginosa*.

### Correlación *in vitro* - *in vivo*

La relación encontrada entre los porcentajes de gentamicina cedida *in vitro* e *in vivo*, con los tres tipos de implantes, se encuentra representada en la figura 108. Como se puede observar en la tabla 46, las pendientes son próximas a la unidad, valor ideal para este tipo de comparaciones. Con objeto de valorar la bondad de la correlación se empleó el factor de similitud  $f_2$  propuesto por Moore y Flanner (1996) para comprobar la equivalencia de los perfiles de disolución *in vitro* de dos formulaciones. De acuerdo con estos autores, cuando los valores de  $f_2$  se encuentran en el intervalo entre 50 y 100 indican perfiles de disolución similares. Los resultados obtenidos para este factor (tabla 46) en la correlación establecida, son ligeramente superiores al valor mínimo de 50, lo que supone una buena correlación entre la cesión de gentamicina *in vitro* e *in vivo*.

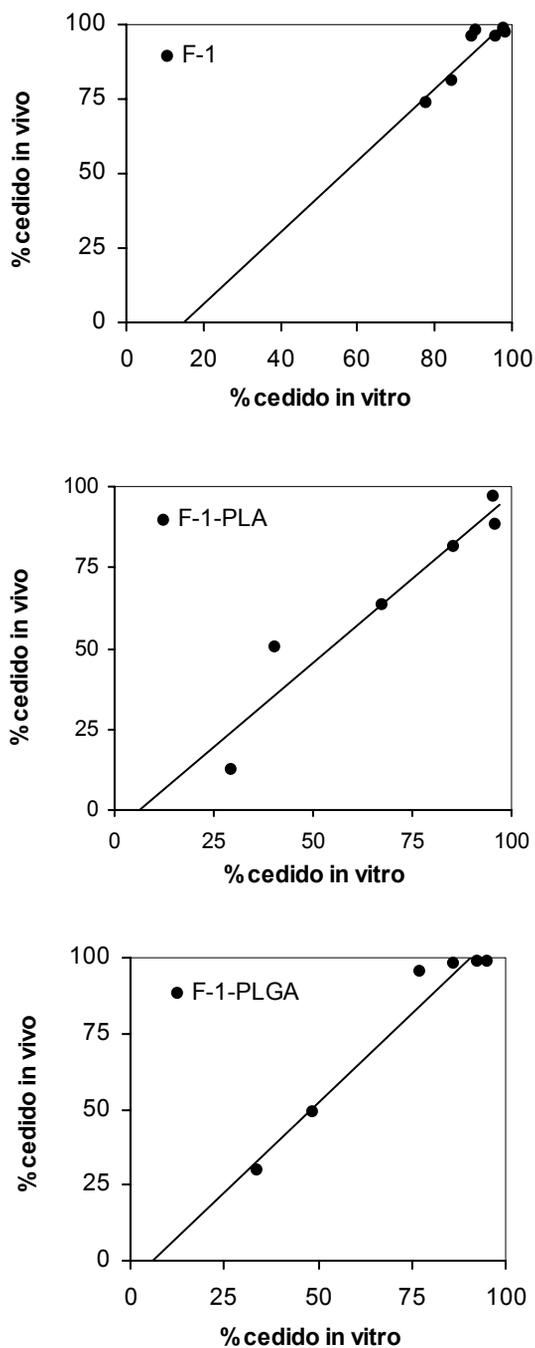


Figura 108.- Correlación in vitro-in vivo para las tres formulaciones.

	F-1	F-1-PLA	F-1-PLGA
$b_0$	- 17,32	- 6,23	- 6,99
$b_1$	1,19	1,04	1,18
$R^2$	0,821	0,914	0,955
$f_2$	66,6	53,0	51,4

**Tabla 46.-** *Parámetros de la relación lineal de la correlación in vivo-in vitro para las tres formulaciones;  $b_0$ , ordenada en el origen;  $b_1$ , pendiente;  $R^2$ , coeficiente de correlación lineal;  $f_2$ , factor de similitud.*

### Estudio radiológico y análisis histológico

Para explicar los cambios anatómo-histológicos secuenciales que se producen en el fémur implantado y puesto que existe una buena correlación entre los resultados radiológicos y morfológicos, de tal manera que la imagen radiológica traduce los cambios que son observados a nivel histológico, comentaremos conjuntamente los resultados de ambos análisis. Las reacciones observadas a lo largo de las dos primeras semanas de la implantación (Figuras 19 a 25 y 40 a 44) son muy similares para los tres tipos de implantes y son consecuencia fundamentalmente del efecto lesivo provocado por el acto quirúrgico. Se observa una desestructuración del tejido óseo, con trabéculas rotas junto con zonas hemorrágicas y células inflamatorias, apreciándose también un ligero halo radiolúcido en las primeras horas. La reacción inflamatoria desaparece rápidamente y los implantes son rodeados por fibroblastos e histiocitos. A lo largo de este periodo no se observa reacción perióstica y el halo periimplante va desapareciendo dando lugar a una neoformación ósea inmadura.

A partir de la segunda semana se aprecian diferencias en los implantes. Los no recubiertos (F-1) comienzan a fragmentarse; sin embargo, en los tres casos pueden observarse tractos conectivo-capilares y tabiques

óseos que atraviesan el implante. Se empieza a apreciar cómo los implantes son rodeados por tejido óseo maduro que se va haciendo más evidente a lo largo de la tercera semana (Figuras 26, 27 y 45).

A partir de este momento, se observan diferencias en los implantes; mientras los de la formulación F-1-PLA mantienen su integridad, los de la F-1 y F-1-PLGA se van fragmentando progresivamente si bien, desde un punto de vista radiológico e histológico se observa como los tractos que penetran en el implante se van osificando y calcificando. Los implantes se van integrando en el hueso circundante con densidad que se asemeja a la del hueso esponjoso. En las figuras 28 a 39 y 46 a 48 se muestra la evolución descrita; como se puede observar, la velocidad de este proceso es menor en los implantes de la formulación F-1-PLA, debido a que la película de PLA que los rodea se degrada más lentamente que la de PLGA que recubre a los de la formulación F-1-PLGA.

## ESTUDIO EN CONEJOS

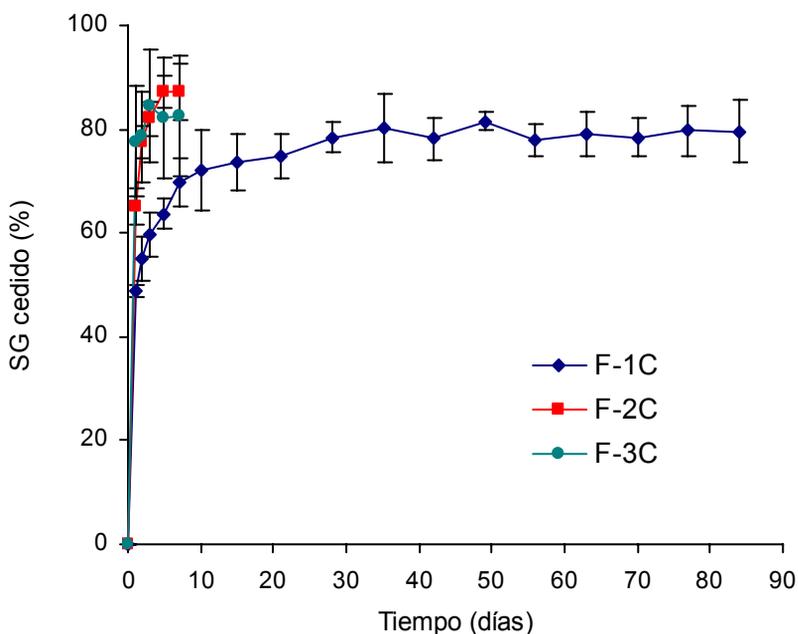
En este apartado comentaremos los resultados obtenidos a partir de los implantes elaborados para ser introducidos quirúrgicamente en el fémur de conejos.

La realización de este estudio en otra especie animal implica un cambio de escala que en parte, fue impuesto por la dificultad tecnológica que conlleva la elaboración de implantes de tamaño tan pequeño como el requerido para insertar en hueso de ratas. Esto dificulta además el estudio de los factores que gobiernan la cesión del antibiótico desde este tipo de sistemas de liberación de fármacos.

### Estudio preliminar

Antes de proceder a elaborar los implantes de acuerdo con el diseño experimental planteado se llevó a cabo un estudio preliminar en el que se elaboraron tres formulaciones: F-1C, F-2C y F-3C, cuya composición se detalla en la tabla 14, con el fin de conocer el efecto de la carga y del peso molecular del polímero sobre la liberación del antibiótico. Brevemente, los implantes F-1C están formulados con una relación, polímero (PLA-30): fosfatos de 20:80, mientras que las formulaciones F-2C y F-3C contienen una relación 50/50 con PLA-30 y PLA-200 respectivamente. Los tres tipos de implantes se elaboraron con un 3,5 % de SG y la relación HAP/FTC se mantuvo en un 25/75. La incorporación de una mayor proporción de polímero dificulta la elaboración de los implantes, el proceso de granulado es más engorroso y la distribución del tamaño de gránulo resultante mucho más dispersa. Como puede verse en la tabla 14, el rendimiento de incorporación de gentamicina se reduce de forma significativa. Por otro lado, como se puede observar en la figura 109, donde se reflejan los perfiles de cesión *in vitro* de los tres tipos de implantes, el aumento del porcentaje de polímero en

la composición no retrasa la cesión de gentamicina, incluso hay que indicar que la formulación F-3C, elaborada con el polímero de mayor peso molecular, es la que más rápidamente se cede a pesar de incorporar un menor porcentaje de gentamicina.



**Figura 109.-** Perfiles de cesión in vitro de los implantes del estudio preliminar.

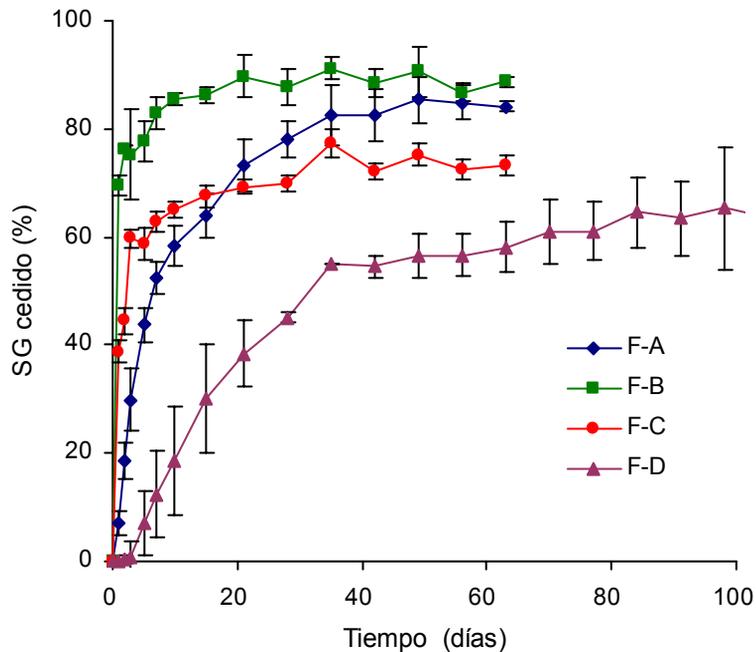
**Diseño experimental**

De acuerdo con estos resultados, se plantea la elaboración de una serie de implantes según un diseño experimental tipo Hadamard que nos va a permitir estudiar la influencia de la carga de gentamicina, el peso molecular del polímero y la presencia de la película de recubrimiento con PLA-200 sobre la liberación del SG desde estos sistemas. En concreto se elaboraron cuatro formulaciones: F-A (7% de SG; con recubrimiento), F-B (7% de SG; sin

recubrimiento), F-C (3,5% de SG; sin recubrimiento) y F-D (3,5% de SG; con recubrimiento), manteniendo la relación 25:75 de HAP:FTC y 20:80 de polímero: fosfatos y cuyas características se recogen en la tabla 18.

### Ensayo de cesión *in vitro*

En la figura 110 se encuentran representadas las curvas de porcentaje cedido de SG desde las cuatro formulaciones elaboradas.



**Figura 110.-** Perfiles de cesión *in vitro* de los implantes del diseño de Hadamard

A simple vista se aprecia que la presencia de la película de PLA-200 retrasa considerablemente la cesión de gentamicina. Los perfiles de cesión de SG presentan dos fases, una primera fase más rápida y la segunda mucho más lenta. Las formulaciones F-B y F-C liberan a tiempos cortos una importante cantidad de antibiótico mientras que las dos formulaciones

recubiertas F-A y F-D presentan una cesión inmediata controlada. La curva de cesión de la formulación F-A se caracteriza por una primera fase de aproximadamente una semana, en la que se libera alrededor del 50% de la dosis incorporada y una segunda fase de unas cinco semanas, mucho más lenta, en la que solo se cede un 30% más de antibiótico. El perfil de cesión del SG desde los implantes F-D, podríamos decir que se caracteriza por la presencia de tres fases, una primera fase de aproximadamente una semana en la que el porcentaje total de gentamicina cedido es de aproximadamente un 12%, una segunda fase de unas cuatro semanas en las que se libera alrededor de un 40% más y una tercera fase en la que la velocidad vuelve a disminuir a aproximadamente un 1%/semana.

Es de destacar que en ninguno de los casos se libera la totalidad de la dosis incorporada, siendo este hecho más notable en el caso de los implantes F-D que es una de las formulaciones recubiertas y con un porcentaje de gentamicina mínimo que corresponde a un 3,1%.

Como hemos comentado anteriormente, la matriz de Hadamard empleada en el diseño experimental nos va a permitir conocer la influencia de las variables incluidas en la elaboración de las formulaciones, porcentaje de SG, peso molecular del PLA constituyente de la matriz y presencia o no de la película de PLA-200 de recubrimiento, sobre el porcentaje de gentamicina cedido a lo largo de la primera semana y sobre el porcentaje cedido entre la primera y la sexta semana. En la tabla 47 se recogen los valores obtenidos de estos dos parámetros para las cuatro formulaciones ensayadas.

La elección de estos dos parámetros se llevó a cabo teniendo en cuenta que la liberación de elevadas cantidades del antibiótico lleva por un lado, el riesgo de nefro y ototoxicidad asociado a la gentamicina y por otro, la pérdida importante de dosis en el sistema que puede suponer su ineficacia terapéutica. De la observación de la figura 110 se puede deducir que tanto la cantidad cedida de antibiótico en la primera semana, como la remanente en el

sistema a lo largo de 5 semanas más, nos permite definir la curva de cesión y en principio prever su toxicidad y eficacia.

Formulación	% cedido 1ª semana	% cedido 1ª-6ª semana
F-A	52,46	30,02
F-B	82,90	5,40
F-C	62,78	9,41
F-D	12,33	42,35

**Tabla 47.-** Valores obtenidos de los parámetros a optimizar para las cuatro formulaciones.

Las ecuaciones resultantes fueron:

$$\% \text{ cedido en la 1ª semana} = 52,6 + 15,06 P_1 + 5,0 P_2 - 20,2 P_3 \quad (\text{ec. 7})$$

$$\% \text{ cedido entre 1ª y 6ª semana} = 22,25 - 4,24 P_1 - 2,25 P_2 + 14,25 P_3 \quad (\text{ec. 8})$$

siendo  $P_1$  = % gentamicina incluido en la formulación

$P_2$  = Peso molecular del polímero de la matriz

$P_3$  = La presencia de película de recubrimiento

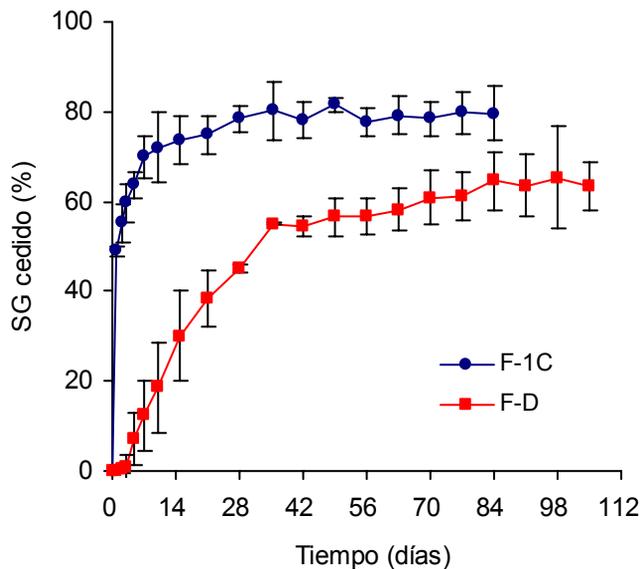
La ecuación 7 nos muestra la influencia positiva del contenido de gentamicina y del peso molecular del PLA sobre la cantidad de SG liberada desde los cuatro tipos de implantes y cómo la presencia de la película de recubrimiento frena la cesión del antibiótico en esta primera fase. Estos resultados eran totalmente previsibles teniendo en cuenta los resultados

obtenidos en el ensayo preliminar con PLA-30 y PLA-200 por un lado y por otro, como cabe esperar en estos sistemas a mayor carga, mayor velocidad de cesión y la presencia de un recubrimiento de polímero llevaría a una reducción de la cesión del fármaco. Sin embargo la influencia de estas variables sobre el porcentaje de SG liberado entre la 1ª y 6ª semana, a la vista de la ecuación 8 parece indicar un cambio de sentido de las variables; el contenido en gentamicina y el peso molecular reducirían el porcentaje cedido mientras que la película de recubrimiento favorece la liberación del antibiótico. Antes de aceptar estas conclusiones es necesario volver a analizar las curvas de cesión recogidas en la figura 110; nos estamos refiriendo fundamentalmente al porcentaje remanente de antibiótico en el implante después de la primera semana. Las formulaciones F-B y F-C han cedido gran parte de la dosis incorporada, por lo que a partir de este tiempo el contenido de estos implantes sería menor que el de F-A y F-D y esto explicaría el cambio de sentido de su influencia sobre la cesión. En lo referente al peso molecular del polímero constituyente de la matriz, como ya habíamos observado en el estudio preliminar con implantes no recubiertos, cuanto mayor es el peso molecular del PLA mayor cesión inmediata. Así una vez liberada la gentamicina no disuelta en el polímero, que es mayor a medida que aumenta el peso molecular del PLA, el antibiótico disuelto en el polímero si va a ver reducida su velocidad de cesión y probablemente de forma más acusada cuanto mayor es el peso molecular del polímero. En cuanto a la influencia del recubrimiento a pesar de ese signo positivo, que nos indicaría mayor cesión en presencia del recubrimiento, creemos que también es principalmente debido a una mayor cantidad de gentamicina remanente que en términos absolutos da lugar a una mayor cantidad de fármaco disponible para cederse.

De acuerdo con estos resultados, principalmente los que se refieren a la primera semana de cesión *in vitro* y teniendo en cuenta que en el estudio

en ratas la liberación de la gentamicina resultó ser más rápida *in vivo* que *in vitro*, elegimos la formulación F-D para ser ensayada *in vivo*. La formulación F-A podía haber sido también candidata a este ensayo, pero su cesión inicial se aleja mucho del objetivo perseguido.

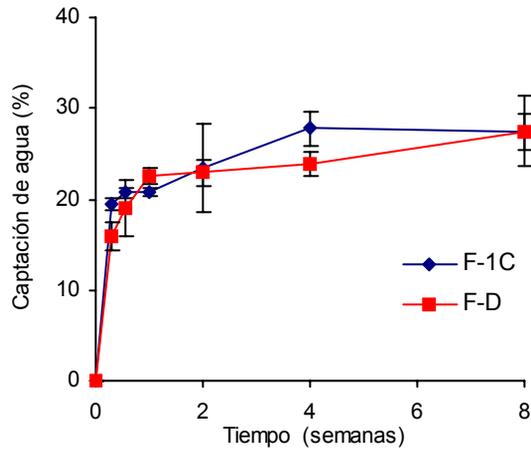
La formulación F-D junto con la F-1C (elaborada para el estudio preliminar) y que está igualmente formulada excepto que no está recubierta, han sido objeto de un estudio *in vitro* más exhaustivo para intentar clarificar el mecanismo de cesión de la gentamicina desde estos implantes. En la figura 111 se representan ambas curvas de cesión, en las que se puede observar el retraso en la cesión que ejerce la película de recubrimiento.



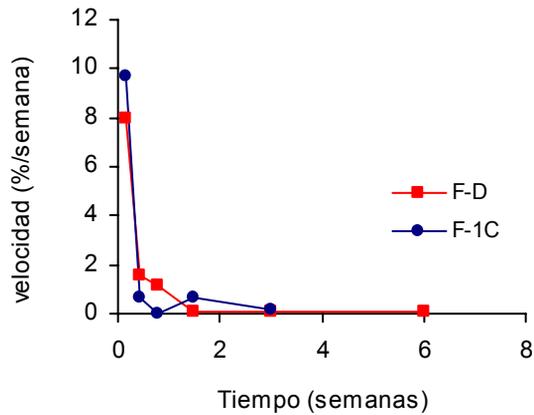
**Figura 111.-** Perfiles de cesión *in vitro*

En la figura 112 se puede apreciar que no hay diferencias importantes en el perfil de captación de agua entre la formulación recubierta (F-D) y la no recubierta (F-1C). Sin embargo, si observamos la figura 113, donde se

representan los resultados de este ensayo, expresadas en velocidad, vemos que inicialmente, la formulación F-1C capta agua más rápidamente, lo que en parte podría justificar la liberación del 50% de su contenido en los dos primeros días.

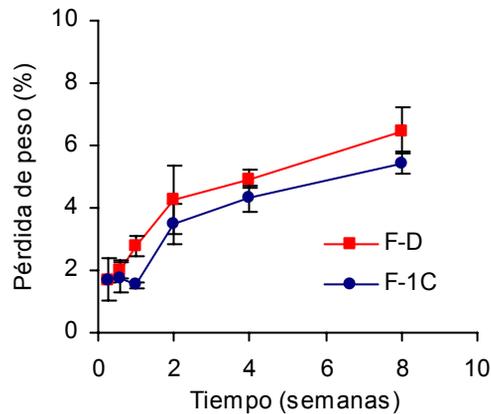


**Figura 112.-** Correlación de captación de agua in vitro de F-D y F-1C



**Figura 113.-** Perfil de velocidad de captación de agua in vitro de F-D y F-1C

En cuanto a la pérdida de masa, en la figura 114 observamos que las diferencias entre ambas formulaciones se empiezan a apreciar a partir de la primera semana, siendo ligeramente superior con la formulación F-D.



**Figura 114.-** Perfiles de pérdida de masa *in vitro* de F-D y F-1C

Esta mayor pérdida de masa en los implantes recubiertos sólo puede ser explicada a partir de los resultados obtenidos tras los análisis llevados a cabo con DSC y GPC. Los termogramas obtenidos con ambas formulaciones a lo largo de los ensayos de cesión no muestran diferencias apreciables en cuanto a las Tg de los polímeros empleados en su elaboración. Tanto el PLA-30, polímero constituyente de la matriz, como el PLA-200, polímero de recubrimiento, no modifican su Tg a lo largo de las 8 semanas que se mantuvo el ensayo. Sin embargo, la mezcla de fosfatos debe sufrir alguna transformación puesto que se produce una ligera deformación del pico y un desplazamiento hacia temperaturas ligeramente inferiores (Figuras 75, 76 y 77). Este fenómeno se aprecia por igual con ambas formulaciones por tanto no cabe esperar que afecte a la cesión del antibiótico. Los resultados del análisis de la evolución de la distribución de los pesos moleculares de los

polímeros indican que éstos prácticamente no se modifican a lo largo del ensayo de cesión (tablas 28 y 30). Sin embargo, si analizamos la evolución del polímero de recubrimiento podemos apreciar un ligero descenso de su peso molecular acompañado de una disminución de su polidispersividad, de forma bastante acusada tras dos semanas de incubación (tabla 29), lo que podría explicar la mayor pérdida de masa de la F-D, como consecuencia de la pérdida de los fragmentos más pequeños solubles en agua, pero que no afectan a la estructura global del polímero. Estos resultados se ven respaldados por las observaciones realizadas por SEM. Tanto los implantes recubiertos, como los no recubiertos mantienen su estructura a lo largo del ensayo de cesión *in vitro*. Los implantes recubiertos muestran una película porosa externa en la que prácticamente no se observan diferencias a lo largo de 8 semanas (Figura 68). La superficie de los no recubiertos es rugosa y tampoco parece que sufra alteraciones importantes (Figura 70). Aproximadamente a las 8 semanas se pueden apreciar unas pequeñas grietas que, difícilmente influyen en la cesión del antibiótico desde la formulación F-1C, ya que la mayor parte de éste se libera a tiempos cortos. Las microfotografías de los cortes transversales de ambas formulaciones son bastante similares (Figuras 69 y 71); puede apreciarse una ligera erosión con el tiempo pero estas diferencias no justifican las encontradas en la cesión del antibiótico.

Como hemos recogido en el capítulo de resultados (tabla 27), la porosidad inicial de los implantes recubiertos es mayor que la de los no recubiertos, evidentemente debido a la porosidad de la película de polímero como se puede apreciar en la microfotografía obtenida por SEM (Figura 68). Sin embargo, al cabo de dos semanas de incubación en el medio de cesión se aprecia un aumento de la porosidad de ambas formulaciones, de forma más acusada en la F-1C. La porosidad de la formulación no recubierta, a las dos semanas, es aproximadamente tres veces superior a la medida a tiempo

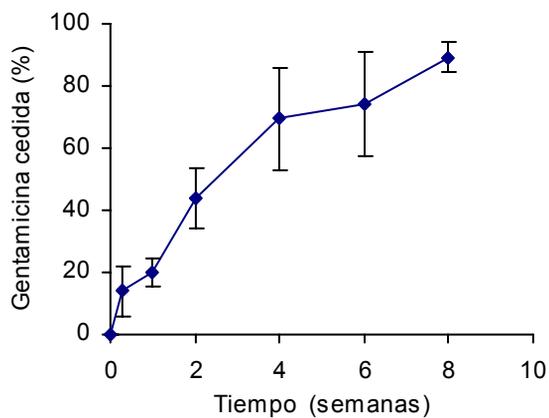
cero, consecuencia de la liberación de la mayor parte de la dosis de gentamicina (75%) contenida en estos implantes. No obstante, el aumento de la porosidad de la formulación F-D es mucho menos acusado; a las dos semanas se ha incrementado en 1,5 veces su valor inicial, resultados que se correlacionan con las diferencias apreciadas en los porcentajes cedidos. Por tanto, las diferencias observadas en la porosidad de los implantes a lo largo de los ensayos de cesión vienen justificadas únicamente por la distinta velocidad de cesión de la gentamicina, puesto que de acuerdo con los resultados de SEM, DSC y GPC, no parece que se produzca un aumento de la porosidad por pérdida de los excipientes constituyentes de la matriz o por deterioro de la película de recubrimiento.

A la vista de estos resultados podemos decir que la cesión de la gentamicina desde ambas formulaciones viene determinada por la entrada de medio líquido, la rápida disolución de la gentamicina y su difusión a través de la matriz. En el caso de la formulación F-1C la gentamicina difundiría directamente al medio de cesión, mientras que el antibiótico que ha difundido desde la matriz de la formulación F-D, se concentra en la interfaz matriz/película de recubrimiento y abandona el sistema por dos mecanismos. Parte de la gentamicina se libera a través de los poros de la película, pero cierto porcentaje debe difundir a través de la misma, lo que explicaría la cesión más lenta del antibiótico.

### **Ensayo de cesión *in vivo***

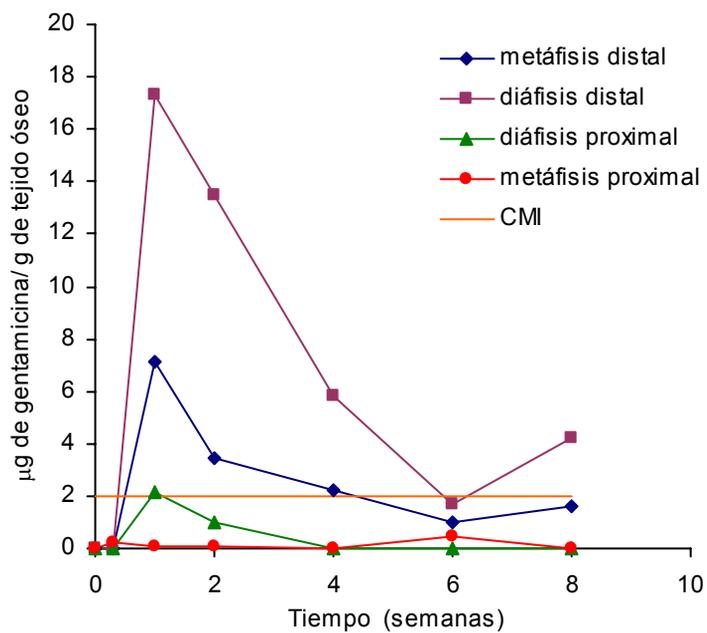
Los ensayos en conejos se prolongaron durante 8 semanas, ya que transcurrido este tiempo el 90 % de la dosis de gentamicina ha sido liberada desde los implantes insertados en el fémur de los animales (Figura 115). Por tanto, hemos alcanzado el objetivo planteado en esta memoria que era la elaboración de implantes que cedan el antibiótico durante al menos 4-6

semanas para alcanzar y mantener concentraciones eficaces en el foco de infección.

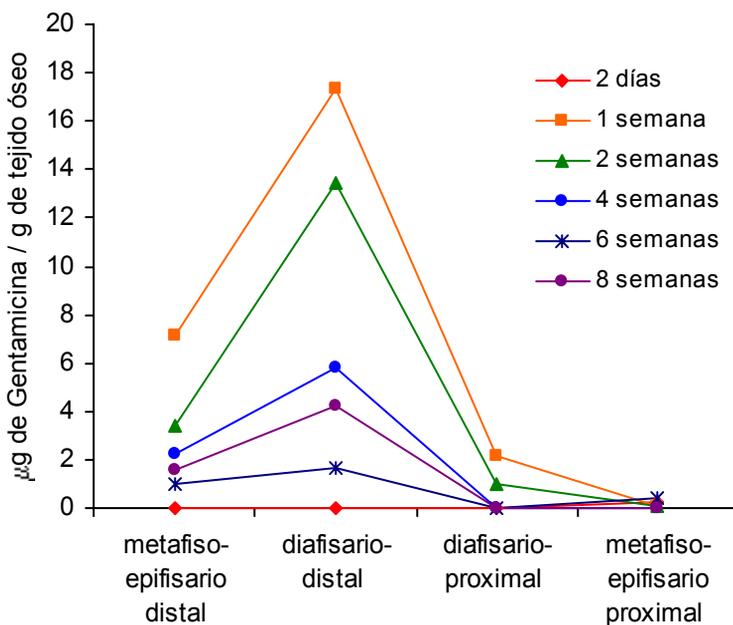


**Figura 115.-** Perfil de cesión in vivo a partir de la formulación F-D

En la figura 116 se encuentran representadas las concentraciones de gentamicina alcanzadas en las distintas zonas muestreadas del fémur a lo largo de las 8 semanas. Los niveles más elevados 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 (Figura 117).



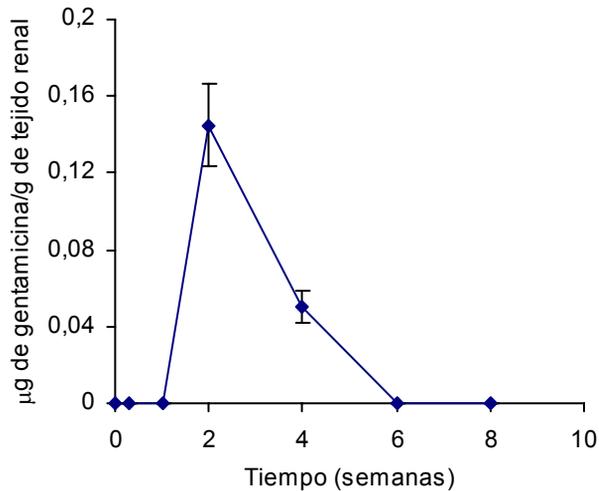
**Figura 116.-** Evolución temporal de los niveles de gentamicina en las distintas regiones del fémur.



**Figura 117.- Niveles de gentamicina en las distintas regiones del fémur**

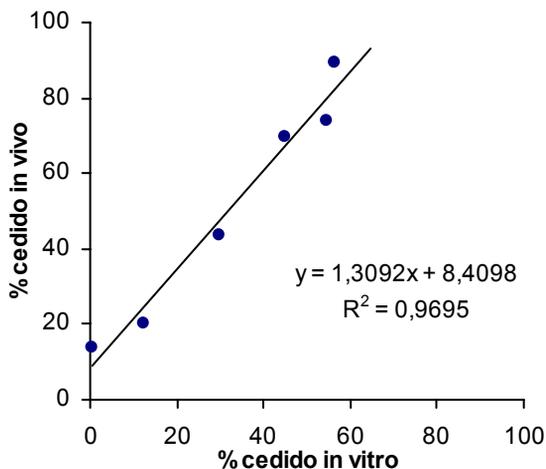
La elevada solubilidad en agua de la gentamicina es uno de los inconvenientes que hemos encontrado para controlar su liberación desde los implantes elaborados. De hecho el método de incorporación del antibiótico utilizado, preparación de una emulsión con el polímero y su posterior mezcla con la pasta de fosfato, fue una estrategia para retrasar su cesión. Así, como se puede apreciar en la figura 116, la gentamicina una vez cedida desde el implante es rápidamente arrastrada del hueso por el torrente circulatorio y eliminada. En los experimentos realizados se ha llevado siempre un control de los niveles de antibiótico en plasma sin embargo, a lo largo del ensayo nunca pudimos detectar concentraciones de gentamicina con el método microbiológico empleado.

Uno de los mayores problemas de los aminoglucósidos es su nefrotoxicidad, consecuencia de su acumulación en riñón sin embargo, como se observa en la figura 118, las concentraciones valoradas son muy bajas y a partir de las cuatro semanas, indetectables. Estos resultados se confirman al determinar la función renal a través de las concentraciones de creatinina en suero; todos los conejos mantuvieron niveles entre 1,1 - 1,5 mg/dl, que se encuentran dentro del intervalo de normalidad.



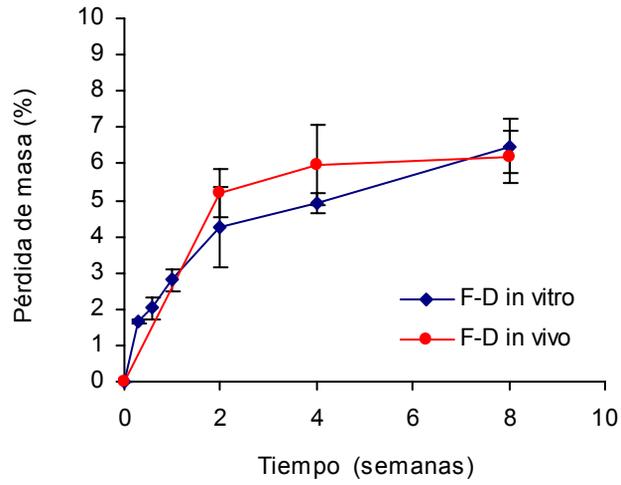
**Figura 118.- Niveles renales de gentamicina**

En la figura 119 se ha representado la correlación *in vitro* - *in vivo* obtenida a partir de los correspondientes ensayos de cesión. Es evidente que la velocidad de liberación de la gentamicina en fémur de conejos es más elevada que *in vitro*. Para intentar explicar este comportamiento y poder posteriormente predecir la velocidad de cesión *in vivo* de nuevas formulaciones se llevaron a cabo una serie de análisis para estudiar la evolución de los implantes a lo largo de los ensayos de cesión en conejos.

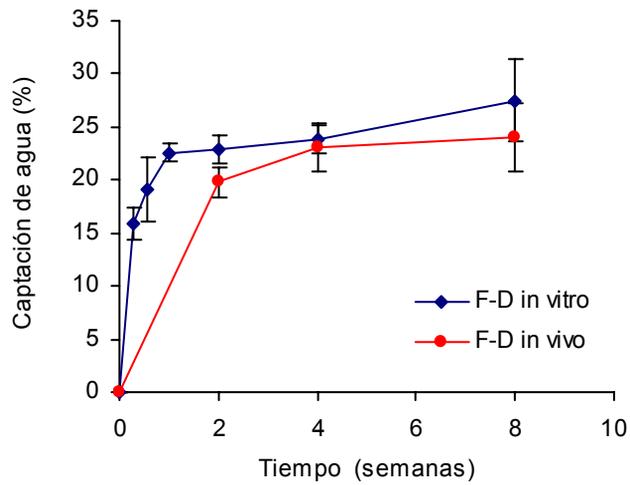


**Figura 119.-** Correlación *in vivo* – *in vitro*.

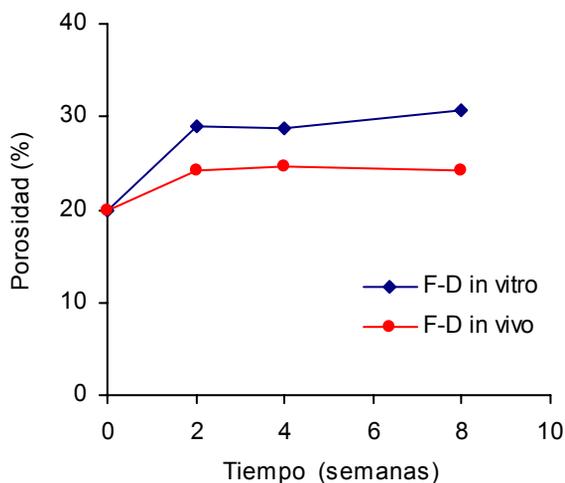
En primer lugar comentaremos y compararemos los resultados de pérdida de masa, captación de agua y porosidad obtenidos con la formulación F-D *in vitro* e *in vivo*. Como se puede observar en la figura 120, la pérdida de masa de los implantes *in vivo* es ligeramente superior y más rápida que *in vitro*. Por el contrario, los resultados obtenidos para los procesos de captación de agua y evolución de la porosidad (Figuras 121 y 122) revelan que los implantes F-D en el ensayo de cesión *in vitro* captan un mayor porcentaje de agua y sufren un aumento mayor de la porosidad que *in vivo*, a pesar de que el porcentaje de gentamicina cedida *in vivo* es apreciablemente superior al *in vitro*.



**Figura 120.-** Pérdida de masa *in vivo* – *in vitro*.



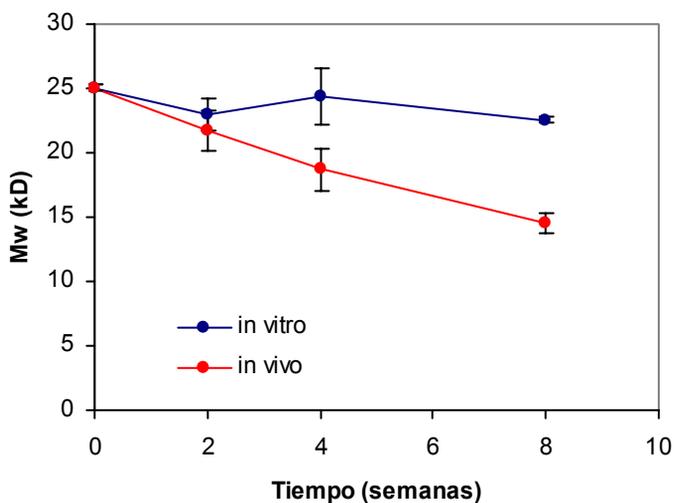
**Figura 121.-** Captación de agua *in vivo* – *in vitro*.



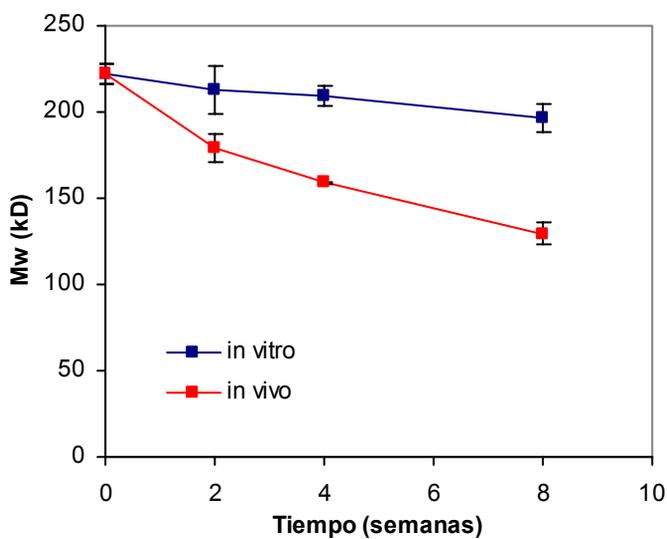
**Figura 122.-** Porosidad *in vivo* – *in vitro*.

Antes de comentar o justificar este comportamiento, debemos analizar los datos correspondientes a los ensayos orientados a estudiar las transformaciones que sufren los componentes de la formulación; nos estamos refiriendo a la mezcla de HAP:FTC y a los polímeros, tanto al PLA-30 constituyente de la matriz como al PLA-200 empleado en el recubrimiento. Los termogramas de ambos polímeros obtenidos por DSC a lo largo de los ensayos de cesión (Figuras 75, 76, 87 y 88) muestran que las temperaturas de transición vítrea prácticamente permanecen constantes tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, los análisis de GPC muestran una caída *in vivo* mucho más importante del peso molecular de ambos polímeros que *in vitro*. El peso molecular *in vivo*, prácticamente se reduce a la mitad en los dos polímeros; así el PLA-30 de la matriz disminuye hasta unos 14 kD y el PLA-200 de la película de recubrimiento hasta aproximadamente 130 kD (Figuras 123 y 124), lo que justificaría la mayor pérdida de masa *in vivo* que *in vitro*, por

disolución de los fragmentos solubles y además, indicaría una posible degradación enzimática del PLA (Kulkarni et al. 1971; Pitt et al., 1981 y Rosen et al., 1988).



**Figura 123.-** Evolución del PM del PLA-30 durante los ensayos de cesión.



**Figura 124.-** Evolución del PM del PLA-200 durante los ensayos de cesión.

En el caso de los fosfatos, como ya comentamos anteriormente, se produce una deformación y un desplazamiento del pico correspondiente a los fosfatos hacia temperaturas inferiores. Si se observan los termogramas obtenidos *in vitro* e *in vivo*, podría decirse que durante las dos primeras semanas las alteraciones experimentadas en el pico de los fosfatos son similares pero a tiempos mayores parece que el desplazamiento *in vivo* es más acusado (Figura 87) que *in vitro* (Figura 75). Esta observación podría ser debida a la transformación de los fosfatos empleados en otros fosfatos. Así, la hidroxiapatita puede transformarse en apatita y este cambio puede que se produzca de forma más rápida *in vivo* que *in vitro* y hace que la temperatura del proceso descienda de forma más acusada, lo que también podría contribuir a una mayor liberación de gentamicina *in vivo*. Sin embargo los difractogramas obtenidos por Rayos X de polvo no acusan ningún cambio cristalográfico que pudiera aclarar el tipo de fenómeno que se está produciendo.

Los resultados presentados hasta aquí, deberían llevarnos a una mayor porosidad *in vivo* que *in vitro* y también hasta cierto punto, a una mayor capacidad para captar agua ya que los polímeros disminuyen su peso molecular dando lugar a cadenas más cortas y por tanto, con más movilidad y mayor hidrofilia, sin olvidar además, que tanto la velocidad de cesión de la gentamicina *in vivo* como el porcentaje total de gentamicina cedido es mayor que *in vitro*. No obstante, los resultados histológicos y radiológicos que exponemos a continuación, podrían explicarnos este comportamiento.

Los cambios radiológicos y los hallazgos histológicos de las piezas seleccionadas evolucionaron de forma paralela y se encuentran estrechamente relacionados. Así, en los primeros días se observan cambios derivados de la agresión quirúrgica, con desestructuración del tejido óseo que rodea al implante y que radiológicamente se expresa por la presencia de un halo periimplante (Figuras 89, 96 y 97).

Posteriormente y hasta la segunda semana, aparecen fenómenos reparativos alrededor del implante. El tejido óseo inmaduro que está rodeando al implante emite tractos o tabiques fibrosos que penetran en él (Figuras 90, 91, 98, 99 y 100).

Alrededor de las 4-6 semanas el tejido óseo inmaduro periimplante va transformándose en tejido óseo maduro, apreciándose cambios en la densidad del implante localizados en su periferia (92, 93, 101 y 102).

Esta relación implante-hueso aumenta posteriormente; la densidad del implante se va asemejando cada vez más al hueso circundante e histológicamente observamos una clara calcificación intraimplante que va aumentando con el tiempo (Figuras 94, 95, 103 y 104).

Esta invasión secuencial del implante por el nuevo tejido óseo formado explica por un lado, la menor captación de agua y porosidad *in vivo* que *in vitro*, a pesar de que la degradación *in vivo* es mucho más acusada que *in vitro*. Por otro lado, apoya definitivamente la posible degradación enzimática del poliláctico (Kulkarni et al., 1971; Pitt et al., 1981 y Rosen et al., 1988).

**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1<sup>a</sup>.- El método de elaboración empleado ha permitido obtener implantes de gentamicina preparados con mezclas de fosfatos y PLA-30 que ceden el antibiótico a lo largo de al menos cuatro semanas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

2<sup>a</sup>.- La velocidad de cesión *in vitro* e *in vivo* de gentamicina desde las distintas formulaciones ensayadas depende fundamentalmente de la presencia de la película de recubrimiento.

3<sup>a</sup>.- La cubierta de PLA produce un retraso mucho más acusado y prolongado que la película de PLGA, debido a su capacidad para mantener su integridad a lo largo de los ensayos de cesión. El PLGA, más hidrofílico, se degrada más rápidamente y va adquiriendo un estado gomoso que permite una liberación más rápida del antibiótico.

4<sup>a</sup>.- La cesión de gentamicina desde estos implantes viene determinada por la entrada de medio líquido, la rápida disolución de la gentamicina y su difusión a través de la matriz. En el caso de las formulaciones no recubiertas, la gentamicina difunde directamente al medio de cesión, mientras que en las recubiertas, el antibiótico que ha difundido desde la matriz se concentra en la interfaz matriz-película de recubrimiento y abandona el sistema por dos mecanismos: parte se libera a través de los poros de la película y el resto difunde a través de la misma.

5ª.- La liberación de gentamicina resultó ser más rápida y completa *in vivo*, tanto en fémur de ratas como de conejos, que *in vitro*. Estos resultados se explican por la mayor degradación *in vivo* que sufren los componentes de la matriz y el polímero de recubrimiento, como consecuencia de la regeneración ósea.

6ª.- 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 un lado, se han alcanzado y mantenido concentraciones de gentamicina superiores a las CMI frente a los microorganismos que más frecuentemente producen este tipo de infección y por otro lado, los materiales empleados en su elaboración inducen o estimulan la regeneración ósea.

## **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

- Abate J. A., Fadale P. D., Hulstyn M. J. y Walsh W.R. "Initial fixation strength of polylactic acid interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction". *Arthroscopy*. 1998; 14 (3): 278-84.
- Agrawal C. M., Best J., Heckman J. D. y Boyan B. D. " Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions". *Biomaterials*. 1995;16(16): 1255-60.
- Armstrong E.P. y Elsberry V.A. " Bone and Joint Infections". En: *Pharmacotherapy*, cap.111, 1997. Editores: J.T. Dipiro, R.L. Talbert, G.C. Yee, G.R. Matzke, B.G. Wells y L.M. Posey; Ed. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.
- Ashammakhi N., Mäkelä E. A., Vihtonen K., Rokkanen P. y Törmälä P. " Effect of self-reinforced polyglycolide membranes on cortical bone: An experimental study on rats". *J. Biomed. Mater. Res*. 1995; 29: 687-94.
- Atkins T. W., Peacock S. J. y Yates D. J. "Incorporation and release of vancomycin from poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres". *J. Microencapsul*. 1998; 15 (1): 31-44.
- Azanza J. R. , Caballero E., Sábada B. y García-Quetglas E. "Antibiotic prophylaxis in orthopedic and trauma surgery". *Rev. Ortop. Traumatol*. 2000; 44 (5):484-493.
- Balch O. K., Collier M. A., DeBault L. E. y Johnson L. L. " Bioabsorbable suture anchor (Co-polymer 85/15 D, L lactide/glycolide) implanted in bone: Correlation of physical/mechanical properties, magnetic resonance imaging, and histological response". *J. Arthroscopic & Rel. Surg*. 1999; 15 (7): 691-4.
- Bartels H. Et al. *Clin. Chim. Acta* 1972; 37:193.

- Benett S., Conolly K., Lee D. R., Jiang Y., Buck D., Hollinger J. O. y Gruskin E. A. "Initial Biocompatibility of a novel degradable polymeric bone substitute that hardens in situ" *Bone*. 1996; 19 (1): 101S-7S.
- Bohner M., Lemaître J., Van Laduyt P., Zambelli P. Y., Merkle H.P. y Gander B. "Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system". *J. Pharm. Sci.* 1997; 86 (5): 565-72.
- Boyan B. D., Nasatzky E., Keller B. S. y 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. y 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. y Simms C. "The use of hidroxyapatite cement in secondary craniofacial reconstruction". *Plast. Reconstr. Surg.* 1999; 104 (5): 1270-5.
- Calhoun J. H. y Mader J. T. "Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant". *Clin. Orthop. and Rel. Res.* 1997; 341: 206-214.
- Chan Y. S., Ueng S. W., Wang C. J., Lee S. S., Chao E. K. Y Shin C. H. " Management of small infected tibial defects with antibiotic-impregnated autogenic cancellous bone grafting". *J. Trauma*. 1998; 45 (4): 758-64.
- Chu C. R., Coutts R.D., Yoshioka M., Harwood F.L., Monosov A.Z. y 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.
- Dimeglio A. *Ortopedia Infantil Cotidiana*. 1995; págs.: 117-129. Ed. Masson S.A., 2ª ed. Barcelona.

- Dressmann H.: "Veber knochenplonberingung". *Beltr. Klin. Chir.*, 1892; 9:804-810.
- Freed L. E., Marquis J. C., Nohria A., Emmanuel J., Mikos A. G. y Langer R.  
"Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers". *J Biomed. Mater. Res.* 1993; 27: 11-23.
- García A., Clavel-Sainz M., Messeguer J., Gabardo A. y 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. y Radio S.  
"Polylactide/polyglycolide antibiotic implantes in the treatment of osteomyelitis. A canine model". *J. Bone Joint Surg. Am.* 1994; 76 (10): 1500-6.
- Geesink R. G. T., Hoefnagels N. H. M. y Bulstra S. K. " Osteogenic activity of OP-1, bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), in a human fibular defect model". *J Bone Joint Surg. Br.* 1999; 81: 710-8.
- Gracia E., Lacleriga A., Monzón M., Leiva J., Oteiza C. y Amorena B.  
"Application of a rat osteomyelitis model to compare *in vivo* and *in vitro* the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms". *J. Surg. Res.* 1998; 79(2): 146-153.
- Greene N., Holtom P. D., Warren C. A., Ressler R. L., Shepherd L., McPherson E. J. y Patzakis M. J. "In vitro elution of tobramycin and vancomycin polymethylmethacrylate beads and spacers from Simplex and Palacos". *Am. J. Orthop.* 1998; 27 (3): 201-5.
- Habib M., Onyilofofor S., Ebube N. K. y Owusu A. G. " Preparation and characterization of ofloxacin microspheres for the eradication of bone associated bacteria biofilm". *J. Microencapsul.* 1999; 16 (1): 27-37.

- Heydat A. y Wallis, W. D. "Hadamard Matrices and their applications". *Ann. Statistics*, 1978; 6:1184.
- Itokazu M., Aoki T., Nonomura H., Nishimoto Y. e Itoh Y. "Antibiotic-loaded porous hydroxyapatite bloks for the treatment of osteomyelitis and postoperative infection. A preliminary report". *Bull. Hosp. Jt Dis.* 1998; 57 (3): 125-9.
- Itokazu M., Ohno T., Tanemori T., Wada E., Kato N. y Watanabe K. " Antibiotic-loaded hydroxyapatite bloks in the treatment of experimental osteomyelitis in rats". *J. Med. Microbiol.* 1997; 46: 779-83.
- Kanellakopoulou K., Kolia M., Anastasiadis A., Korakis T., Giamarellos B. E. J., Andreopoulos A., Dounis E. y Giamarellou H. " Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluorquinolones: an in vitro study". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43 (3): 714-6.
- Kawanabe K., Okada Y., Matsusue Y., Iida H. y Nakamura T. "Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic". *J. Bone Joint Surg.* 1998; 80 (3): 527-30.
- Koffmann S.: "Gips als plonbenmaterial". *Zentral. Chir.* 1925; 52:1817-1818.
- Korkusuz F., Uchida A., Shinto Y., Arak N., Inoue K. Y Ono K. " Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hidroxyapatite ceramic composites". *J. Bone Joint Surg. Br.* 1993; 75-B: 111-4.
- Kren N. W.: Tratado de Cirugía. Tomo V, 1915.
- Kovacevic B. "Ein beitrag zum problem der hämatogen osteomyelitis". *Dtsch. Zs. Chir.* 1953; 276:263-268.
- Kulkarni R. K., Moore E. G., Hegyeli A. F. y Leonard F. "Biodegradable poly(lactic acid) polimers". *J. Biomed. Mater. Res.* 1971; 5: 169-181.
- Laín Entralgo P.: Historia Universal de la Medicina. 1975.

- Lambert H. P. y O'Grady F. W. *Antibiotics and Chemoterapy*, 6<sup>a</sup> ed., 1992; editado por: Churchill Livingstone, Edinburgh; p.11.
- Lambotte J. C., Thomazeau H., Cathelineau G., Lancien G., Minet J. y Langlais F.  
"Phosphate tricalcique, vecteur d'antibiotiques: étude sur foyer d'ostéomyélite expérimentale chez le lapin". *Chirurgie*. 1998; 123: 572-9.
- Laurencin C. T., Gerhart T., Witschger P., Satcher R., Domb A., Rosenberg A. E., Hanff P., Edsberg L., Hayes W. y Langer R. "Bioerodible polyanhydrides for antibiotic drug delivery: In vivo osteomyelitis treatment in a rat model system".  
*J. Orthop. Res.* 1993; 11 (2): 256-62.
- Lee S. C., Shea M., Battle M. A., Kozitza K., Ron E., Turek T., Schaub R. G. y Hayes W. C. "Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix". *J. Biomed. Mater. Res.* 1994; 28: 1149-56.
- Levai J. P. y Boisgard S. "Acetabular reconstruction in total hip revision using a bone graft substitute". *Clin. Orthop.* 1996; 33: 108-114.
- Losken H. W., Tschakaloff A., Von-Oepen R., Mooney M. P., Moritz O., Michaeli W., Lalikos J. y Losken A. "Memory of DL-plylactic acid biodegradable plates". *Ann. Plast. Surg.* 1994; 32 (6): 606-11.
- Martins V. C., Goissis G., Ribeiro A. C., Marcantônio E. Jr. y 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. y Maze C. R. "Response to intracrevicular controlled delivery of 25% tetracycline from ply(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., Dernel W. S., Kroll D. J., Randolph T. W. y 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.
- Miki T. e Imai Y. " Osteoinductive potential of freeze-dried, biodegradable, poly (glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects of rats". *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1996; 25: 402-6.
  - Moore J. W. 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. y Manzanares C. " Utilización del sulfato cálcico como material de sustitución ósea". *Biomecánica.* 1995; III (4): 42-8.
  - Nakamura K., Natsugoe S., Kumanohoso T., Aikou T., Shinkawa T., Yamada K. Y Fukuzaki H. " Controlled release of poly-D,L-lactic acid containing bleomycin". *Anticancer Drugs.* 1995; 6 (3): 483-7.
  - Nicolau D. P., Nie L., Tessier P. R., Kourea H. P. y 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. y Nightingale C. H. " Use of bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment". *J. Orthop. Res.* 1998; 16 (1): 76-9.
  - Nikulin A. y Ljubovic E. "Der gipsstift in der experimentellen knochenregeneration". *Acta Med. Jugoslavica.* 1956; 10:1-6.
  - Otto T. E., Nulend J. K., Patka P., Burger E. H., y 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. y Brug E. "Penetration of ciprofloxacin into bone: A new bioabsorbable implant". *J. Invest. Surg.* 1995; 8: 155-62.

- Ozaki T., Yoshitaka T., Kunisada T., Danura T., Naito N. e Inoue H. "Vancomycin-impregnated polymethylmethacrylate beads for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: report of two cases". *J. Orthop. Sci.* 1998; 3 (3): 163-8.
- Peltier L. F., Bickel E. Y., Lillo R. Y Thein M.S. "The use of plaster of paris to fill defects in bone". *Annals Surg.* 1957; 146:61-69.
- Pitt C.G., Gratzl M. M., Kimmel G. L., Surles J. y Schindler A. "Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly ( $\epsilon$ -caprolactone), and their copolymers in vivo". *Biomaterials.* 1981; 2: 215-220.
- Piulachs P. Lecciones de Patología Quirúrgica. Tomo I, Generalidades, 3ª parte. 1956; págs.: 1365-1383. Ed.: Vergara S.A., 2ª ed. Barcelona.
- Radder A. M., Leenders H. y van Blitterswijk C. A. " Application of porous PEO/PBT copolymers for bone replacement". *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 30: 341-51.
- Ramchandani M. y Robinson D. " In vitro in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants". *J. Control. Rel.* 1998; 54 (2): 167-75.
- Rosen H. B., Kohn J., Leong K. y Langer, R. "Bioerodible polymers for controlled release systems", en *Controlled Release Systems: Fabrication Technology II*; Hsieh, D.S.T.; Ed. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida. 1988. Cap. 5.
- Sasaki S. e Ishii Y. "Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis". *J. Orthop. Sci.* 1999; 4 (5): 361-9.
- Schmidt C., Wenz R., Nies B. y 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.
- Scott C. P., Higham P. A. y Dumbleton J. H. "Effectiveness of bone cement containing tobramycin. An in vitro susceptibility study of 99

- organisms found in infected joint arthroplasty". *J. Bone Joint Surg.* 1999; 81 (3): 440-3.
- Seber S., Günal I. y Göktürk E. "Antibiotic-impregnated xenografts in the treatment of chronic osteomyelitic cavities. Seven cases followed for 3 to 5 years". *Int. Orthop.* 1998; 22 (3): 197-9.
  - Shinto Y., Uchida A., Korkusuz F., Araki N. y Ono K. "Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics". *J. Bone Joint Surg. Br.* 1992; 74-B: 600-4.
  - Solberg B. D., Gutow A. P. y Baumgaertner M. R. "Efficacy of gentamicin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model". *J. Orthop. Trauma.* 1999; 13 (2): 102-6.
  - Soriano I. y Évora C. "Formulation of calcium phosphates/ poly (d,l-lactide) blends containing gentamicin for bone implantation". *J. Control. Rel.* 2000; 68: 121-34.
  - Springer M. A., Van-Binsbergen E. A., Patka P., Bakker F. C. y Haarman H. J. "Resorbable rods and screws for fixation of ankle fractures. A randomized clinical prospective study" *Unfallchirurg.* 1998; 101(5): 377-81.
  - Thoma K., Alex R. y Randzio J. *Pharmazie.* 1991; 46: 266.
  - Thoma K., Alex R. y Randzio J. "Biodegradable controlled release implants based on  $\beta$ - tricalcium phosphate ceramic". *J. Pharm. Biopharm.* 1992; 38 (3): 107-112.
  - Thomazeau H. y 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. y Mikos A.G. "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone". *J. Biomater. Sci. Polym.* 1995; 7 (1): 23-38.
  - Vallejo Galbete J. C. "Biomateriales y Hueso" *Rev Esp. Enf. Metab. Óseas.* 2000; 9 (2): 59-60.

- Varlet A. y Dauchy Ph. "Billes de plâtre de Paris aux antibiotiques dans le traitement de l'infection osseuse. Nouvelles associations plâtre-antibiotiques." *Revue Chir. Orthop.* 1983; 69:239-244.
- Vasenius J. Vainionpää S. Vihtonen K., Mero M., Mäkelä A., Törmälä P. y 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.
- Voche P., Merle M., Membre H. Y Fockens W. "Bioabsorbable rods and pins for fixation of metacarpophalangeal arthrodesis of the thumb" *J. Hand Surg. Am.* 1995; 20 (6): 1032-6.
- Walenkamp G.H., Kleijn LL. Y de Leeuw M. "Ostemyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1 - 12 years". *Acta Orthop. Scand.* 1998; 69 (5): 518-22.
- Watson Jones. Fracturas y heridas articulares. Tomo I, pág. 377; 1980. 3ª edición. Salvat editores S.A. Barcelona.
- Webber W. L., Lago F., Thanos C. y Mathiowitz E. "Characterization of soluble, salt-loaded, degradable PLGA films and their release of tetracycline". *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 41 (1): 18-29.
- Wei G., Kotoura Y., Oka Masanori, Yamamuro T., Wada R., Hyon S-H e Ikada Y. " A bioabsorbable delivery system for antibiotic treatment of ostemyelitis". *J. Bone Joint Surg. (Br).* 1991; 73:246-252.
- Winet H., Hollinger J.O. y 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.
- Wolford S.T., Schroer R.A., Gohs F.X., Gallo P.P., Brodeck M., Falk H.B. y Ruhren R. "Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals". *J. Toxicol. Environ. Health* 1986; 18 (2): 161-88.

- Yagmurlu M. F., Korkusuz F., Gürsel I., Korkusuz P., Örs Ü. y 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. y 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. y 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. y 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. y Shino K. " A simple and secure anchoring system for Caspari's transglenoid multiple suture technique using a biodegradable poly-L-lactic acid button". *Arthroscopy.* 1996; 12(3): 293-299.
- Zegzula H. D., Buck D. C., Brekke J., Wozney J. M. y Hollinger J. O. "Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2)". *J. Bone Joint Surg. Am.* 1997; 79: 1778-90.