



TESIS DOCTORAL

**MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS PARA EL ESTUDIO DE
OSTEOMIELITIS RELACIONADA CON BIOMATERIALES:
INFLUENCIA DE AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE
IMPLANTES DE Ti_6Al_4V**

Juan Antonio Constantino Cabrera

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

2014



TESIS DOCTORAL

**MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS PARA EL ESTUDIO DE
OSTEOMIELITIS RELACIONADA CON BIOMATERIALES:
INFLUENCIA DE AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE
IMPLANTES DE Ti_6Al_4V**

Juan Antonio Constantino Cabrera

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

Conformidad de los Directores:

Fdo: D. Manuel Quiles Galindo

Fdo: D. Ciro Pérez Giraldo

2014



Facultad de Medicina

Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica

Área de Traumatología y Cirugía Ortopédica

D. MANUEL QUILES GALINDO, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Área de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica de la Universidad de Extremadura. Como director de la presente tesis,

CERTIFICA:

Que la **Tesis Doctoral** presentada por Don **JUAN ANTONIO CONSTANTINO CABRERA** sobre “**MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS PARA EL ESTUDIO DE OSTEOMIELITIS RELACIONADA CON BIOMATERIALES: INFLUENCIA DE AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V**” ha sido realizada bajo mi dirección, y considero que tiene el contenido y rigor científico para ser sometida al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Extremadura, para optar al Grado de Doctor

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Badajoz a dieciocho de marzo del 2014.

Fdo. Prof. Dr Manuel Quiles Galindo

D. CIRO PÉREZ GIRALDO, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Área de Microbiología del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Extremadura. Como director de la presente tesis,

CERTIFICA:

Que la **Tesis Doctoral** presentada por Don **JUAN ANTONIO CONSTANTINO CABRERA** sobre “**MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS PARA EL ESTUDIO DE OSTEOMIELITIS RELACIONADA CON BIOMATERIALES: INFLUENCIA DE AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V**” ha sido realizada bajo mi dirección, y considero que tiene el contenido y rigor científico para ser sometida al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Extremadura, para optar al Grado de Doctor

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Badajoz a dieciocho de marzo del 2014.

Fdo. Prof. Dr. Ciro Pérez Giraldo

A mi esposa, M^a Reyes

A mis hijos, María y Juan Antonio

A mis padres Ángela y Juan Antonio

AGRADECIMIENTOS

Cuando se concluye un trabajo nunca se debe al esfuerzo aislado de una sola persona. En el caso de esta Tesis Doctoral esta afirmación alcanza su máximo sentido ya que sin la ayuda de muchas personas, unas que cito y muchas más que no puedo enumerar aquí, no habría podido concluirse. Es pues de justicia que manifieste mi reconocimiento a todos aquellos que, de una forma u otra, me han prestado su ayuda y han contribuido en gran medida a que este proyecto de Tesis Doctoral se haya convertido en realidad. Deseo mostrar mi gratitud :

- A los Profesores Doctores D. Manuel Quiles Galindo y D. Ciro Pérez Giraldo, codirectores de esta Tesis, por la confianza que depositaron en mí y el tiempo y la paciencia que me han dedicado.

Al Profesor Dr. Pérez Giraldo le estaré siempre agradecido por adentrarme en el, para mí, muy difícil mundo de la Microbiología, inicialmente como profesor de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Medicina de la UEx y posteriormente durante la realización de esta Tesis.

El Profesor Dr. Quiles Galindo me inició en el conocimiento de la Traumatología y Cirugía Ortopédica, primero como profesor en la Facultad de Medicina de la UEx, después como Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología durante mi residencia en el Hospital Regional Universitario Infanta Cristina y actualmente, en mi etapa como adjunto sigue transmitiéndome todos sus conocimientos y amplia experiencia. Siempre me ha apoyado y guiado en todos los proyectos que he iniciado durante mi vida profesional y ha sido, es y siempre será un referente para mí. A los dos mi más profundo agradecimiento.

- A todos los miembros del Grupo de Investigación sobre Adhesión Microbiana de la Universidad de Extremadura - AM-UEx del Centro de Investigación Biomédica en Red - Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBERBBN) sin cuya incondicional ayuda y soporte hubiera sido imposible realizar la presente Tesis.

-A todo el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UEx, y particularmente a su catedrático el profesor Dr. D. Antonio Cándido Gómez García, por su ayuda desinteresada en la preparación, ejecución e interpretación de los resultados de esta Tesis.

-A todo el Departamento de Física Aplicada de la UEx y en particular a las profesoras Dras. Dña. María Luisa González Martín y Dña. Amparo María Gallardo Moreno, por sus excelentes trabajos *in vitro* con las radiaciones ultravioletas que sirvieron de base teórica para la realización de esta Tesis, así como su inestimable ayuda a la hora de la preparación, ejecución e interpretación de los resultados de la misma.

-Mención especial merecen los Dres. D. Miguel Ángel Pacha y Dña. María Delgado Rastrollo, de los Departamentos de Física Aplicada y Microbiología respectivamente, por las horas que hemos compartido durante estos años en el animalario, así como por las experiencias vividas, gracias por las lecciones magistrales de compañerismo, sin ellos y su inestimable ayuda hubiera sido imposible realizar ninguno de los trabajos que componen esta Tesis.

-A todos los médicos residentes de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz por ayudarme en las intervenciones quirúrgicas y en especial al Dr. Ventura Caballero, actualmente médico adjunto, por su inconmensurable ayuda en la realización y ejecución tanto del capítulo II de esta Tesis como en gran parte del capítulo III.

-Al resto de mis compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz por su apoyo y empuje a la hora de realizar este proyecto.

-A todo el personal del animalario, en especial a D. Vicente Cebrián Fernández y a D. Juan Manuel Expósito Álvarez, por el cuidado de los animales de experimentación, así como por facilitarnos los equipos y medios necesarios para la realización de las intervenciones quirúrgicas.

-Al Servicio Extremeño de Salud y a la Universidad de Extremadura ya que gracias a su cooperación, recursos materiales y humanos hacen posible que se puedan realizar proyectos de investigación en nuestra región.

-A mi familia, a mis padres, a mis hijos por el tiempo que les he robado y especialmente a mi mujer por su comprensión y ayuda a la hora de realizar y maquetar esta Tesis.

ÍNDICE GENERAL

• AGRADECIMIENTOS	I
• ÍNDICE GENERAL	V
• ÍNDICE DE FIGURAS	XV
• ÍNDICE DE TABLAS	XXV
• GLOSARIO	XXVII
I. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2 Biomateriales	9
1.3 Biocapas	12
1.3.1 Formación de biocapas	12
1.3.1.1 Acondicionamiento de la superficie del biomaterial	14
1.3.1.2 Unión reversible	14
1.3.1.3 Unión irreversible	15
1.3.1.4 Maduración	16
1.3.1.5 Disolución de la biocapa	19
1.3.1.6 Función del <i>Quorum Sensing</i> en la formación de biocapas	20
1.4 Resistencia de las biocapas	20
1.5 Estado actual de las estrategias para la prevención de biocapas	23
1.5.1 Inhibición de la adhesión bacteriana a la superficie del implante	23
1.5.1.1 Modificaciones de la superficie	23
1.5.1.2 Recubrimientos hidrofílicos	24

1.5.1.3	Implantes recubiertos de antibióticos, antisépticos y otras sustancias antimicrobianas _____	25
1.5.2	Interferencia con el <i>Quorum Sensing</i> _____	26
1.5.3	Promover la muerte bacteriana dentro de una biocapa establecida _____	27
1.5.3.1	Combinación de antibióticos e inhibidores del QS _____	27
1.5.3.2	Efecto bioeléctrico _____	27
1.5.3.3	Combinación antibióticos-ultrasonidos _____	28
1.5.3.4	Tratamiento fotodinámico _____	28
1.5.3.5	Nanopartículas _____	28
1.5.4	Disgregación de la matriz de la biocapa _____	29
1.5.5	Vacunas _____	30
1.6	Objetivos de la Tesis _____	30
1.7	Bibliografía del Capítulo I _____	33
II.	CAPÍTULO II: MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> PARA EL ESTUDIO DE OSTEOMIELITIS POR <i>S. AUREUS</i> SOBRE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V _____	45
2.1	Introducción _____	45
2.1.1	Modelos en ratas _____	45
2.2	Objetivos _____	46
2.3	Material y métodos _____	47
2.3.1	Material de osteosíntesis _____	47
2.3.2	Agente patógeno _____	47
2.3.3	Animal de experimentación _____	48

2.3.4	Técnica quirúrgica	50
2.3.5	Valoración clínica	56
2.3.6	Valoración radiográfica	56
2.3.7	Eutanasia de las ratas y recogida de muestras	59
2.3.8	Procesamiento de las muestras	60
2.3.9	Análisis estadístico	61
2.4	Resultados	63
2.4.1	Examen clínico	64
2.4.2	Examen radiológico	64
2.4.3	Examen macroscópico	66
2.4.4	Examen microbiológico	66
2.5	Discusión	68
2.6	Conclusiones	73
2.7	Bibliografía del Capítulo II	75

III. CAPÍTULO III: ESTUDIO *IN VIVO* DE LA EFICACIA DE LAS RADIACIONES ULTRAVIOLETAS EN LA PREVENCIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V POR *S. AUREUS* 81

3.1	Introducción	81
3.1.1	Fotocatálisis del TiO ₂	81
3.1.1.1	Reacciones de oxidación reducción	82
3.1.1.2	Desarrollo de superhidrofílica	83

3.1.1.3	Aplicaciones de la fotocatalisis _____	84
3.2	Objetivos _____	85
3.3	Material y métodos _____	86
3.3.1	Material de osteosíntesis:Ti ₆ Al ₄ V _____	86
3.3.2	Agente patógeno _____	89
3.3.3	Animal de experimentación _____	89
3.3.4	Técnica Quirúrgica, eutanasia, recogida y procesamiento de muestras _____	90
3.3.5	Caracterización hidrofobicidad/ hidrofilia de las agujas de titanio Ti ₆ Al ₄ V _____	91
3.3.6	Análisis estadístico _____	92
3.4	Resultados _____	94
3.4.1	Hidrofobicidad medida por el ángulo de contacto ____	94
3.4.2	Experimento <i>in vivo</i> sobre la colonización bacteriana medida mediante recuento de UFC _____	95
3.4.2.1	Protocolo de implantación (a) _____	95
3.4.2.1.1	Eutanasia a las 24 horas _____	96
3.4.2.1.1.1	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures a las 24h _____</i>	96
3.4.2.1.1.2	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures a las 24h _____</i>	97
3.4.2.1.1.3	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio a las 24h _____</i>	98

3.4.2.1.1.4	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 24h</i>	99
3.4.2.1.1.5	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures a las 24h</i>	100
3.4.2.1.1.6	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio a las 24h</i>	101
3.4.2.1.1.7	<i>Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas + fémures a las 24h</i>	103
3.4.2.1.2	<i>Eutanasia a las 48 horas</i>	104
3.4.2.1.2.1	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures a las 48h</i>	104
3.4.2.1.2.2	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures a las 48h</i>	105
3.4.2.1.2.3	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio a las 48h</i>	106
3.4.2.1.2.4	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 48h</i>	107
3.4.2.1.2.5	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures a las 48 h</i>	108
3.4.2.1.2.6	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio a las 48 h</i>	109

3.4.2.1.2.7	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas + fémures a las 48 h</i>	110
3.4.2.1.3	Eutanasia a las 72 horas	111
3.4.2.1.3.1	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures a las 72h</i>	111
3.4.2.1.3.2	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures a las 72h</i>	112
3.4.2.1.3.3	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio a las 72h</i>	114
3.4.2.1.3.4	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 72h</i>	114
3.4.2.1.3.5	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures a las 72 h</i>	115
3.4.2.1.3.6	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio a las 72h</i>	117
3.4.2.1.3.7	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas + fémures a las 72h</i>	118
3.4.2.1.4	Análisis global (con independencia del tiempo de eutanasia)	119
3.4.2.1.4.1	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures en global</i>	119

3.4.2.1.4.2	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures en global</i>	120
3.4.2.1.4.3	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio en global</i>	121
3.4.2.1.4.4	<i>Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio en global</i>	123
3.4.2.1.4.5	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures en global</i>	124
3.4.2.1.4.6	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio en global</i>	125
3.4.2.1.4.7	<i>Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas + fémures en global</i>	126
3.4.2.2	Protocolo de implantación (b)	128
3.4.2.2.1	Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 24h	128
3.5	Discusión	130
3.6	Conclusiones	139
3.7	Bibliografía del Capítulo III	141

IV. CAPÍTULO IV: ESTUDIO *IN VIVO* DE LA EFICACIA DEL FARNESOL EN LA PREVENCIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V POR *S. AUREUS* 147

4.1	Introducción	147
-----	--------------	-----

4.2	Objetivos _____	151
4.3	Material y métodos _____	152
4.3.1	Material de osteosíntesis:Ti ₆ Al ₄ V _____	152
4.3.2	Agente patógeno _____	153
4.3.3	Animal de experimentación _____	153
4.3.4	Técnica Quirúrgica, eutanasia, recogida y procesamiento de muestras _____	154
4.3.5	Análisis estadístico _____	155
4.4	Resultados _____	156
4.4.1	Eutanasia a las 24 h post-inoculación _____	157
4.4.1.1	Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en fémures a las 24h post-inoculación ____	157
4.4.1.2	Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en agujas de Ti ₆ Al ₄ V a las 24h post- inoculación _____	158
4.4.1.3	Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas + fémures a las 24h post-inoculación _____	159
4.4.2	Eutanasia a las 72 h post-inoculación _____	160
4.4.2.1	Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en fémures a las 72h post-inoculación ____	161
4.4.2.2	Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en agujas de Ti ₆ Al ₄ V a las 72 h post- inoculación _____	161
4.4.2.3	Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas + fémures a las 72 h post-inoculación _____	162
4.4.3	Análisis global sin tener en cuenta tiempo de eutanasia _____	163

4.4.3.1	Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en fémures en global _____	164
4.4.3.2	Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en agujas de Ti ₆ Al ₄ V en global _____	164
4.4.3.3	Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas+ fémures en global ____	165
4.5	Discusión _____	166
4.6	Conclusiones _____	171
4.7	Bibliografía del capítulo IV _____	173
V.	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES _____	179

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Representación esquemática de la "carrera por la superficie", entre la colonización bacteriana de la biocapa y la adhesión celular eucariota con la subsiguiente aposición de hueso en la superficie del implante. (modificada de <http://www.intechopen.com/books/modern-surface-engineering-treatments/modern-orthopaedic-implant-coatings-their-pro-s-con-s-and-evaluation-methods>) _____ 4
- Figura 1.2:** Gasto sanitario anual del tratamiento de las infecciones de prótesis de rodilla y de cadera en Estados Unidos de América (2001-2010) y estimación hasta el año 2020 (modificado de Kurtz *et al.*¹³) _____ 7
- Figura 1.3:** Imagen de microscopía electrónica de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina y un neutrófilo humano destruido (modificada de <http://www.flickr.com/photos/niaid/8423852305/in/set-72157629333420573/>) ____ 9
- Figura 1.4:** Imagen de microscopía electrónica de la estrecha unión que se forma entre la superficie de titanio y el tejido óseo en un implante de éste biomaterial (Modificada de <http://www.clinicadentalausin.com/como-es-un-implante.php>) ____ 11
- Figura 1.5:** Etapas del desarrollo de una biocapa. Fase 1: unión inicial de células a la superficie. Fase 2: producción de la substancia extracelular polimérica. Fase 3: desarrollo inicial de la arquitectura de la biocapa (colonización). Fase 4: maduración de la arquitectura de la biocapa. Fase 5: dispersión de células de la biocapa. (Modificada de Monroe, D "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms" PLoS Biol, Vol 5, issue 11) _____ 13
- Figura 1.6:** Imagen de la colonización de un tubo endotraqueal por *Staphylococcus* en sus estadios iniciales (Modificada de Pace J *et al*²⁸) _____ 15
- Figura 1.7:** Biomaterial infectado mostrando una biocapa estrechamente adherida al mismo (Modificada de Pace J *et al*²⁸) _____ 16

Figura 1.8: Imagen de microscopía electrónica de una colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> y la matriz extracelular que forma el glicocalix (azul) (modificada de http://www.flickr.com/photos/niaid/7739552618/)	17
Figura 1.9: a) Desarrollo esquemático de la biocapa. b) Desarrollo de una biocapa visto por microscopía desde primeras las horas a los 8 días, (modificada de http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com.es/2008_05_01_archive.html)	18
Figura 1.10: Representación esquemática de la regulación genética bacteriana mediante “ <i>quorum sensing</i> ” (QS) (Modificada de http://www.lifesci.dundee.ac.uk/groups/sarah_coulthurst/research.html)	20
Figura 1-11: Imagen que representa los cuatro mecanismos de resistencia de las biocapas. (Modificado de http://aem.asm.org/content/72/3/2005/F1.expansion.html)	22
Figura 1.12: Prevención de biocapa mediante agentes que interfieren con el QS (Modificado de Francolini <i>et al</i> ⁶⁸)	26
Figura 1.13: Promover la muerte de una biocapa establecida por asociación de antibióticos y enzimas (Modificado de Francolini <i>et al</i> ⁶⁸)	27
Figura 1.14: Uso de nanopartículas magnéticas recubiertas de fármacos para destruir biocapas (Modificado de Francolini <i>et al</i> ⁶⁸)	29
Figura 1.15: Disgregación de la matriz de la biocapa usando enzimas (Modificado de Francolini <i>et al</i> ⁶⁸)	29
Figura 2.1: Instrumental básico de quirófano empleado para la intervención de las ratas	51
Figura 2.2: Incisión parrotuliana interna	51
Figura 2.3: Artrotomía de rodilla con exposición de cóndilos femorales	51
Figura 2.4: Creación manual de canal intramedular con aguja de catéter Abbocath	52
Figura 2.5 Canal intramedular creado en la región intercondílea del fémur de una de las ratas	53

Figura 2.6: Micro-jeringa _____	54
Figura 2.7: Inoculación de S. Aureus _____	54
Figura 2.8: Inserción intramedular de la aguja de titanio _____	54
Figura 2.9 (a): Sutura de heridas quirúrgicas con material no reabsorbible _____	55
Figura 2.9 (b): Resultado final tras limpieza con povidona yodada y apósito de Nobecutan® _____	55
Figura 2.10: Ratas estabuladas en jaulas tras la intervención _____	55
Figura 2.11: Tabla de valoración clínica y radiológica _____	57
Figura 2.12: Aparato para radiografías de pequeños animales y muestras pequeñas del modelo Faxitron (izquierda) y reveladora (derecha) _____	58
Figura 2.13: Fémur desarticulado _____	60
Figura 2.14 : Radiografía de fémur con aguja de titanio sin signos de osteomielitis _____	65
Figura 2.15: Radiografías mostrando la progresión de la osteomielitis a nivel metafiso-epifisario _____	65
Figura 2.16: Mediana (Log_{10}) recuentos de colonias recuperadas en agujas de titanio después de la cirugía dependiendo del número de bacterias inoculadas _____	67
Figura 2.17 Mediana (Log_{10}) recuentos de colonias recuperadas en hueso después de la cirugía dependiendo del número de bacterias inoculadas _____	67
Figura 3.1: Esquema del proceso fotocatalítico del dióxido de titanio (Modificado de http://www.interempresas.net/Quimica/Articulos/33925-Nuevo-sistema-de-eliminacion-de-compuestos-toxicos-y-corrosivos-en-aire-generados-en-EDARs.html) _____	83
Figura 3.2: Esquema del ángulo de contacto (Modificado de http://www.briteguard.com/109.html?L=9) _____	83

- Figura 3.3:** Diferencias en el ángulo de contacto entre una superficie hidrofóbica e hidrofílica (Modificado de <http://net-kreativa.blogspot.com.es/2013/07/neverwet-una-forma-respetuosa-de.html>) _____ 84
- Figura 3.4:** Dispositivo con resortes giratorios que permitía la irradiación homogénea de hasta tres agujas a las vez _____ 87
- Figura 3.5:** Lámpara de radiación ultravioleta G15-T8 _____ 88
- Figura 3.6:** Espectro electromagnético. Las radiaciones UV-C tienen mayor poder energético, y por ello mayor poder nocivo contra el ADN celular, que las radiaciones UV-A o UV-B. 254 nm es la longitud de onda óptima para erradicar microorganismos. (Modificado de <http://esterilizacionaguaultravioleta.fadecen.com/index.php/esterilizadores-uv/esterilizador-frs-dom/>) _____ 88
- Figura 3.7:** Ángulo de contacto del agua sobre la de superficie de una aguja de titanio Ti₆Al₄V antes (izquierda) y después (derecha) de la irradiación UV de la aguja durante 48 horas _____ 95
- Figura 3.8:** Gráfico que representa las medianas (Log₁₀) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con radiaciones UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo. _____ 96
- Figura 3.9:** Gráfico que representa las medianas (Log₁₀) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con radiaciones UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo _____ 97
- Figura 3.10:** Gráfico que representa las medianas (Log₁₀) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con radiaciones UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo _____ 98
- Figura 3.11:** Gráfico que representa las diferencias en las medianas (expresadas en Log₁₀) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con radiación UV y de agujas control no irradiadas, independientemente del inóculo, a las 24 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas (p=0,026) _____ 99

Figura 3.12: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con radiaciones UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo ____ 100

Figura 3.13: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo _____ 101

Figura 3.14: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos de agujas irradiadas con radiación UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 h del mismo _____ 102

Figura 3.15: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos de agujas irradiadas con radiación UV y de agujas control no irradiadas, para inóculos ≤ 10000 bacterias, a las 24 h del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,017$) _____ 103

Figura 3.16: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos de fémures + agujas irradiadas con rayos UV y de fémures + agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 h del mismo _____ 104

Figura 3.17: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo ____ 105

Figura 3.18: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo ____ 106

Figura 3.19: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo _____ 107

Figura 3.20: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo _____ 108

Figura 3.21: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo _____ 109

Figura 3.22: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo _____ 110

Figura 3.23: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas irradiadas con rayos UV y de fémur + agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo __ 111

Figura 3.24: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control , en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo ____ 112

Figura 3.25: : Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures con agujas no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo _____ 113

Figura 3.26: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación entre los fémures que contenían agujas irradiadas y de fémures control (contenían agujas no irradiadas), independiente del tamaño del inóculo, a las 72 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02$) _____ 113

Figura 3.27: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo _____ 114

Figura 3.28: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo _____ 115

Figura 3.29: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo _____ 116

Figura 3.30: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos entre los fémures que contenían agujas irradiadas y de fémures control (contenían agujas no irradiadas), independiente del tamaño del inóculo, a las 72 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativa ($p=0,041$) _____ 117

Figura 3.31: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo _____ 118

Figura 3.32: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémures + agujas irradiadas con rayos UV y de fémur + agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo __ 119

Figura 3.33: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia _____ 120

Figura 3.34: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia _____ 121

Figura 3.35: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia _____ 122

Figura 3.36: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, independiente del tiempo de eutanasia y para inóculos menores o iguales de 7600 bacterias, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,053$) _____ 123

Figura 3.37: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia _____ 124

Figura 3.38: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia _____ 125

Figura 3.39: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función de tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia _____ 126

Figura 3.40: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémures + agujas irradiadas con rayos UV y de fémures + agujas control (no irradiadas), en función del tamaño del inóculo, independientemente del tiempo de eutanasia _____ 127

Figura 3.41: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur+ agujas irradiadas con UV y de fémur+ agujas control, independiente del tiempo de eutanasia y para inóculos menores o iguales a 10000 bacterias, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,046$) _____ 127

Figura 3.42: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de las agujas irradiadas con radiaciones UV y de las agujas control (no irradiadas) en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo _____ 129

Figura 3.43: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación entre las agujas irradiadas con radiaciones UV y las agujas control (no irradiadas), independiente del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,028$) _____ 129

Figura 4.1: Estructura química del farnesol (Modificado de <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---F/Farnesol.htm>) _____ 148

Figura 4.2: Farnesol interfiere en la integridad de la membrana del *S. aureus*, inhibe su habilidad para formar biocapa y aumenta su susceptibilidad a antimicrobianos. Además interfiere en el crecimiento de otras bacterias multiresistentes como *P. Aeruginosa*, *E. Coli* o *Acinetobacter baumannii*. (Modificada de http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n5/fig_tab/nrmicro_2313_F5.html) _____ 149

- Figura 4.3:** Ilustración que escenifica como actúa el farnesol sobre las biocapas de *S aureus* aumentando la permeabilidad de las células de la pared y la membrana por inhibición de la producción de fibrina y la vía del mevalonato y desestabilización de la membrana celular que conduce a la lisis y pérdida de iones (Modificado de Bhattacharyya *et al.*) _____ 150
- Figura 4.4:** Gráfico que representa las medianas de los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol y de fémures control a las 24 horas post-inóculo _____ 158
- Figura 4.5:** Gráfico que representa las medianas de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol, a las 24 horas post-inóculo _____ 159
- Figura 4.6:** Gráfico que representa las medianas de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas con farnesol y de fémur + agujas control sin farnesol a las 24 horas _____ 160
- Figura 4.7:** Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol y de fémures control, a las 72 horas post-inoculación _____ 161
- Figura 4.8:** Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol, a las 72 horas post-inoculación _____ 162
- Figura 4.9:** Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas con farnesol y de fémur + agujas control sin farnesol, a las 72 horas _____ 163
- Figura 4.10:** Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol y de fémures control, independientemente del tiempo de eutanasia _____ 164
- Figura 4.11:** Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol o controles, independientemente del tiempo de eutanasia _____ 165
- Figura 4.12:** Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas con farnesol y de fémur + agujas control sin farnesol, independientemente del tiempo de eutanasia _____ 166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Etiología de las infecciones en cirugía ortopédica modificado de Montanaro L <i>et al.</i> ³	5
Tabla 2-1: Resumen de la asignación de los animales a los grupos estudio	49
Tabla 2-2: Resumen de los estadísticos obtenidos en agujas y fémures	66
Tabla 3-1 Resumen de la asignación de los animales a los protocolos de estudio	90
Tabla 4-1: Resumen de la asignación de los animales a los protocolos de estudio	154
Tabla 4-2: Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en Log ₁₀ UFC para tiempos de eutanasia de 24 h	157
Tabla 4-3: Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en log UFC para tiempos de eutanasia de 72 h	160
Tabla 4-4: Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en log UFC para tiempos de eutanasia de 48 h y 72 h	163

GLOSARIO

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosín trofosfato

°C: grados centígrados

ClK: cloruro potásico

cm: centímetro/s

cm²: centímetro/s cuadrado/s

ADN: ácido desoxirribonucleico

e⁻: electrón

E_g: energía de banda prohibida

etc.: etcétera

eV: electronvoltio

g: gramo/s

h: hora/s

h⁺: hueco/s electropositivo/s

H⁺: hidrógeno

H₂O: agua

H₂O₂ : agua oxigenada

H₂SO₄ : ácido sulfúrico

hv: h es la constante de Planck y v es la frecuencia de radiación

K⁺ : potasio

Kg: kilogramo/s

kV: kilovoltio/s

log: logaritmo

mA: miliamperio/s

mg: miligramo/s

ml: mililitro/s

mm: milímetro/s

mM: milimolar

MSCRAMM: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

mW: milivatio/s

nm: nanómetro/s

O₂: oxígeno

(O₂⁻): ión superóxido

(OH[·]): radical hidroxilo

θ_w: ángulo de contacto

PBS estéril : solución reguladora estéril

PIA: Adhesina intercelular polisacárida

QS: *Quorum Sensing*

RIP: péptido inhibidor RNAIII

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo/s

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

Staphylococcus spp: todas las especies de *Staphylococcus*

T^a: temperatura

Ti: titanio

Ti₆Al₄V: Aleación de titanio, aluminio y vanadio

TiO₂: Dióxido de titanio

TSB: medio nutritivo o caldo de soja tripticasa (Tryptic Soy Broth)

UEx: Universidad de Extremadura

UFC: unidades formadoras de colonias

μA: microamperio/s

μL : microlitro/s

μM: micromolar

USA: United States of America

UV: radiación ultravioleta

UV-A: radiación ultravioleta A

UV-B: radiación ultravioleta B

UV-C: radiación ultravioleta C

➤ CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

➤ Capítulo I

Introducción General

En cirugía ortopédica y traumatología el uso de biomateriales como implantes para restaurar la función de articulaciones, huesos fracturados y deformidad de miembros va en aumento. El número de artroplastias primarias y de revisión está incrementándose constantemente en la población mundial ¹ debido al envejecimiento progresivo de la población y a la exigencia de una mejor calidad de vida de los ancianos.

Un biomaterial puede ser definido como un material sintético que va a ser implantado dentro de un sistema vivo para reemplazar alguna parte o restaurar alguna función del mismo, de tal manera que va a estar en contacto de forma permanente o intermitente con sus fluidos, por lo que debe ser compatible con él y no producir reacciones no deseadas y además debe ser resistente a la corrosión. Los materiales utilizados para realizar implantes pueden ser poliméricos, cerámicos, metálicos o compuestos. Uno de los más empleados en cirugía ortopédica es el titanio por su gran biocompatibilidad y resistencia.

Dentro de nuestro organismo se pueden implantar muy diversos tipos de dispositivos creados con biomateriales como prótesis cardiacas, marcapasos, articulaciones de cadera, clavos en huesos, etcétera.

A pesar de que el uso de biomateriales ha supuesto un importante avance en medicina, todos ellos tienen en común la capacidad para atraer microorganismos infecciosos que conducen a *infecciones asociadas a biomateriales* lo que conlleva un claro aumento en la morbilidad e incluso en la mortalidad de algunos procesos patológicos, además de un incremento muy importante en el consumo de recursos económicos.

Gristina *et al.*² han propuesto una elegante metáfora patogénica para explicar la situación que ocurre inmediatamente después de la inserción de los implantes: “*La carrera por la superficie*”. De acuerdo a este concepto, tanto la adhesión microbiana como la integración de los biomateriales con el tejido del hospedador constituyen un proceso similar, aunque las consecuencias finales sean totalmente opuestas. El triunfo de uno u otro depende de la velocidad y configuración de ese proceso (Figura 1.1).

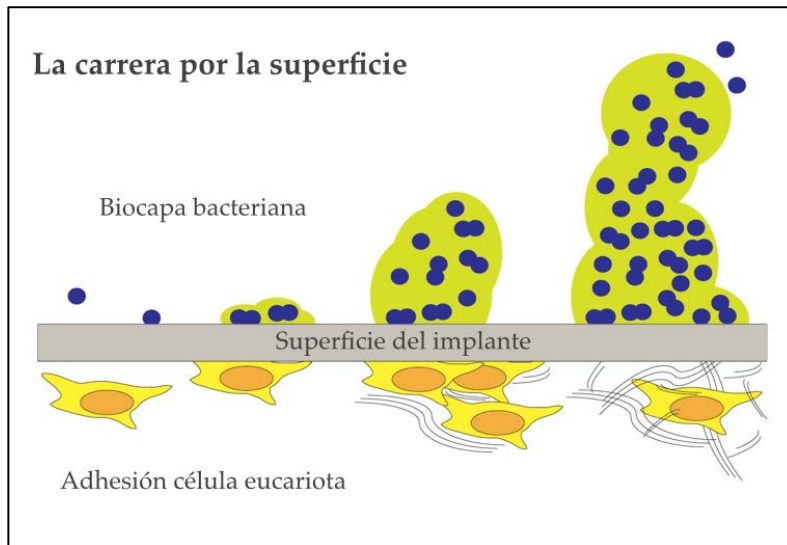


Figura 1.1: Representación esquemática de la “carrera por la superficie”, entre la colonización bacteriana de la biocapa y la adhesión celular eucariota con la subsiguiente aposición de hueso en la superficie del implante. (modificada de <http://www.intechopen.com/books/modern-surface-engineering-treatments/modern-orthopaedic-implant-coatings-their-pros-cons-and-evaluation-methods>).

En las infecciones de biomateriales la etiología varía según el mecanismo patogénico de la infección, pero en su conjunto, el género *Staphylococcus* es el más frecuente siendo los microorganismos responsables de más del 80% de dichas infecciones (Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Etiología de las infecciones en cirugía ortopédica modificado de Montanaro L et al. ³

Microorganismos	%
<i>Staphylococcus coagulasa-negativo</i>	39.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	31.7
<i>Staphylococcus warneri</i>	4.9
<i>Staphylococcus hominis</i>	2.4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1.8
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1.2
<i>Staphylococcus capitis</i>	0.6
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0.6
Total género <i>Staphylococcus</i>	82.2
Otros	17.8

El elemento fundamental en la patogenia de todas estas infecciones es la adherencia microbiana. Estas infecciones son principalmente causadas por contaminación directa durante la cirugía, pero también pueden ser causadas por diseminación hematógena.

La adhesión bacteriana a la superficie del biomaterial es seguida por la agregación y crecimiento de otras bacterias resultando en la formación de una estructura llamada **biocapa** que confiere a los microorganismos una mayor resistencia a los antibióticos y a las defensas del hospedador ^{4,5}.

El tratamiento actual de las infecciones asociadas a biomateriales y relacionadas con la producción de biocapas en cirugía ortopédica consiste, en la mayoría de los casos, en cirugía de revisión del implante con desbridamiento y terapia antimicrobiana de larga duración.

Este tratamiento tiene una tasa de éxito entre el 31 y el 62%, dependiendo del tipo de implante y la localización quirúrgica ⁶. La cirugía de revisión es necesaria debido a la dificultad de eliminar las bacterias en biocapas a través de medios convencionales tales como terapia antimicrobiana oral o intravenosa. La actual estrategia no solo tiene una baja tasa de éxito sino que además la tasa de infección que ocurre después de la cirugía de revisión es casi dos veces la de la cirugía primaria ⁷.

La tasa de infecciones de implantes no es extremadamente alta pero las consecuencias que derivan de ellas en cuestión de morbilidad, mortalidad e incremento del gasto sanitario hace que sea un problema que despierta gran interés en distintos campos de la medicina y que un número importante de grupos de investigación se dediquen a buscar estrategias para su prevención o manejo. Darouiche ha publicado que una media del 5% de los dispositivos de fijación interna implantados en humanos llegan a ser infectados ⁸. La tasa de infección en fracturas cerradas tratadas con material de osteosíntesis es del 1.5% y en fracturas abiertas oscila entre el 3 y el 40% ⁹ dependiendo del tipo de fractura y del estado de los tejidos blandos. En artroplastia total primaria de rodilla la incidencia de complicaciones sépticas es del 1% y en artroplastia de cadera del 0,3-0,6% ¹⁰⁻¹².

Kutz¹³ *et al.* analizaron en Estados Unidos de America el impacto económico del tratamiento de artroplastias infectadas de rodilla y cadera. El coste hospitalario total estimado de las infecciones de estas prótesis se incrementó de 320 millones de dólares en el 2001 a 672 millones en el 2010. Basados en los datos proporcionados por la agencia americana *The Nationwide Inpatient Sample* (NIS, <http://www.hcup-us.ahrq.gov/nisoverview.jsp>) se estima que el coste asociado al tratamiento de estas infecciones alcanzará 1,61 billones de dólares en el 2020 (Figura 1.2).

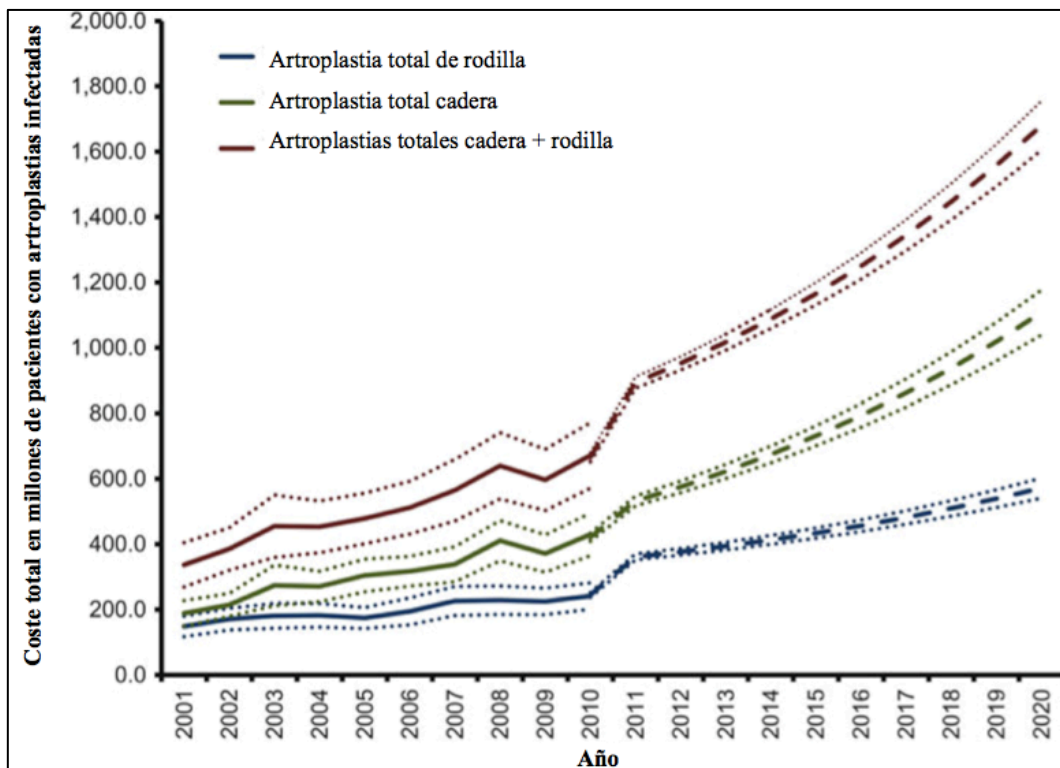


Figura 1.2: Gasto sanitario anual del tratamiento de las infecciones de prótesis de rodilla y de cadera en Estados Unidos de América (2001-2010) y estimación hasta el año 2020 (modificado de Kurtz *et al.*¹³).

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, productor de catalasa y coagulasa (Figura 1.3). Se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, estimándose que una de cada dos personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por él. Su principal nicho ecológico en la población humana son las fosas nasales anteriores. El segundo sitio más frecuente de colonización es la piel seguida por el perineo y la faringe. Se estima que aproximadamente el 20% de los individuos tienen permanentemente colonizadas las fosas nasales por esta bacteria, el 30% de forma intermitente y el 50% son no portadores ¹⁴.

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM) es una cepa de la bacteria *S. aureus* que se ha vuelto resistente a múltiples antibióticos como son todos los betalactámicos (incluyendo cefalosporinas y carbapenemas) y usualmente a aminoglucósidos, eritromicina, clindamicina, tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas y rifampicina. Es por ello que el SARM puede provocar infecciones potencialmente letales y que generalmente solo es posible tratarlas con antibióticos intravenosos muy costosos como la vancomicina y el linezolid.

La prevalencia de infecciones por SARM ha aumentado rápidamente en las últimas décadas, sobre todo en el ámbito hospitalario y en particular en pacientes con fracturas y prótesis articulares ¹⁵.

Estas infecciones están asociadas con una alta morbilidad y mortalidad causando un importante gasto sanitario para los sistemas nacionales de salud ¹⁶.

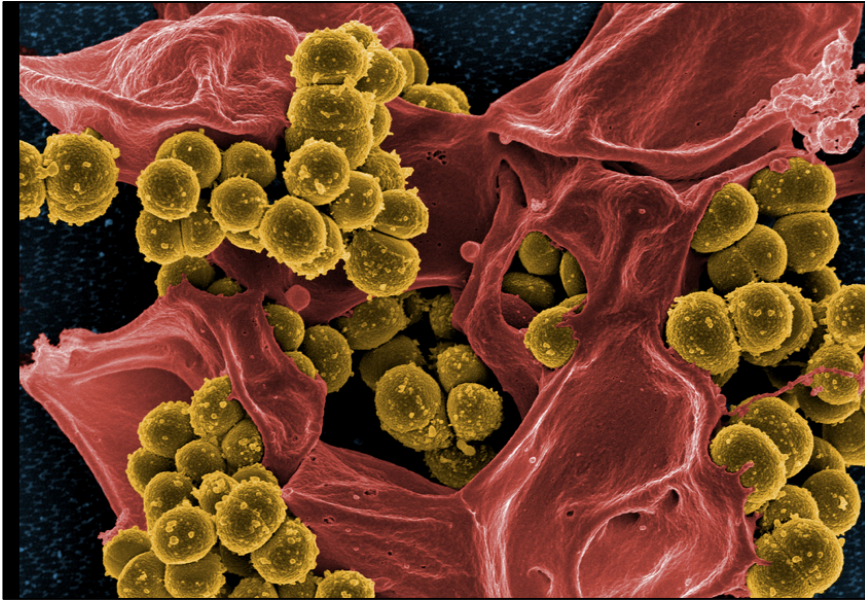


Figura 1.3: Imagen de microscopía electrónica de Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina y un neutrófilo humano destruido (modificada de <http://www.flickr.com/photos/niaid/8423852305/in/set-72157629333420573/>).

1.2 Biomateriales

Como se dijo anteriormente, los biomateriales son materiales utilizados para ser implantados dentro de un sistema vivo por lo que deben tener unas características especiales como ser compatibles con él, no producir reacciones adversas y además deben ser resistentes a la corrosión debida a los fluidos corporales y al deterioro secundario al desgaste o fractura por fatiga del material, que podría requerir re-intervenciones para sustituir por nuevo material, como en el caso de las prótesis que sustituyen las articulaciones móviles.

Los biomateriales utilizados en medicina para realizar implantes pueden ser poliméricos, biocerámicos, metálicos o compuestos.

Los *materiales poliméricos* se emplean en implantes quirúrgicos, en membranas protectoras o en sistemas de dosificación de fármacos. En traumatología se emplean frecuentemente cementos óseos acrílicos.

Los *materiales biocerámicos* se utilizan para reemplazar articulaciones en el cuerpo humano y en trabajos dentales. En estos implantes, el hueso puede crecer en la estructura porosa, al igual que sucede con los implantes de titanio, y desarrollar una fuerte unión. Los cerámicos más utilizados son el óxido de aluminio y el nitruro de varios compuestos de sílice.

El número de *elementos metálicos* que se utilizan en implantes es escaso, ya que la gran mayoría no son tolerados por el cuerpo humano y además no tienen una buena resistencia a la corrosión.

Algunos metales se escapan de los problemas anteriores y por ello son los más utilizados en cirugía ortopédica y traumatología destacando en la actualidad el empleo del titanio y sus aleaciones, y aunque está en desuso, también se ha utilizado el acero inoxidable. Éste último metal tienen mayor tasa de infección que los dispositivos de titanio¹⁷. Una posible razón para este hecho puede ser que los tejidos blandos se adhieren firmemente a la superficie del titanio (Figura 1.4)¹⁸, mientras que los implantes de acero producen una cápsula fibrosa a su alrededor creando un espacio relleno de líquido¹⁹. Las bacterias pueden diseminarse y multiplicarse libremente en este espacio no vascularizado siendo así menos accesibles a las defensas del hospedador.

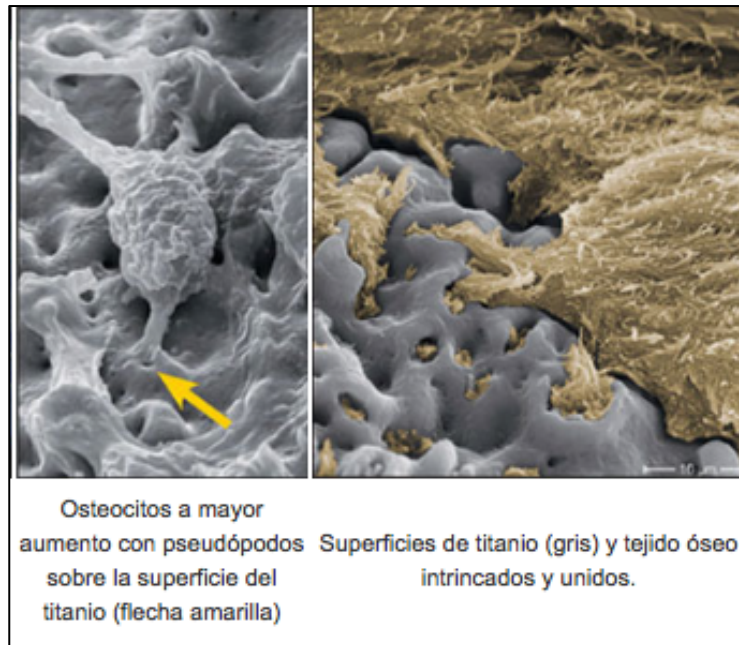


Figura 1.4: Imagen de microscopía electrónica de la estrecha unión que se forma entre la superficie de titanio y el tejido óseo en un implante de este biomaterial (Modificada de <http://www.clinicadentalausin.com/como-es-un-implante.php>).

El titanio ha sido utilizado como material implantable desde mediados del siglo XX, debido a su alta resistencia a la corrosión, sus propiedades mecánicas y su biocompatibilidad. Muchas de estas propiedades se deben a la presencia de una capa de unos pocos nanómetros de espesor de óxido que se forma espontáneamente en su superficie al contacto con el aire ambiente (dióxido de titanio ó TiO_2)^{20, 21}. En cirugía ortopédica el titanio se utiliza principalmente en forma de aleación con aluminio y vanadio ($\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$) que aumenta significativamente la resistencia propia del titanio.

1.3 Biocapas

Las bacterias en la naturaleza existen en dos estados básicos: en estado planctónico (en libre flotación en un fluido) o formando *biocapas*. Se ha publicado que el 99% de las células bacterianas existen formando parte de una biocapa y tan solo el 1% viven en estado planctónico²². Una *biocapa* es un ecosistema microbiano organizado que ocurre cuando las células planctónicas se adhieren a una superficie o sustrato abiótico (minerales, metales, implantes médicos...) o biótico (tejidos animales, plantas,...) , formando una comunidad que se caracteriza por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora. Una biocapa puede contener aproximadamente un 15% de células y un 85% de matriz extracelular. Una de las características más importantes de estas comunidades es la resistencia a antisépticos, antibióticos y al sistema inmune del hospedador^{23, 24} lo cual condicionan que el tratamiento tradicional con biocidas y antibióticos sea ineficaz en erradicar estas formaciones.

1.3.1 Formación de biocapas

La formación de una biocapa es un proceso dinámico. Las superficies de los biomateriales implantados en un organismo vivo son normalmente acondicionadas con agua, lípidos, albumina, matriz polimérica extracelular u otros nutrientes del medio circundante²⁵.

Las bacterias se adhieren a estas superficies acondicionadas inicialmente en una asociación *reversible* para seguidamente desarrollar una formación altamente estructurada y cooperante dando lugar a una unión *irreversible*²⁶.

Una biocapa madura tiene típicamente una forma de hongo con células embebidas en una matriz de polímero extracelular, también llamado *glicocalix*, formado por canales rellenos de agua y espacios vacíos que permiten el transporte de nutrientes y oxígeno desde la interfase al interior de la formación, y la eliminación de los residuos del metabolismo.

Finalmente algunas de las bacterias de la biocapa madura se dispersan para conseguir la expansión y perpetuación de la infección.

En la Figura 1.5 se describen y representan esquemáticamente las diversas etapas del desarrollo de una biocapa .

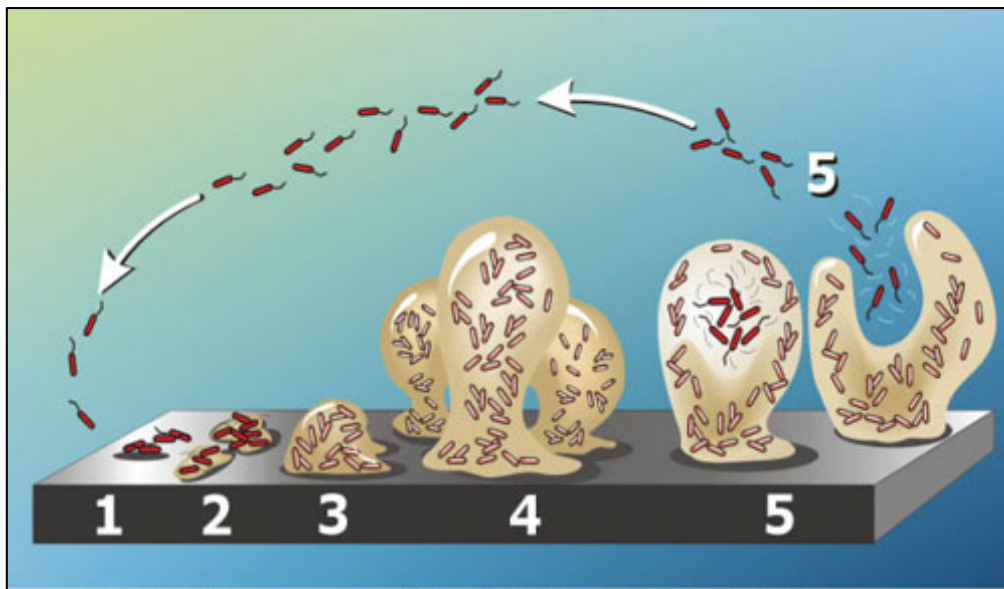


Figura 1.5: Etapas del desarrollo de una biocapa. Fase 1: unión inicial de células a la superficie. Fase 2: producción de la sustancia extracelular polimérica. Fase 3: desarrollo inicial de la arquitectura de la biocapa (colonización). Fase 4: maduración de la arquitectura de la biocapa. Fase 5: dispersión de células de la biocapa. (Modificada de Monroe, D "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms" PLoS Biol, Vol 5, issue 11).

1.3.1.1 Acondicionamiento de la superficie del biomaterial

La formación de la biocapa comienza con la adsorción de una fina película orgánica sobre un sustrato. Esta película puede cambiar drásticamente las características fisicoquímicas del sustrato dependiendo del tipo de molécula adsorbida sobre la superficie.

Existen factores externos físico-químicos que influyen sobre la adhesión de las bacterias desde un medio líquido a un medio sólido:

-Factores físicos: los factores físicos más importantes son la tensión de cizallamiento, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen el transporte, los fenómenos interfaciales, el desprendimiento y las reacciones en la interfase ²⁷.

-Factores químicos: los factores químicos son numerosos, algunos de los más importantes son la composición de la superficie del sustrato, la composición del medio en el que se desarrolla la biocapa, el pH y el oxígeno disuelto ²⁷.

La materia orgánica presente en el agua se adsorbe sobre las superficies de los implantes y forma lo que se conoce como “película acondicionadora”, cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido tornándola más amigable para la adhesión bacteriana.

1.3.1.2 Unión reversible

Cuando una bacteria alcanza una superficie, diferentes procesos físicos, químicos y biológicos tienen lugar entre dicha superficie y la bacteria. En superficies abióticas, como los biomateriales, esta unión inicial es reversible y está mediada por

interacciones no específicas tales como fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas o de van der Waals²⁵ (Figura 1.6).

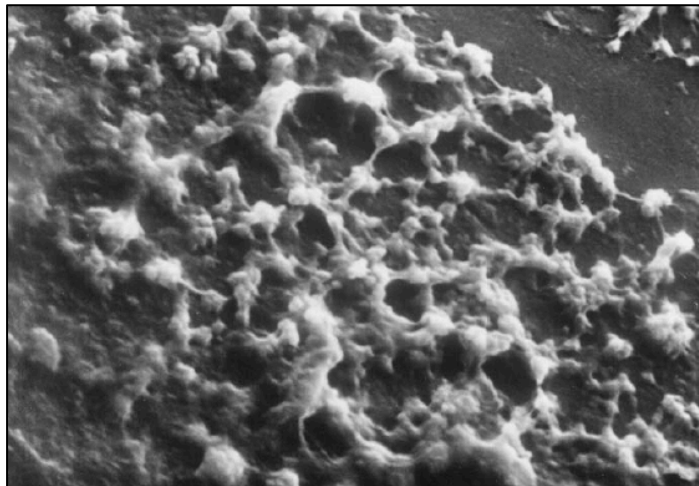


Figura 1.6: Imagen de la colonización de un tubo endotraqueal por *Staphylococcus* en sus estadios iniciales (Modificada de Pace J et al²⁸).

1.3.1.3 Unión irreversible

Después de la unión inicial reversible de las bacterias a la superficie del biomaterial, éstas comienzan a producir una sustancia o matriz extracelular exopolimérica y así se inicia el proceso de adhesión irreversible, proliferación y acumulación en multicapas (Figura 1.7). La matriz extracelular exopolimérica está compuesta por una mezcla de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias que juegan un papel fundamental en “cementar” las células bacterianas en la estructura de la biocapa, ayudando a atrapar y retener nutrientes para el crecimiento de la misma y a proteger a las células bacterianas de los efectos de la deshidratación y agentes antimicrobianos²⁸.

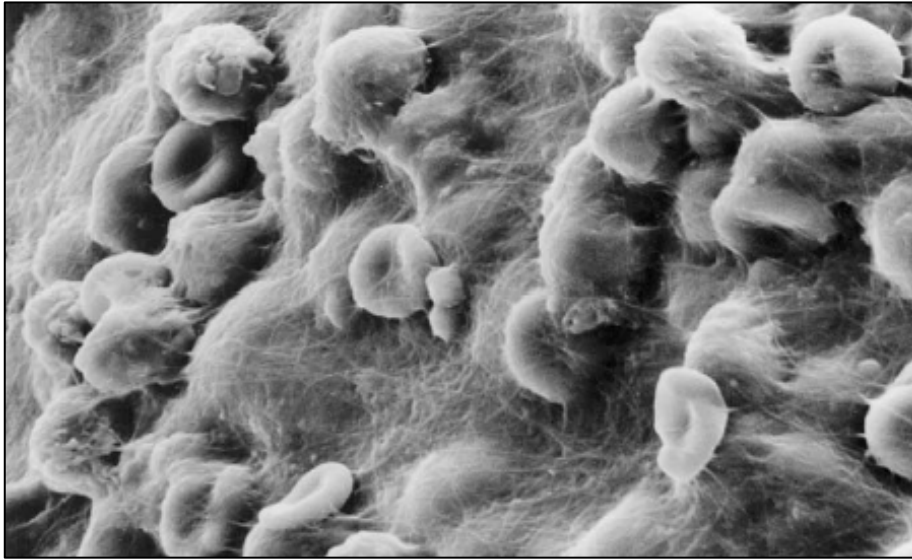


Figura 1.7 : Biomaterial infectado mostrando una biocapa estrechamente adherida al mismo (Modificada de Pace J et al²⁸).

S. aureus posee en su superficie una variedad de componentes llamados “adhesinas” que facilitan su adhesión a biomateriales y a las proteínas de la matriz extracelular depositadas en la superficie del biomaterial²⁹. Gross *et al.* demostraron que los ácidos teicoicos de la pared celular del *S. aureus* poseen una carga negativa y juegan un papel clave en la formación de la biocapa actuando como adhesinas³⁰. Por otro lado la adhesina intercelular polisacárida (PIA) es necesaria para la formación de la biocapa y para la adhesión bacteria-bacteria. Esta adhesina es responsable de la producción de la matriz extracelular polisacárida que fabrica la biocapa³¹.

1.3.1.4 Maduración

Una vez que la bacteria se ha unido irreversiblemente a la superficie, las células bacterianas sufren cambios en el fenotipo y el proceso de maduración comienza.

Las bacterias forman “microcolonias” por crecimiento clonal de las células ya unidas o por agregación de nuevas unidades planctónicas del medio. La unión de estas células genera una gran cantidad de componentes extracelulares que interactúan con moléculas orgánicas e inorgánicas del medio circundante creando el glicocalix²⁸ (Figura 1.8).

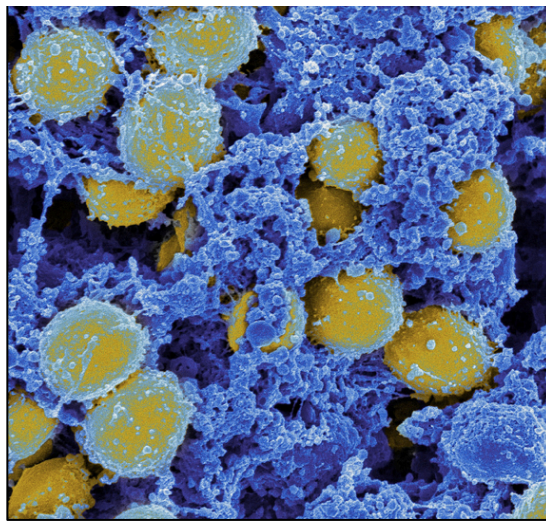


Figura 1.8: Imagen de microscopía electrónica de una colonia de *Staphylococcus aureus* y la matriz extracelular que forma el glicocalix (azul) (modificada de <http://www.flickr.com/photos/niaid/7739552618/>).

La microscopía láser con focal permite una reconstrucción computerizada sin distorsión apreciable de la arquitectura de la biocapa. Esta técnica revela la estructura tridimensional de la biocapa que se ha descrito como “torres de goma” con aspecto de “setas”, cada una de las cuales está adherida al sustrato. Entre ellas hay unos canales que facilitan el acceso de los nutrientes a las células adheridas y la dispersión de los elementos de desecho. Algunos han sugerido que las microcolonias constituyen la unidad básica de la biocapa, igual que los tejidos en organismos más

evolucionados. Por analogía, los canales dentro de la biocapa representan un “sistema circulatorio” muy primitivo equivalente al de organismos superiores ²⁶ (Figura 1. 9).

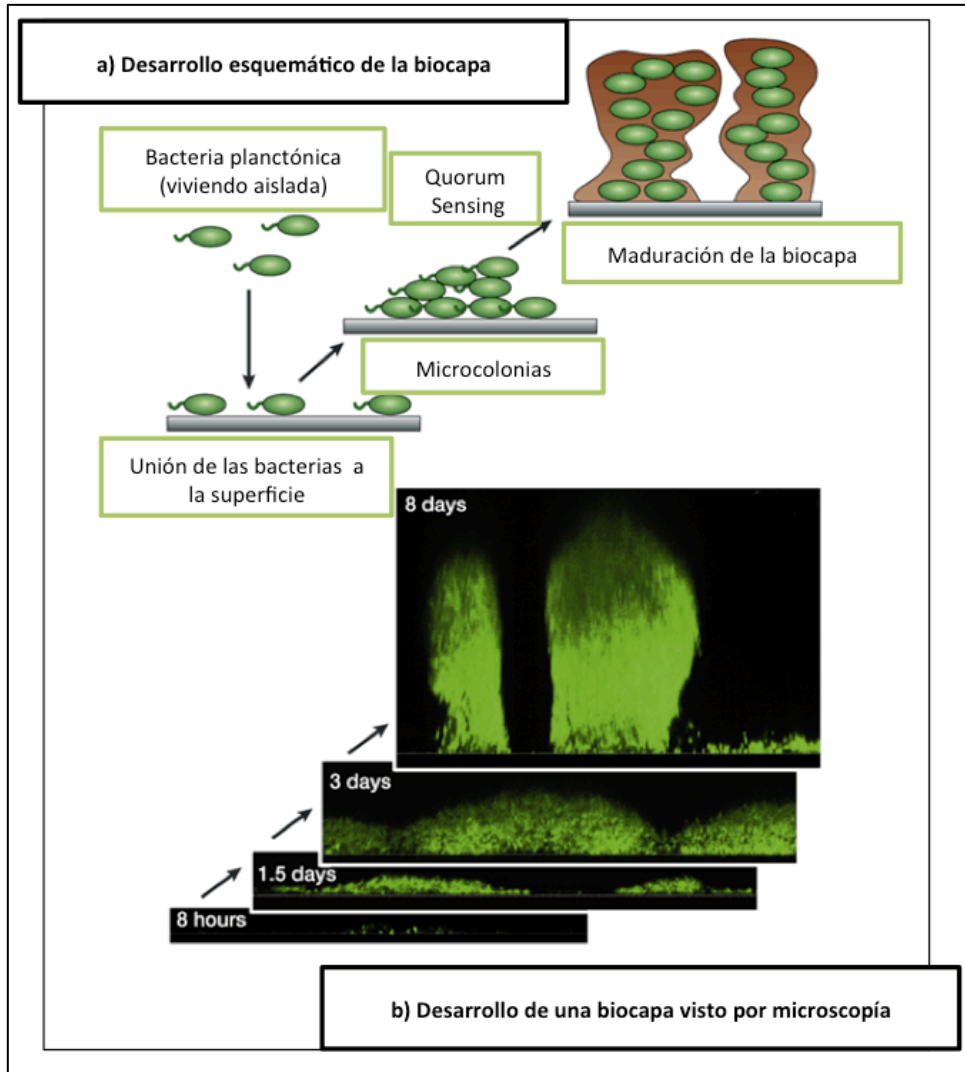


Figura 1.9: a) Desarrollo esquemático de la biocapa. b) Desarrollo de una biocapa visto por microscopía desde las primeras horas a los 8 días (modificada de http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com.es/2008_05_01_archive.html).

A pesar de todo ello, existen muchos microambientes dentro de una biocapa dependiendo de condiciones locales tales como disponibilidad de nutrientes, pH, potencial oxidante (redox), etc .

Las células cerca de la superficie de la biocapa, en las microcolonias, están expuestas a grandes cantidades de oxígeno, mientras que en el centro existe un ambiente anaeróbico. Existe un gradiente similar con respecto a los nutrientes y metabolitos en la biocapa, lo cual crea un ambiente heterogéneo incluso para una biocapa formada por una sola especie ^{32, 33}. Esta heterogeneidad metabólica y estructural proporciona a la comunidad una enorme capacidad para resistir el estrés tanto de los sistemas de defensas del huésped como de los agentes antimicrobianos ³⁴.

1.3.1.5 Disolución de la biocapa

Las células bacterianas de la biocapa tienen además la capacidad de separarse de la misma y reentrar en estado planctónico pudiéndose adherir a áreas vírgenes e iniciando un nuevo ciclo de formación de biocapa. Se ha sugerido que la necesidad de nutrientes o la presencia de sustancias agresivas puede conducir al desprendimiento de células en busca de ambientes nutritivamente ricos o menos nocivos mediante un mecanismo aún desconocido ³⁵. Por lo tanto la formación de biocapa es un proceso cíclico en su naturaleza (Figura 1-5). El flujo hidrodinámico de líquido sobre y a través de la biocapa fragmentaría partes de la misma y las llevaría fuera de la superficie del biomaterial a otras regiones.

1.3.1.6 Función del *Quorum Sensing* en la formación de biocapas

Las células de las bacterias se comunican entre sí a través de la secreción y captación de pequeñas moléculas difusibles. La formación de la biocapa podría estar regulada por la expresión de determinados genes controlados por señales de comunicación intercelular o *quorum sensing* (QS) ³⁶ (Figura 1.10). Numerosas especies bacterianas poseen este mecanismo de comunicación mediante el cual las bacterias pueden actuar ante cambios en su ambiente coordinando la expresión genética a favor de la supervivencia de la comunidad entera ^{36, 37}.

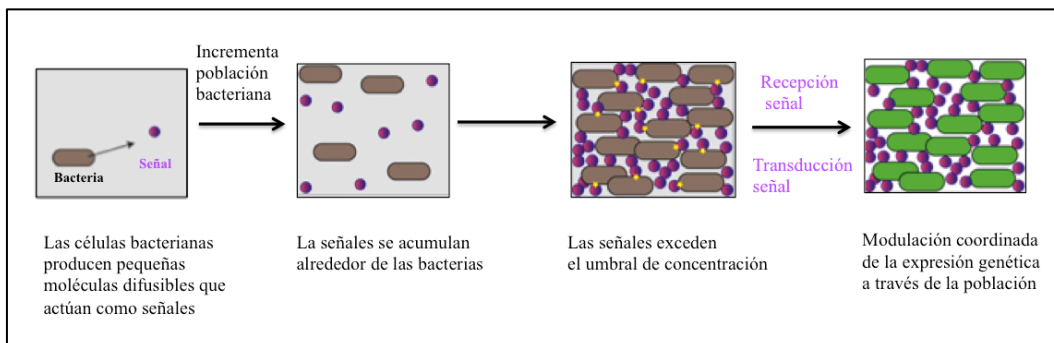


Figura 1-10: Representación esquemática de la regulación genética bacteriana mediante “*quorum sensing*” (QS) (Modificado de http://www.lifesci.dundee.ac.uk/groups/sarah_coulthurst/research.html).

1.4 Resistencia de las biocapas

Para desarrollar estrategias capaces de erradicar las biocapas es necesario analizar previamente los mecanismos de resistencia que las caracteriza. Se ha demostrado que las células de las biocapas pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, gentamicina, etc.) y de biocidas ^{4, 38, 39} que las mismas células en su estado planctónico.

Las biocapas presentan diversos mecanismos de resistencia (Figura 1-11):

- Penetración restringida y degradación de antibióticos.

La penetración de algunos agentes antimicrobianos en la biocapa está restringida por la presencia de exopolisacáridos de la matriz extracelular que limitan la difusión de estas sustancias. La unión del antimicrobiano a las bacterias más externas proporciona una resistencia efectiva a las células del interior de la biocapa

⁴⁰.

- Baja tasa de crecimiento.

Generalmente todos los antibióticos atacan de forma más efectiva las células de rápido crecimiento, condición que es absolutamente requerida para que algunos antibióticos puedan actuar. Por ese motivo, la disminución de la tasa de crecimiento dentro de ciertos sectores de la biocapa es una estrategia efectiva para la supervivencia de dichas células. Otro mecanismo que contribuye indirectamente a la disminución del crecimiento es el gradiente de concentración de oxígeno y pH que se establece dentro del biocapa. Así por ejemplo, el oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente sobre la eficiencia de ciertos antibióticos ⁴⁰.

- Cambios fenotípicos.

Las bacterias expresan genes en respuesta a fluctuaciones ambientales como cambios de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno, daños de ADN, los cuales se transfieren entre ellas logrando un mecanismo de supervivencia específico y la resistencia al ataque de numerosos agentes ⁴¹. Entre ellos pueden mencionarse las bombas de difusión de multiresistencia a los medicamentos como la expresada por *Escherichia coli* en respuesta al cloranfenicol ⁴².

- Persistencia bacteriana.

La persistencia, último factor considerado recientemente, se relaciona con la capacidad de un cierto número de células de la biocapa de resistir al ambiente agresivo. Las bacterias de las biocapas no solo evaden el ataque de los antibióticos, también resisten a los desinfectantes químicos ⁴⁰.

Estos factores son usados tanto solos o en combinación para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades.

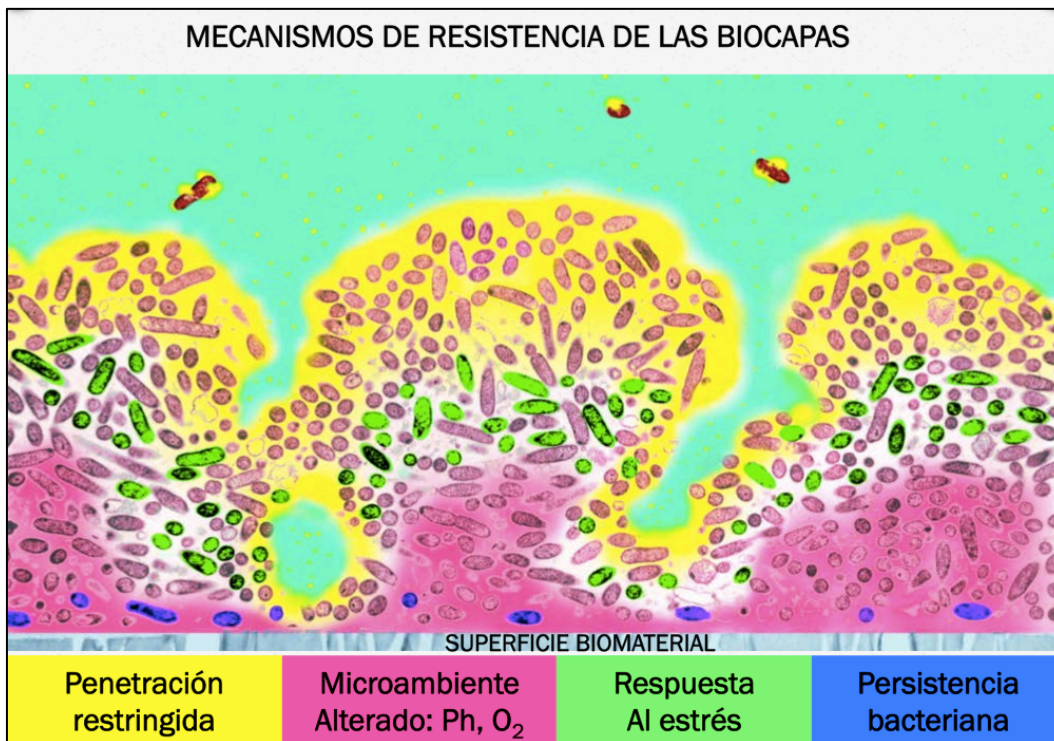


Figura 1-11: Imagen que representa los cuatro mecanismos de resistencia de las biocapas. (Modificado de <http://aem.asm.org/content/72/3/2005/F1.expansion.html>).

1.5 Estado actual de las estrategias para la prevención de biocapas

Basadas en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la biocapa, las posibles estrategias para impedir la formación de esta estructura están fundamentadas en: inhibición de la adhesión microbiana a la superficie y su colonización ulterior, interferencia con la señales moleculares que modulan el desarrollo de la biocapa, promover la muerte bacteriana dentro de una biocapa establecida y la disgregación de la matriz de la biocapa.

1.5.1 Inhibición de la adhesión bacteriana a la superficie del implante

La adhesión microbiana depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del material constituyente del dispositivo médico, siendo la hidrofobicidad y la superficie de carga las propiedades más importantes.

La prevención de la adhesión bacteriana puede realizarse mediante modificación de la superficie del implante, por modificación de la topografía y/o superficie química del material, o por el uso de recubrimientos antimicrobianos, antisépticos o proteínas.

1.5.1.1 Modificaciones de la superficie

Diferentes tratamientos de superficie se han utilizado para modificar la topografía y la superficie química del titanio y sus aleaciones.

Un abordaje es pulir la superficie del metal ⁴³, ya que la rugosidad de la superficie favorece la adhesión bacteriana debido al incremento en el área de superficie ⁴⁴.

Otra posibilidad es recubrir la superficie de titanio con iones nitrógenos los cuales afectan a la resistividad y topografía química de la superficie ⁴⁵. El recubrimiento con iones nitrógeno induce unión de fibroblastos y su crecimiento e inhiben la adhesión de *S. aureus* a la superficie del biomaterial ^{46,47}.

La radiación ultravioleta (UV) puede conducir a un "espontáneo" incremento de la humectabilidad en el dióxido de titanio ⁴⁸. Experimentos *in vitro* señalan que el tratamiento con radiaciones ultravioletas del Ti₆Al₄V inhibe la adhesión bacteriana sin comprometer la buena respuesta de las células formadoras de hueso a esta aleación y podría ser una forma relativamente simple y económica de repeler la colonización bacteriana ⁴⁹.

1.5.1.2 Recubrimientos hidrofílicos

Dada la naturaleza hidrofóbica de las superficies microbianas ⁵⁰ la prevención de la adhesión bacteriana puede ser obtenida por :

- Recubrimientos con proteínas hidrofílicas como la heparina ⁵¹ o la albúmina ⁵² que interfieren con la interacción hidrofóbica entre la superficie y la pared celular bacteriana dificultando la adhesión bacteriana inicial ⁵³.
- Recubrimientos de la superficie del implante con ácido hialurónico ⁵⁴ y polímeros hidrofílicos como el poly-N-vinilpirrolidona ⁵⁵ utilizados en catéteres de poliuretano y silicona.

1.5.1.3 Implantes recubiertos de antibióticos, antisépticos y otras sustancias antimicrobianas

Para prevención de infecciones en artroplastia total de rodillas y caderas se han utilizado cementos óseos de polimetacrilato impregnados en antibióticos tales como gentamicina, rifampicina, vancomicina y tobramicina, aislados o en combinación. El más apropiado es la gentamicina por sus propiedades fisicoquímicas y su actividad antimicrobiana ^{56, 57}.

Nuevos biomateriales recubiertos de antibióticos están siendo investigados, sin embargo su uso para la prevención de infecciones es controvertido. La concentración de los agentes bactericidas cargados en dichos biomateriales podría producir toxicidad local o sistémica y la prolongada liberación de antibióticos en cantidades subinhibitoria podría generar la aparición de nuevas cepas de microorganismos resistentes ⁵⁸.

Una atractiva alternativa es utilizar recubrimientos con antisépticos tales como la clorhexidina o los compuestos de amonio cuaternario ^{59, 60}, pero su potencial toxicidad para las células del hospedador ⁶¹, las reacciones de hipersensibilidad ⁶² y la aparición de posibles resistencias ⁶³ limitan su uso.

En este contexto las sustancias naturales empleadas tradicionalmente en terapéutica, podrían jugar un importante papel.

El farnesol es un alcohol sesquiterpeno que se encuentra en los aceites esenciales de determinados frutos cítricos con actividad antimicótica y antibacteriana. Recientemente se ha demostrado *in vitro* la eficacia antimicrobiana

del farnesol para la prevención de formación de biocapas de *S. aureus* sobre discos de titanio ⁶⁴.

1.5.2 Interferencia con el *Quorum Sensing*

Las bacterias se comunican unas con otras usando pequeñas moléculas difusibles llamadas autoinductores. Este proceso de comunicación, conocido como *quorum sensing (QS)*, juega un importante papel en la supervivencia de la biocapa ²³.

El uso de moléculas que interfieran con el *quorum sensing* es una herramienta prometedora para el tratamiento de las infecciones asociadas a biocapa ^{65, 66} (Figura 1.12).

En bacterias Gram positivas, el péptido inhibidor RNAIII (RIP) es un inhibidor del QS eficaz en la prevención y tratamiento de infecciones estafilocócicas asociadas con implantes ortopédicos. Usando un modelo en ratas, Anguita-Alonso *et al.* ⁶⁷ publicaron que implantando lechos de polimetacrilato unidos a RIP, éste era capaz de prevenir la formación de biocapas de SAMR.

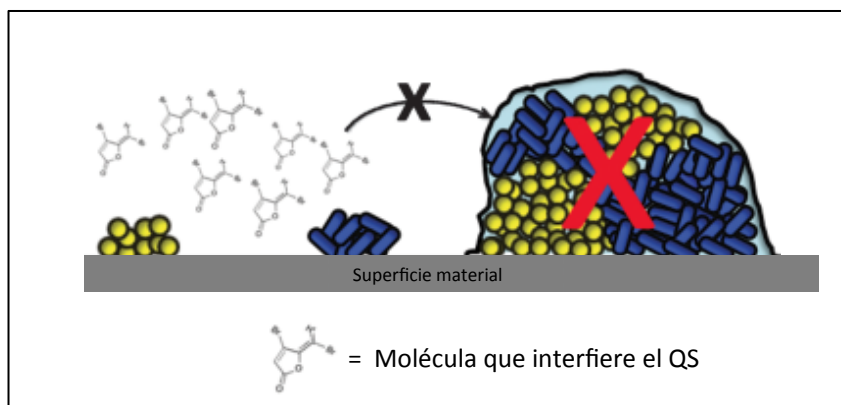


Figura 1.12: Prevención de biocapa mediante agentes que interfieren con el QS (Modificado de Francolini *et al* ⁶⁸).

1.5.3 Promover la muerte bacteriana dentro de una biocapa establecida

Se han desarrollado distintas estrategias para incrementar la eficacia de los antibióticos en las infecciones basadas en biocapas.

1.5.3.1 Combinación de antibióticos e inhibidores del QS

Hentzer *et al.*⁶⁹ demostraron *in vitro* e *in vivo* que la asociación de furanona, un inhibidor del QS de *Pseudomonas*, junto a la tobramicina incrementaba la susceptibilidad de las biocapas a este antibiótico (Figura 1.13).

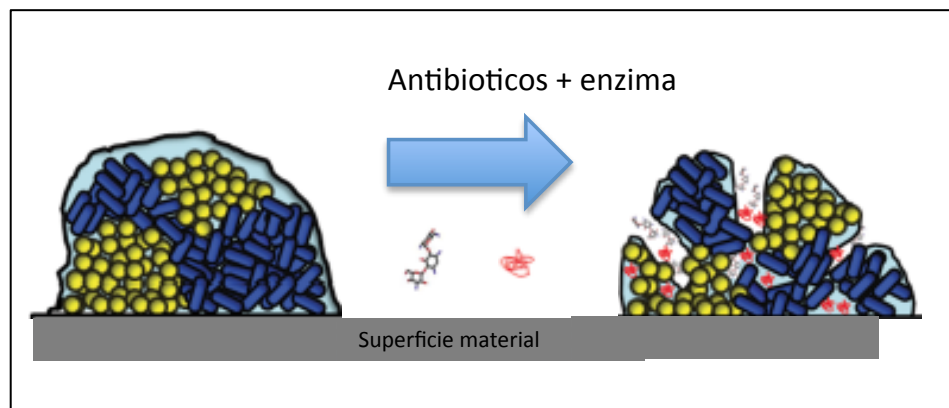


Figura 1.13: Promover la muerte de una biocapa establecida por asociación de antibióticos y enzimas (Modificado de Francolini *et al.*⁶⁸).

1.5.3.2 Efecto bioeléctrico

Experimentos *in vitro* han demostrado que la aplicación de una corriente apropiada puede incrementar la actividad de algunos agentes antimicrobianos contra las bacterias que crecen en la biocapa, es el llamado efecto bioeléctrico⁷⁰.

Pozo *et al.*⁷¹ encontraron un efecto bioeléctrico estadísticamente significativo frente a biocapas de *S. aureus* meticilino resistente al usar vancomicina más 2000 μ A de corriente continua.

1.5.3.3 Combinación antibióticos-ultrasonidos

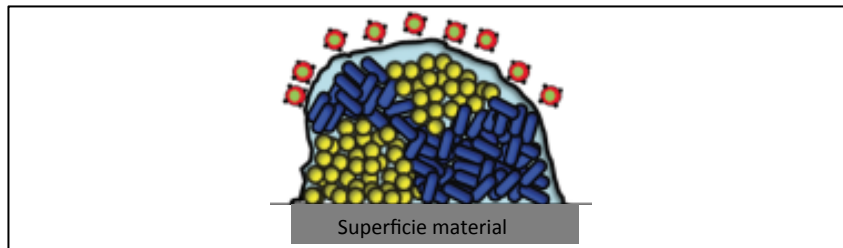
Ensing *et al.* en un modelo en conejos combinaron ondas de ultrasonidos con gentamicina en cementos óseos disminuyendo hasta en un 70% la formación de biocapa⁷².

1.5.3.4 Tratamiento fotodinámico

Se basa en la acción combinada de luz visible y drogas fotosensibilizadoras que generan especies reactivas de oxígeno citotóxico y radicales libres que son bactericidas. Di Poto *et al.*⁷³ demostraron una significativa inactivación de células de *S. aureus* cuando simultáneamente se exponían a drogas fotosensibilizadoras, el catión tetra-N-metilpridilporfina y luz visible.

1.5.3.5 Nanopartículas

Se basa en el uso de nanopartículas que sirven de objetivos para agentes antimicrobianos solos o posiblemente asociados a inhibidores del QS o enzimas. Muy interesante es el uso de nanopartículas dirigidas magnéticamente mediante campos magnéticos para concentrar el agente antimicrobiano exclusivamente en la zona infectada del dispositivo médico (Figura 1.14)⁷⁴.




 Nanopartículas magnéticas recubiertas fármacos

Figura 1.14: Uso de nanopartículas magnéticas recubiertas de fármacos para destruir biocapas (Modificado de Francolini et al ⁶⁸).

1.5.4 Disgregación de la matriz de la biocapa

Se basa en el uso de sustancias que destruyan la integridad física de la matriz de la biocapa con la consiguiente pérdida de su función como barrera protectora, exponiéndose las células microbianas a la acción de los antibióticos y las defensas inmunes del huésped (Figura 1.15) ⁷⁵.

Distintas enzimas se han utilizado con resultados satisfactorios en la prevención de biocapas de *Staphylococcus spp*: Dispersina B, proteinasa K, tripsina, pancreatina, etc. ⁷⁶.

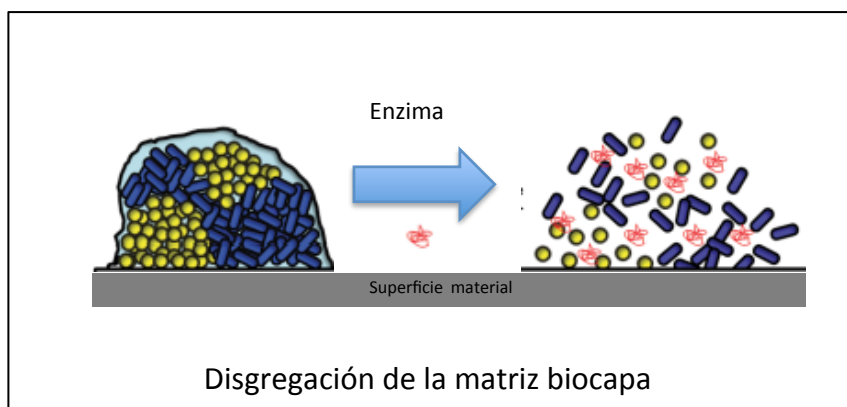


Figura 1.15: Disgregación de la matriz de la biocapa usando enzimas (Modificado de Francolini et al ⁶⁸).

1.5.5 Vacunas

Una vacuna ideal debería inducir anticuerpos para impedir la colonización bacteriana en las tempranas etapas de la infección y promover la fagocitosis por los leucocitos. El mayor obstáculo para el desarrollo de una vacuna eficaz frente a biocapas de *S. aureus* es seleccionar un antígeno adecuado. Una buena solución podría ser buscar esos antígenos a partir del grupo de adhesinas MSCRAMM "microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules", responsables de la primera colonización de la bacteria a la superficie del implante, pero existe una gran heterogeneidad en la expresión de dichas proteínas.

Actualmente no hay ninguna vacuna eficaz anti-*S. aureus* en humanos debido a la diversidad de cepas que causan la infección^{77, 78}.

1.6 Objetivos de la Tesis

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es investigar *in vivo* nuevas estrategias físico-químicas para prevenir la colonización y desarrollo ulterior de osteomielitis por *S. aureus* en implantes de Ti₆Al₄V.

La primera parte del estudio se centra en la creación de un modelo animal en ratas para conseguir infecciones por *S. aureus* sobre implantes de Ti₆Al₄V, que sea reproducible y que sirva de punto de partida para el ulterior estudio de diferentes estrategias preventivas, Capítulo II.

En la segunda parte del trabajo se estudia *in vivo* los efectos antibacterianos de las radiaciones ultravioletas en las superficies de Ti₆Al₄V y su posible utilidad clínica, Capítulo III.

En la tercera parte se investiga los efectos *in vivo* del farnesol sobre la colonización de implantes de Ti₆Al₄V por *S. aureus* y su posible utilización sinérgica junto antibióticos, Capítulo IV.

En el Capítulo V finaliza la Tesis presentando las principales conclusiones del trabajo realizado.

1.7 Bibliografía del Capítulo I

1. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89:780-5.
2. Gristina AG, Naylor PT, Webb LX. Molecular mechanisms in musculoskeletal sepsis: the race for the surface. *Instr Course Lect.* 1990; 39:471-82.
3. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* 2011; 6:1329-49.
4. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001; 358:135-8.
5. Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. *Am J Infect Control.* 2008; 36:S175 e9-11.
6. Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 65:158-68.
7. Bauer TW, Parvizi J, Kobayashi N, Krebs V. Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88:869-82.
8. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.* 2004; 350:1422-9.
9. Harris LG, Richards RG. *Staphylococci* and implant surfaces: a review. *Injury.* 2006; 37 Suppl 2:S3-14.
10. Phillips JE, Crane TP, Noy M, Elliott TS, Grimer RJ. The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey. *J Bone Joint Surg Br.* 2006; 88:943-8.

11. Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clin Orthop Relat Res.* 2008; 466:1710-5.
12. Jansen E, Varonen M, Huhtala H, Lehto, MU, Lumio J, Konttinen YT, *et al.* Incidence of prosthetic joint infections after primary knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2010; 25:87-92.
13. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK and Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty.* 2012; 27: 61-5 e1.
14. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5:751-62.
15. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004; 351:1645-54.
16. Barberan J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12 Suppl 3:93-101.
17. Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 1996; 78:647-51.
18. Perren SM. The concept of biological plating using the limited contact-dynamic compression plate (LC-DCP). Scientific background, design and application. *Injury.* 1991; 22 Suppl 1:1-41.
19. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987; 237:1588-95.
20. Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, *et al.* Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore

configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*. 2002; 23:491-501.

21. Liu XY CP, Ding CX. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science & Engineering Reports*. 2004; 47:49-121.

22. Ramadan HH. Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 14:183-6.

23. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15:167-93.

24. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284:1318-22.

25. Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15:155-66.

26. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49:711-45.

27. Characklis WG, James DBIB. Bioengineering Report. Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol Bioeng*. 2009; 102:309-347.

28. Jiang X, Pace JL. Microbial biofilms. En: Pace JL, Rupp ME, Finch RG, editores. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. NW: CRC Press Taylor & Francis Group, LLC; 2006. p. 3-19.

29. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, *et al*. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical *staphylococcal* isolates to foreign material. *J Infect Dis*. 1988; 158:693-701.

30. Gross M, Cramton SE, Gotz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun.* 2001; 69:3423-6.
31. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 1999; 67:5427-33.
32. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng.* 1994; 43:1131-8.
33. Walters MC, 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:317-23.
34. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56:187-209.
35. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:49-79.
36. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998; 280:295-8.
37. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol.* 2002; 9:859-71.
38. Brown ML, Aldrich HC, Gauthier JJ. Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61:187-93.
39. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9:34-9.

40. Diaz C. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie [Tesis doctoral]. *Departamento de Química*. Facultad de Ciencias Exactas: Universidad Nacional de La Plata, 2011, p. 262.
41. Kohler T, van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MM, Pechere JC. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2001; 183:5213-22.
42. Moreira MA, Oliveira JA, Teixeira LM, Moraes CA. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. *Vet Microbiol*. 2005; 109:75-81.
43. Lange R, Luthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng*. 2002; 19:255-61.
44. Harris LG, Tosatti S, Wieland M, Textor M, Richards RG. *Staphylococcus aureus* adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*. 2004; 25:4135-48.
45. Koerner RJ, Butterworth LA, Mayer IV, Dasbach R, Busscher HJ. Bacterial adhesion to titanium-oxy-nitride (TiNOX) coatings with different resistivities: a novel approach for the development of biomaterials. *Biomaterials*. 2002; 23:2835-40.
46. Harris LG, Richards RG. *Staphylococcus aureus* adhesion to different treated titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15:311-4.
47. Cyster LA, Parker KG, Parker TL, Grant DM. The effect of surface chemistry and nanotopography of titanium nitride (TiN) films on 3T3-L1 fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 67:138-47.

48. Watanabe T NA, Wang R, Minabe M, Koizumi S, Fujishima A HK. Photocatalytic activity and photoinduced hydrophilicity of titanium dioxide coated glass. *Thin Solid Films*. 1999; 351.
49. Gallardo-Moreno AM, Pacha-Olivenza MA, Saldana L, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, Vilaboa N, *et al.* *In vitro* biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. *Acta Biomater*. 2009; 5:181-92.
50. van der Mei HC, Leonard AJ, Weerkamp AH, Rouxhet PG, Busscher HJ. Surface properties of *Streptococcus salivarius* HB and *nonfibrillar mutants*: measurement of zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy. *J Bacteriol*. 1988; 170:2462-6.
51. Nagaoka S, Kawakami H. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation by a heparinized hydrophilic polymer. *ASAIO J*. 1995; 41:M365-8.
52. Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kivilahti J, Kononen M, Jero J. Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin. *Otol Neurotol*. 2005; 26:380-4.
53. Pascual A, Fler A, Westerdaal NA, Verhoef J. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *Eur J Clin Microbiol*. 1986; 5:518-22.
54. Cassinelli C, Morra M, Pavesio A, Renier D. Evaluation of interfacial properties of hyaluronan coated poly(methylmethacrylate) intraocular lenses. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000; 11:961-77.
55. Boelens JJ, Tan WF, Dankert J, Zaat SA. Antibacterial activity of antibiotic-soaked polyvinylpyrrolidone-grafted silicon elastomer hydrocephalus shunts. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45:221-4.

56. Neut D, Kluin OS, Crielaard BJ, van der Mei HC, Busscher HJ, Grijpma DW. A biodegradable antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate) for the treatment of osteomyelitis. *Acta Orthop*. 2009; 80:514-9.
57. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop Scand*. 2001; 72:557-71.
58. Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*. 2010; 31:6363-77.
59. DeJong ES, DeBerardino TM, Brooks DE, Nelson BJ, Campbell AA, Bottoni CR, *et al*. Antimicrobial efficacy of external fixator pins coated with a lipid stabilized hydroxyapatite/chlorhexidine complex to prevent pin tract infection in a goat model. *J Trauma*. 2001; 50:1008-14.
60. Gottenbos B, van der Mei HC, Klatter F, Nieuwenhuis P, Busscher HJ. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials*. 2002; 23:1417-23.
61. Sanchez IR, Nusbaum KE, Swaim SF, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA. Chlorhexidine diacetate and povidone-iodine cytotoxicity to canine embryonic fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *Vet Surg*. 1988; 17:182-5.
62. Ohtoshi T, Yamauchi N, Tadokoro K, Miyachi S, Suzuki S, Miyamoto T, *et al*. IgE antibody-mediated shock reaction caused by topical application of chlorhexidine. *Clin Allergy*. 1986; 16:155-61.
63. Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:2151.

64. Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirtliff ME, Greenfield EM. The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts. An *in vitro* study. *J Bone Joint Surg Am.* 2009; 91:2683-92.
65. Bjarnsholt T, Givskov M. *Quorum sensing* inhibitory drugs as next generation antimicrobials: worth the effort? *Curr Infect Dis Rep.* 2008; 10:22-8.
66. Kaufmann GF, Park J, Janda KD. Bacterial *quorum sensing*: a new target for anti-infective immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8:719-24.
67. Anguita-Alonso P, Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F, Saba V, *et al.* RNAIII-inhibiting-peptide-loaded polymethylmethacrylate prevents *in vivo* *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:2594-6.
68. Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59:227-38.
69. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, *et al.* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by *quorum sensing* inhibitors. *EMBO J.* 2003; 22:3803-15.
70. Ehrlich GD, Stoodley P, Kathju S, Zhao Y, McLeod BR, Balaban N, *et al.* Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005:59-66.
71. del Pozo JL, Rouse MS, Mandrekar JN, Sampedro MF, Steckelberg JM, Patel R. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:35-40.
72. Ensing GT, Roeder BL, Nelson JL, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ, *et al.* Effect of pulsed ultrasound in combination with gentamicin on bacterial viability in biofilms on bone cements *in vivo*. *J Appl Microbiol.* 2005; 99:443-8.

73. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. 2009; 30:3158-66.
74. Corchero JL, Villaverde A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol*. 2009; 27:468-76.
75. Kaplan JB. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs*. 2009; 32:545-54.
76. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 75:125-32.
77. Nilsson IM, Patti JM, Bremell T, Hook M, Tarkowski A. Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *J Clin Invest*. 1998; 101:2640-9.
78. Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM, Foster T. Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect Dis*. 2001; 184:1572-80.

➤ CAPÍTULO II

**MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* PARA EL
ESTUDIO DE OSTEOMIELITIS POR *S. AUREUS*
SOBRE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V**

➤ Capítulo II

Modelo experimental *in vivo* para el estudio de osteomielitis por *S. aureus* sobre implantes de Ti₆Al₄V

2.1 Introducción

Hay numerosos artículos en la literatura que usan modelos animales para el estudio de osteomielitis relacionada con biomateriales. Conejos, ratas y perros son los animales más frecuentemente utilizados en dichos modelos y tibia y fémur los huesos más empleados.

2.1.1 Modelos en ratas

Las ratas son animales relativamente económicos, de pequeña talla que facilita su manipulación y muy robustos. A pesar de su corto tamaño, los huesos largos de las ratas pueden ser taladrados, fracturados y fijados con clavos intramedulares e incluso placas de osteosíntesis.

Un modelo básico de osteomielitis tibial en ratas puede ser creado mediante la inyección de un inóculo bacteriano en el canal medular de la tibia, inserción de un cuerpo extraño y/o sellado del agujero con cera ósea^{1,2}.

Para el estudio de osteomielitis relacionada con implantes de titanio Lucke *et al.* realizaron un modelo en ratas mediante la inserción intramedular de agujas Kirschner de titanio previa inoculación de 10 µL de suspensión de *S. aureus* en el

canal medular, obteniendo así una tasa de infección muy alta.³ El número mínimo necesario de bacterias para obtener infección en este estudio fue de 10^2 UFC (unidades formadoras de colonias).

S. aureus es el agente patógeno utilizado en la mayoría de los modelos experimentales para provocar osteomielitis ya que es uno de los gérmenes que en clínica se asocia con más frecuencia a infecciones sobre biomateriales.

Los métodos básicos de evaluación de la infección en la mayoría de los estudios incluyen: examen clínico, radiográfico, microbiológico e histológico.

2.2 Objetivos

Los objetivos principales del presente trabajo son:

- Desarrollar un modelo experimental reproducible para la creación de osteomielitis relacionadas con agujas de titanio (Ti_6Al_4V) implantadas en fémures de ratas con diferentes inóculos de *S. aureus*.
- Adquirir con dicho modelo, la experiencia y destreza necesarias en el manejo perioperatorio del animal de experimentación, para ulteriormente investigar distintas estrategias para la prevención de la colonización de implantes de titanio por *S. aureus*.
- Conocer el volumen de inóculo y la dosis mínima de *S. aureus* necesarios para producir osteomielitis relacionada con implantes de titanio en un alto porcentaje de ratas.

2.3 Material y métodos

2.3.1 Material de osteosíntesis

La aleación de titanio (Ti₆Al₄V) fue suministrada por Kirschner Maschinenbau GmbH (Unterschneidheim, Alemania) en forma de alambre de dimensiones 1.2 x 150 mm. Para su posterior utilización como agujas para implantar en las ratas, los alambres de 1.2 x 150 mm se cortaron mediante un cortafrío en porciones de 1.2 x 20 mm.

Antes de su uso, las agujas se cantearon para evitar rebabas en los extremos por el corte y se limpiaron cuidadosamente con desinfectante DSF (DERQUIM DSF 11; Panreac Química S.A., España) a 60°C mediante un frotado vigoroso con un paño de algodón suave. Posteriormente se enjuagaron varias veces con agua destilada y se sometieron a un proceso de sonicación en agua desionizada (Milli-Q system), acetona al 70% y finalmente en etanol, durante períodos de tiempos de 10 minutos cada uno. Por último, se secaron en un horno a 40°C durante 1 hora y se almacenaron en un desecador durante un período no superior a 24 h.

2.3.2 Agente patógeno

El patógeno utilizado fue *Staphylococcus aureus*, la cepa ATCC 29213 (American Type Culture Collection). Se dejó crecer la bacteria durante 18-24 horas en una estufa a 37°C en caldo de soja tripticasa (Tryptic Soy Broth ó TSB) (BBL, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA). Pasado este tiempo, se procedió a los lavados del inóculo con PBS estéril (solución reguladora estéril) para eliminar los

restos de TSB. Para ello se centrifugó el cultivo 3 veces durante 5 minutos a 3000 rpm (Sorvall TC6, Dulont, Newtown, PE, USA). Finalizados los lavados, se midió en el espectrofotómetro hasta alcanzar una concentración del 82% de transmitancia y se procedió a realizar las diluciones oportunas hasta conseguir la concentración final deseada de bacterias.

2.3.3 Animal de experimentación

Todos los ensayos *in vivo* que se realizaron en los diferentes capítulos de esta Tesis fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Extremadura (número de expediente: 161/2009).

Como animales de experimentación se emplearon 20 ratas Wistar de sexo masculino de peso similar (300-350 g).

Las ratas fueron asignadas a uno de los 6 grupos que fueron creados según el tiempo previsto de eutanasia y la existencia o no de pata control (Tabla 2-1).

Así, en las ratas pertenecientes a los grupos I y II se inoculó sólo una pata con 300 ó 5000 bacterias de *S. aureus* (llamada pata estudio), y la otra pata con suero salino sin bacterias (pata control), siendo sacrificadas las ratas del grupo I a los 7 días y las del grupo II a los 28 días. En los cuatro grupos restantes se inocularon bacterias en ambas patas, pero con diferentes volúmenes de inóculos (de 2 a 10 μ L) y diferentes números de bacterias de *S. aureus* (300, 1000, 5000 y 10000) siendo sacrificados los grupos en diferentes momentos evolutivos (7, 14, 21 y 28 días).

**CAPÍTULO II: MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO PARA EL ESTUDIO DE
OSTEOMIELITIS POR *S. AUREUS* SOBRE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V**

Tabla 2-1: Resumen de la asignación de los animales a los grupos estudio.

Grupo	n	Eutanasia	Inóculo		<i>S.aureus</i> pata estudio	<i>S. aureus</i> en ambas patas
			Bacteriano Pata Dcha	Pata Izda		
I	2	7 días	300	0	si	
			5000	0		
II	2	28 días	0	300	si	
			0	5000		
III	4	7 días	300	300		si
			1000	1000		
			5000	5000		
			10000	10000		
IV	4	14 días	300	300		si
			1000	1000		
			5000	5000		
			10000	10000		
V	4	21 días	300	300		si
			1000	1000		
			5000	5000		
			10000	10000		
VI	4	28 días	300	300		si
			1000	1000		
			5000	5000		
			10000	10000		

Los animales antes y después de someterlos a la intervención quirúrgica, que se describe a continuación y en capítulos subsiguientes de la presente Tesis, se alojaron en el estabulario de la Universidad de Extremadura (UEX), en jaulas y condiciones de acuerdo con la normativa europea vigente.

2.3.4 Técnica quirúrgica

En primer lugar se pesó el animal y posteriormente se anestesió con una solución anestésica ajustada a dicho peso.

La solución anestésica estaba compuesta por: 50% ketamina, 40% diazepam y 10% atropina y la dosis que se administró fue de 0,004 ml/kg peso por vía intraperitoneal.

Una vez anestesiado el animal se procedió al afeitado de las patas traseras. Posteriormente se le trasladó al área quirúrgica donde se realizó la limpieza de la zona a intervenir, delimitándola seguidamente con povidona yodada (Figura 2.1).

Todas las intervenciones se realizaron bajo estrictas condiciones estériles, uso de bata y guantes estériles, gorro y mascarilla, en un quirófano convencional situado en el animalario de la Facultad de Medicina de la UEX.

Tras la colocación rutinaria de los campos estériles para aislar la zona se identificó la rótula por palpación, se realizó abordaje pararrotuliano interno de 1 cm seccionando mediante bisturí las estructuras periarticulares de la cara interna de la articulación de la rodilla, para poder así luxar la rótula hacia el lado externo. Esta maniobra se acompañó con un movimiento de flexo-extensión de la rodilla, que dejaba expuestos los cóndilos femorales (Figuras 2.2 y 2.3).



Figura 2.1: Instrumental básico de quirófano empleado para la intervención de las ratas.

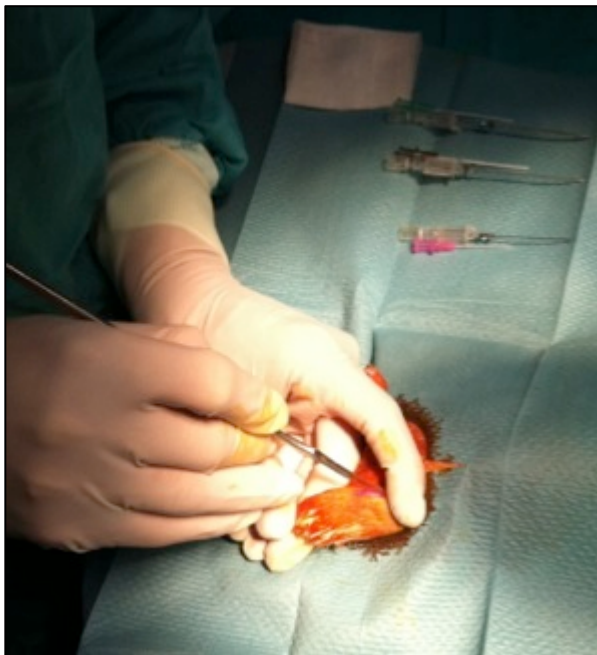


Figura 2.2: Incisión parrotuliana interna.

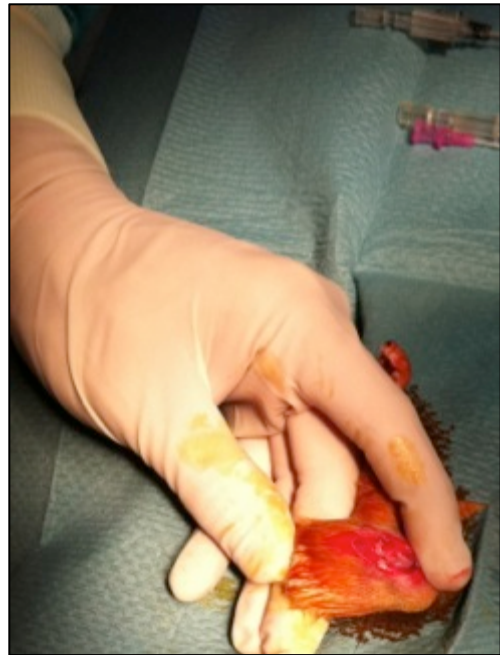


Figura 2.3: Artrotomía de rodilla con exposición de los cóndilos femorales.

Se practicó un orificio en la región intercondílea mediante punción manual con la aguja de un catéter Abbocath del número 20, avanzando en profundidad desde la zona metafisaria hasta contactar con el macizo trocantérico, creando así un canal intramedular en la diáfisis femoral de unos 3,5 cm de longitud, respetando siempre las corticales. Se amplió posteriormente el diámetro de dicho canal usando agujas de Abbocath de calibre progresivamente mayores (números 18 y 16) (Figuras 2.4 y 2.5).

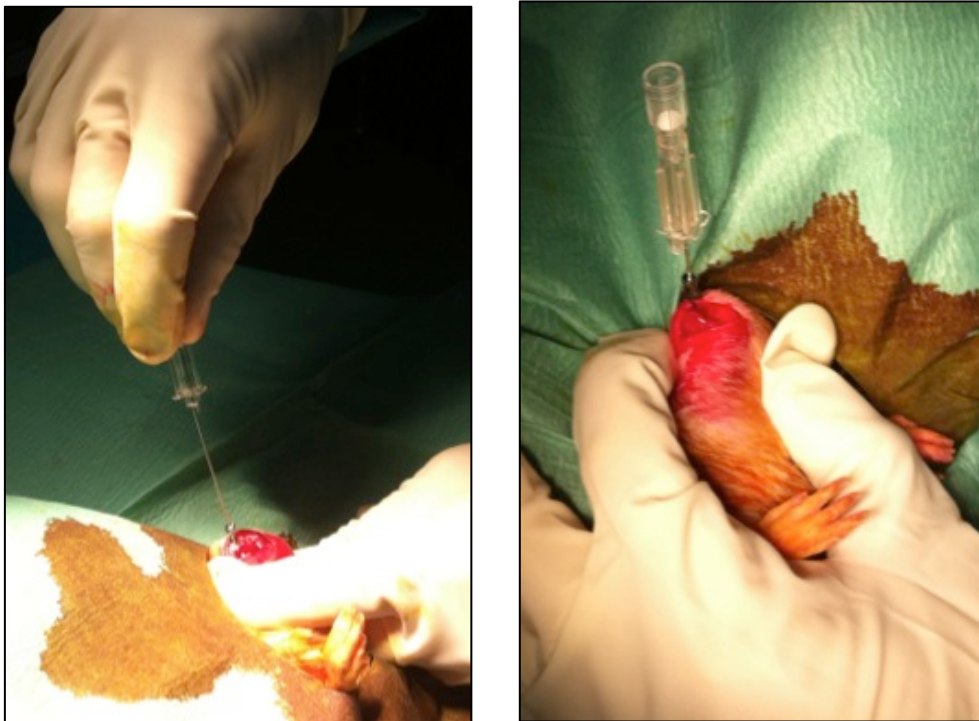


Figura 2.4: Creación manual del canal intramedular con aguja de catéter Abbocath.



Figura 2.5 Canal intramedular creado en la región intercondílea del fémur de una de las ratas.

Seguidamente con ayuda de una micro-jeringa introducida en la profundidad del canal, se inoculó lentamente, en las patas que perseguíamos la infección (que denominamos pata estudio), diferentes inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 con distintos volúmenes (2-10 μ L) y distinto número de bacterias (300-10000). En las ratas asignadas a los grupos I y II (ver Tabla 2.1), en la pata control se realizó el mismo procedimiento inoculando en lugar de *S. aureus* suero salino sin bacterias con el mismo volumen (Figura 2.6 y 2.7).

Finalmente se introdujo la aguja de titanio Ti₆Al₄V de 1.2 x 20 mm en toda su longitud en la cavidad intramedular creada de forma que no interfiriera con el rango de movilidad de la rodilla (Figura 2.8).

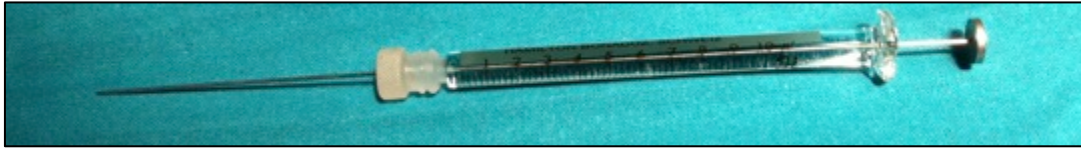


Figura 2.6: Micro-jeringa.



Figura 2.7: Inoculación de S. aureus.

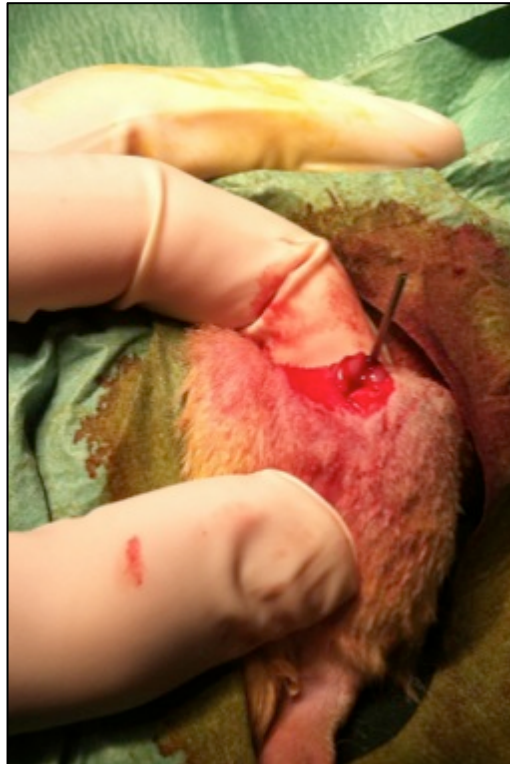


Figura 2.8: Inserción intramedular de la aguja de titanio.

Tras la limpieza con suero salino del campo quirúrgico, se procedió en primer lugar a la reducción de la rótula, para continuar con cierre del aparato extensor y piel con material no reabsorbible del 4/0 (Figura 2.9 (a)).

Una vez terminada la intervención, se limpió nuevamente la herida quirúrgica con povidona yodada y se le aplicó un apósito en forma de aerosol (Nobecutan®) (Figura 2.9 (b)).



Figura 2.9 (a): Sutura de la herida quirúrgica con material no reabsorbible.

Figura 2.9 (b): Resultado final tras limpieza con povidona yodada y apósito de Nobecutan®.

Las ratas fueron estabuladas en jaulas independientes tras la intervención durante el tiempo requerido hasta su eutanasia con alimentación y mantenimiento rutinario (Figura 2.10).



Figura 2.10: Ratas estabuladas en jaulas tras la intervención.

Los animales no fueron sometidos a tratamiento analgésico ni antimicrobiano en ningún momento del estudio.

2.3.5 Valoración clínica

Se realizaron controles diarios de la evolución clínica de los animales intervenidos mediante las siguientes variables: inflamación de partes blandas, eritema, movilidad pasiva, apoyo completo pata, peso y temperatura corporal.

La temperatura se midió con un termómetro rectal digital estándar y los animales fueron pesados en una balanza de precisión.

Estos datos fueron registrados en una tabla cuyo modelo se muestra en la Figura 2.11.

2.3.6 Valoración radiográfica

Se hicieron radiografías en el postoperatorio inmediato y controles radiográficos semanales hasta la fecha de eutanasia. En un principio en cada sesión radiológica semanal se anestesió al animal, según la pauta anteriormente referida, para facilitar el procedimiento. Para la realización de las radiografías, las patas traseras de la rata se fijaron en un molde de poliestireno expandido (poliexpan) para asegurar la inmovilidad del animal, y la obtención de proyecciones similares en todas las radiografías.

	Rata nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
DIA																													
Exploración Física																													
Inflamación:																													
Dcha																													
Izda																													
Eritema:																													
Dcha																													
Izda																													
Movilidad Pasiva:																													
Dcha																													
Izda																													
Apoyo Pierna:																													
Dcha																													
Izda																													
Peso:																													
Temperatura:																													
Muerte:																													
Evaluación Rx																													
Osteomielitis:																													
Dcha																													
Izda																													
Localización:																													
Dcha																													
Izda																													
Apariencia Rx:																													
Dcha																													
Izda																													
Examen Macroscopico																													
Localización:																													
1 epifisis dista																													
2 metafis dist																													
3 diáfisis																													
4 metafisi prox																													
5 epifisis prox																													
Examen Macroscopico:																													
0 ausencia de absceso secuestro formación activa de hueso y eritema																													
1 mínimo eritema sin absceso o nueva formación ósea																													
2 eritema y ensanchamiento de la diáfisis y condilios con nueva formación ósea.																													
3 abscesos con nueva formación ósea, sinus de drenaje o grueso exudado purulento																													
4 severa reabsorción ósea, abscesos afectación diáfisis o total.																													
Apariencia RX:																													
1 reacción periostica																													
2 osteolisis																													
3 inflamación de tejidos blandos																													
4 deformidad																													
5 secuestro																													
6 fractura espontanea																													
7 parámetro desplazamiento del implante																													
Examen Macroscopico:																													
0 ausencia de absceso secuestro formación activa de hueso y eritema																													
1 mínimo eritema sin absceso o nueva formación ósea																													
2 eritema y ensanchamiento de la diáfisis y condilios con nueva formación ósea.																													
3 abscesos con nueva formación ósea, sinus de drenaje o grueso exudado purulento																													
4 severa reabsorción ósea, abscesos afectación diáfisis o total.																													

Figura 2.11 Tabla de valoración clínica y radiológica.

El estudio radiológico se realizó en un aparato de radiología de pequeños animales modelo Faxitron (Figura 2.12) con los siguientes parámetros técnicos: 42 kV, 3 mA/s. Se utilizaron películas de alta sensibilidad marca Kodak para el revelado de las radiografías.

En los controles radiológicos se valoraba la presencia de imágenes radiológicas sugestivas de infección y su progresión. En cada radiografía se evaluaron los siguientes parámetros de acuerdo a la escala Ann y Friedman modificada ⁴: [1] Reacción perióstica, [2] Osteólisis, [3] Inflamación de partes blandas, [4] Deformidad, [5] Secuestro óseo, [6] Fracturas espontáneas, [7] Desplazamiento del implante.

Estos datos se recogían también en el modelo de tabla de la Figura 2.11.



Figura 2.12: Aparato para radiografías de pequeños animales y muestras pequeñas del modelo Faxitron (izquierda) y reveladora (derecha).

2.3.7 Eutanasia de las ratas y recogida de muestras

Siguiendo la planificación del estudio, en el momento adecuado (1-4 semanas de la intervención) se sacrificaron las ratas. La eutanasia se realizó mediante inyección intracardiaca de 0,5 ml de CIK /100 g de peso corporal, previa sedación del animal con la misma solución anestésica descrita anteriormente. Al mismo tiempo se tomó una muestra de sangre por la punción cardiaca para realizar hemocultivo y valorar la existencia de posible bacteriemia.

Inmediatamente después y bajo estrictas condiciones de asepsia en quirófano, se realizó la extirpación seriada de ambos fémures desarticulándolos de las rodillas y de las caderas con la mínima cantidad posible de tejido muscular (Figura 2.13). Siempre se tuvo la precaución de utilizar un material quirúrgico estéril para cada pata. En los grupos de ratas I y II se extrajo siempre en primer lugar el fémur control (el que había sido inoculado con suero fisiológico).

Una vez extraídos los fémures eran fracturados con una pinza gubia para obtener la aguja intramedular.

Posteriormente se realizaba un examen macroscópico de cada pieza ósea valorando la existencia de signos de osteomielitis según la clasificación de Rissing *et al.*⁵ : (0) ausencia de absceso, secuestro, formación activa de hueso y eritema, (1) mínimo eritema, sin absceso o nueva formación de hueso, (2) eritema con ensanchamiento de la cabeza y diáfisis del hueso con nueva formación de hueso, (3) absceso con nueva formación de hueso, tracto sinuoso de drenaje o exudado purulento, (4) severa reabsorción ósea, absceso e implicación diafisaria o total.

Tanto los fémures como las agujas intramedulares se recogieron en tubos

separados con PBS estéril que eran rotulados para identificar si procedían de la pata izquierda o derecha, el número de bacterias que se habían inoculado y además en los fémures y agujas de los grupos I y II se anotaba si eran de la pata estudio o de la pata control.



Figura 2.13: Fémur desarticulado

2.3.8 Procesamiento de las muestras

Para el análisis microbiológico, las muestras óseas fueron fragmentadas para facilitar la realización de las diluciones bacterianas, mientras que las agujas no requirieron ningún proceso previo.

Las diluciones bacterianas se llevaron a cabo mediante dos métodos: en primer lugar se realizó una agitación en vórtex (Heidolph Instruments GMBH & Co. KG Lab Equipment Sales, Alemania) durante 30 segundos y, en segundo lugar, se sometieron los tubos a sonicación durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos

(Ultrasons P Selecta, Madrid), para despegar las bacterias adheridas fuertemente a las muestras. Una vez resuspendidas las bacterias en el medio, se llevaron a cabo las diluciones seriadas y posterior siembra en placas de agar común. Estas placas se incubaron durante 18-24 horas a 37°C en la estufa. Pasado este tiempo, se procedió a la realización del recuento, usando una lupa, y se recogieron los datos de las unidades formadoras de colonias (UFC) que habían crecido de las diferentes diluciones de cada muestra. Para conseguir un número de unidades formadoras de colonias por muestra más exacto, se calculó la media de las mismas crecidas en la serie de diluciones de cada muestra.

2.3.9 Análisis estadístico

En primer lugar se definieron las siguientes variables:

-Grupos: (I) ratas en las cuales se inoculó en una pata *S. aureus* y en la otra pata suero salino, siendo la eutanasia a los 7 días, (II) ratas en las cuales se inoculó en una pata *S. aureus* y en la otra pata suero salino, siendo sacrificadas a los 28 días, (III) ratas en las cuales se inoculó *S. aureus* en ambas patas, siendo la eutanasia a los 7 días, (IV) ratas en las cuales se inoculó *S. aureus* en ambas patas, siendo sacrificadas a los 14 días, (V) ratas en las cuales se inoculó *S. aureus* en ambas patas, siendo la eutanasia a los 21 días, (VI) ratas en las cuales se inoculó *S. aureus* en ambas patas, siendo sacrificadas a los 28 días.

-Tiempo de eutanasia: tiempo transcurrido desde la intervención hasta el momento de sacrificio del animal, expresado en días.

-Volumen del inóculo: volumen expresado en µL inoculado en cada pata.

-Bacterias inoculadas: número aproximado de bacterias inoculadas en cada pata.

- Inóculo ≥ 1000 : (0) inóculo menor de 1000 bacterias, (1) inóculo ≥ 1000 bacterias.
- Inflamación de partes blandas: (0) ausencia, (1) presencia.
- Eritema: (0) ausencia, (1) presencia.
- Movilidad pasiva: (0) movilidad normal, (1) movilidad restringida.
- Apoyo completo de la pata: (0) si, (1) no.
- Pérdida de peso (g): diferencia entre el peso al inicio del estudio y peso en el momento del sacrificio del animal.
- Fiebre: (0) T^a corporal $< 37.8^{\circ}\text{C}$, (1) T^a corporal $\geq 37.8^{\circ}\text{C}$.
- Osteomielitis: (0) ausencia de signos radiológicos de osteomielitis, (1) presencia de algún signo.
- Reacción perióstica: (0) ausente, (1) leve, (2) moderada, (3) severa.
- Osteólisis: (0) ausente, (1) leve, (2) moderada, (3) severa.
- Inflamación de partes blandas: (0) ausente, (1) leve, (2) moderada, (3) severa.
- Deformidad: (0) ausente, (1) leve, (2) moderada, (3) severa.
- Secuestro óseo: (0) ausente, (1) leve, (2) moderado, (3) severo.
- Fracturas espontáneas: (0) ausente, (1) presente.
- Desplazamiento del implante: (0) ausente, (1) presente.
- Localización de osteomielitis: (1) epífisis distal, (2) metáfisis distal, (3) diáfisis, (4) metáfisis proximal, (5) epífisis proximal.
- Clasificación Rissing *et al.*: (0) ausencia de absceso, secuestro, formación activa de hueso y eritema, (1) mínimo eritema, sin absceso o nueva formación de hueso, (2) eritema con ensanchamiento de la cabeza y diáfisis del hueso con nueva formación de hueso, (3) absceso con nueva formación de hueso, tracto sinuoso de drenaje o exudado purulento, (4) severa reabsorción ósea, absceso e implicación diafisaria o

total.

-Recuentos en fémures: recuentos de UFC obtenidos por agitación y sonicación en los fémures.

-Recuentos en agujas: recuentos de UFC obtenidos por agitación y sonicación en las agujas de titanio.

El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 para MAC (SPSS, Chicago, IL, USA). Todos los resultados fueron expresados con medidas de tendencia central: medias y mediana.

Las diferencias en recuento de colonias recuperadas después de la inoculación entre los distintos grupos de estudio fueron valoradas utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Valores de probabilidad menores de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativo.

2.4 Resultados

En primer lugar se realizaron las pruebas de normalidad de Kolmorov-Smirnov y Shapiro –Wilk sobre las distintas variables objeto de estudio obteniéndose un resultado estadísticamente significativo en todas ellas, es decir, ninguna variable seguía una distribución normal por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis estadístico.

Tres ratas no entraron en el análisis estadístico pues murieron a consecuencia de la anestesia al realizar el estudio radiográfico (una pertenecía al grupo II y las otras 2 al grupo VI).

2.4.1 Examen clínico

La pérdida de peso medio fue, en el grupo I de 29 gramos (g) , en el grupo II 3 g, en el grupo III 30,6 g, en el grupo IV 10,6 g , en el grupo V 7 g y en el grupo VI 6,7 g. No se observó diferencias estadísticas significativas entre los grupos.

La temperatura corporal se elevó durante 2 días en 2 ratas pertenecientes ambas al grupo III y cuyos inóculos habían sido de 5000 y 10000 bacterias respectivamente.

El signo clínico más frecuentemente alterado fue la falta de apoyo completo de las patas, observándose en el 56% de los miembros en los cuales el inóculo de bacterias fue ≥ 1000 y en un 16% cuando el inóculo fue de 300 bacterias.

Los otros signos clínicos (inflamación, eritema y movilidad pasiva) sólo se observaron en una pata cuyo inóculo fue de 5000 bacterias.

Hubo dos casos de bacteriemia confirmado por sendos hemocultivos positivos correspondiendo a las dos ratas del grupo III que presentaron fiebre.

2.4.2 Examen radiológico

En las ratas del grupo I y II no hubo hallazgos radiológicos sugestivos de osteomielitis en ninguna radiografía de las patas control (Figura 2.14).

Los signos radiológicos de osteomielitis se ponían de manifiesto a partir de las 2 semanas desde la intervención.

Cuando los inóculos eran de 300 bacterias se objetivó signos de osteomielitis en el 11,1% de las patas. Para inóculos ≥ 1000 bacterias, aparecieron signos radiológicos de osteomielitis en el 71,4% de las patas.

La localización más frecuente de osteomielitis fue la metáfisis distal y epífisis distal que ocurrió en el 33% de los casos.

De los signos radiológicos de osteomielitis, según la escala de Ann y Friedman modificada, los más frecuentes fueron la elevación perióstica y la osteólisis, que aparecieron en el 100% de los casos (Figura 2.15).

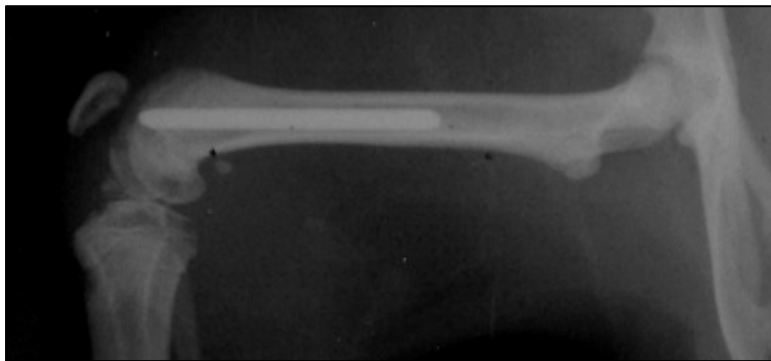


Figura 2.14 : Radiografía de fémur con aguja de titanio sin signos de osteomielitis.

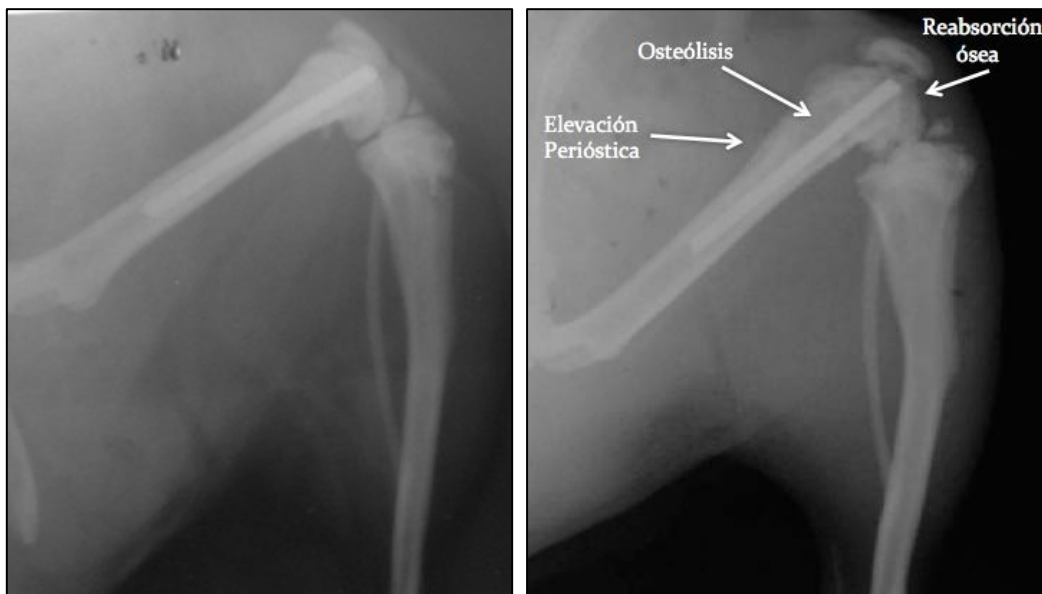


Figura 2.15: Radiografías mostrando la progresión de la osteomielitis a nivel metafisario-epifisario.

2.4.3 Examen macroscópico

En la amplia mayoría de las muestras óseas no se observó en el examen macroscópico eritema, absceso ni secuestro óseo por lo que tenían una puntuación de (0) según la escala de Rissing *et al.* En el 20% de las patas se observó únicamente eritema (1). Sólo en el 3,3% de los casos se observó absceso con formación ósea que correspondería a una puntuación de (3) de dicha escala.

2.4.4 Examen microbiológico

La recuperación de colonias bacterianas en las agujas de titanio después de la cirugía se incrementaba a medida que era mayor el número de bacterias del inóculo (Tabla 2-2) (Figura 2.16). Estas diferencias al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis no eran estadísticamente significativas.

Tabla 2-2: Resumen de los estadísticos obtenidos en agujas y fémures.

	Bacterias inoculadas	Media	Mediana	Varianza	Mínimo	Máximo	Rango
Log₁₀ recuentos UFC en agujas de Ti	300,00	2,56	2,08	1,17	2,08	4,51	2,43
	1000,00	3,00	3,03	0,29	2,26	3,76	1,50
	5000,00	3,40	3,10	1,47	2,08	5,51	3,43
	10000,00	3,28	3,40	0,43	2,56	3,81	1,26
Log₁₀ recuentos UFC en fémures	300,00	3,45	2,15	3,03	1,00	6,41	5,41
	1000,00	3,28	3,05	0,44	2,62	4,32	1,69
	5000,00	3,45	3,06	1,39	2,08	5,45	3,37
	10000,00	4,22	4,35	0,15	3,80	4,53	0,73

En las muestras de tejido óseo, la recuperación de colonias bacterianas después de la cirugía sufría un importante incremento cuando el número de bacterias del inóculo aumentaba de 5000 a 10000 bacterias (Tabla 2-2), (Figura 2.17), pero las diferencias no eran estadísticamente significativas.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes volúmenes de inóculo (2-10 µL) en la producción de osteomielitis.

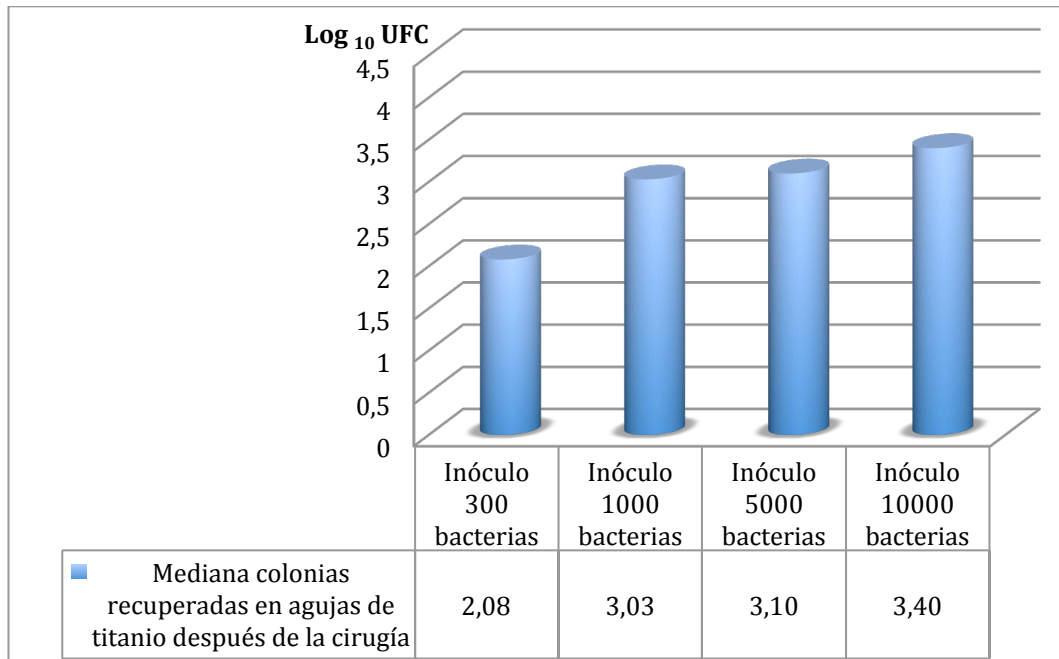


Figura 2.16: Mediana (Log_{10}) recuentos de colonias recuperadas en agujas de titanio después de la cirugía dependiendo del número de bacterias inoculadas.

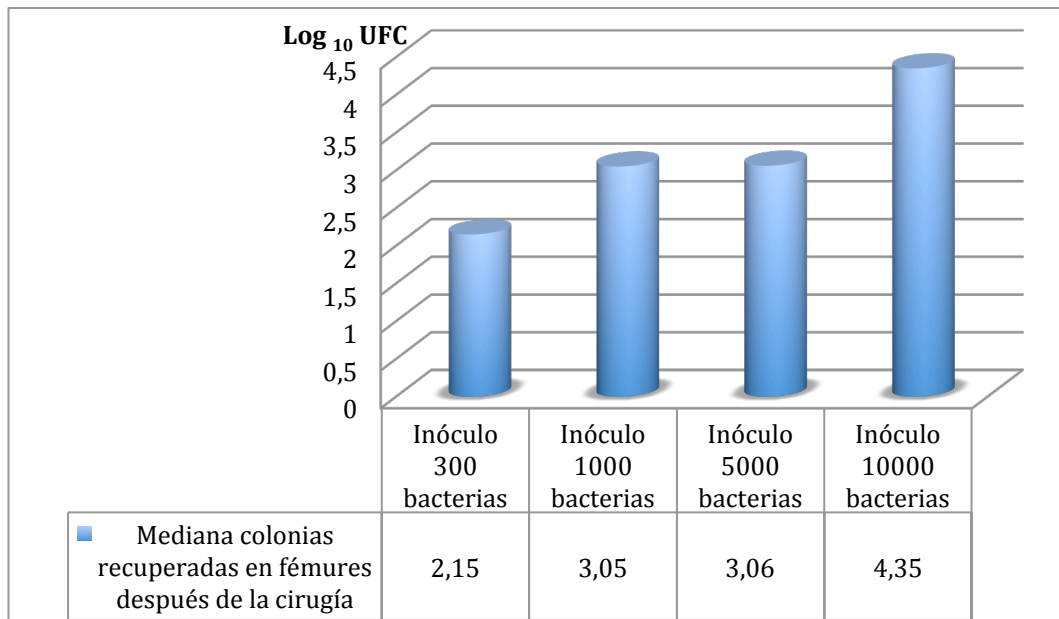


Figura 2.17: Mediana (Log_{10}) recuentos de colonias recuperadas en hueso después de la cirugía dependiendo del número de bacterias inoculadas.

2.5 Discusión

Varios modelos experimentales de osteomielitis han sido desarrollado utilizando diferentes animales, tales como ratas ^{2,5,6}, conejos ⁷, perros ⁸, cerdos ⁹ etc.

En la mayoría de los modelos de osteomielitis, incluidos modelos en ratas, se utilizan distintos agentes y estrategias para facilitar la infección ósea:

- a) Agentes esclerosantes, como el morruato de sodio ⁵ o su derivado el ácido araquidónico ¹⁰. Estas sustancias inducen necrosis ósea aséptica proporcionando las condiciones ideales para la proliferación bacteriana ².
- b) Cuerpos extraños: la existencia de cuerpos extraños proporciona superficie para adhesión bacteriana y la consiguiente formación de biocapa, dotando a las bacterias de mayor resistencia a las defensas del huésped ¹¹. Se han utilizado diferentes materiales : cemento óseo¹², material de osteosíntesis, agujas, clavos ^{3, 13}, cera ósea ^{2, 14}. Esta última sustancia y el cemento óseo son utilizadas también con el fin de sellar el agujero creado en el hueso para impedir el rebosamiento del inóculo y la formación de abscesos en tejidos blandos .
- c) Necrosis ósea térmica creada por electrocauterización ¹⁵ o por el uso de broca para abrir el canal intramedular en el hueso.
- d) Traumatismo o lesión ósea también ha sido descrito como factor favorecedor de osteomielitis ^{16,17}. La ventana ósea creada para inocular la bacteria o insertar el implante también son consideradas lesiones óseas.

En nuestro modelo experimental no hemos utilizado ningún agente esclerosante, ni utilizado broca para perforar el fémur, ni cera ósea para taponar el

agujero del canal, para intentar aislar el efecto del titanio como cuerpo extraño favorecedor de osteomielitis.

La mayoría de los estudios animales que usan modelos de infección relacionados con biomateriales usan como inóculo inicial bacterias planctónicas, con la esperanza de que estas células se unirán a la superficie del biomaterial o tejido circundante y crearán una biocapa. Hay una fuerte evidencia en la literatura que sugiere que la mayoría de las bacterias en ecosistemas naturales prefieren residir en biocapas sobre superficies sólidas¹⁸.

Pero el uso de células planctónicas como inóculo inicial tiene una serie de limitaciones como ha señalado Williams¹⁹:

- a) Las células planctónicas son más fácilmente eliminadas por el sistema inmune que las células bacterianas que residen en biocapas²⁰, además los animales tienen un sistema inmune ventajoso respecto a humanos, de ese modo cuando las células planctónicas son utilizadas en modelos *in vivo*, podría ocurrir que ellas fueran erradicadas antes de que formaran biocapas. Esto podría contribuir a la baja reproductibilidad para la inducción de osteomielitis con estos modelos²¹.
- b) Las células planctónicas son más susceptibles a antibióticos que las que residen en biocapas²² por lo tanto si se administran antibióticos inmediatamente después de la inoculación de células planctónicas éstas serían más susceptibles que las que forman biocapas.
- c) Cuando las células planctónicas son añadidas a un modelo *in vivo*, existe la posibilidad de que ellas fueran dispersadas rápidamente fuera del sitio de inoculación, lo cual diluiría la concentración de bacterias por área dada,

potencialmente haciendo más fácil al hospedador manejar la carga bacteriana y dificultar la adhesión al biomaterial ²³. En teoría si lo anterior es cierto, inóculos de mayor volumen con mismo número de bacterias serían menos efectivos en producir osteomielitis que otros de menor volumen. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias entre los distintos volúmenes de inóculos en producir osteomielitis si bien el número de casos es pequeño por lo que no podemos extrapolar conclusiones. Sí hemos observado que al inocular las bacterias en el canal intramedular del fémur siempre hay un cierto rebosamiento que es variable dependiendo del sangrado intramedular. En teoría, si el volumen del inóculo es mayor con el mismo número de bacterias, cuando se pierde por rebosamiento parte del inóculo se pierden menos bacterias que cuando los inóculos son de menor volumen con las bacterias concentradas.

Hay pocos estudios en la literatura que valoren la relación entre dosis de bacterias inoculadas y cambios radiológicos y microbiológicos en modelos de osteomielitis en ratas. Fukushima *et al.* documentaron que el desarrollo de signos significativos radiográficos e histológicos de osteomielitis requería un inóculo de al menos de 6000 bacterias/5 microlitros ². Estos autores en su trabajo no emplearon ningún material de osteosíntesis y el estudio se centró en osteomielitis aguda y solo se estudiaron las ratas durante una semana post-inoculación. Lucke *et al.* sí estudiaron esta relación en agujas de titanio concluyendo que el inóculo mínimo que producía signos radiológicos e histológicos de osteomielitis era de 100 bacterias/10 microlitros ³. Nuestro trabajo establece distintos grupos en los que se estudian ratas desde la primera semana hasta la cuarta semana post-intervención. Nosotros, al igual

que Lucke *et al*, no hemos encontrado signos radiográficos significativos de osteomielitis hasta las 2 semanas post inoculación.

La mínima dosis de inoculación que producía dicha infección en nuestro modelo en un porcentaje importante fue de 1000 bacterias.

En el examen microbiológico de la aguja y del hueso hemos encontrado variaciones importantes de animal a animal en los recuentos obtenidos de UFC, lo cual dificulta bastante el análisis. En un intento de conseguir recuentos más uniformes durante el estudio ensayamos distintas estrategias que no fueron exitosas:

- En lugar de perforar el canal hasta el macizo trocantérico, utilizar un tope atornillado en la aguja del Abbocath para conseguir que se perforara un túnel intramedular de igual longitud en todos los fémures.
- Realizar hemostasia sobre las patas para intentar controlar el sangrado y el posible rebosamiento desigual del inóculo.

A pesar de estas medidas no conseguimos disminuir la variabilidad y algunas de ellas suponían mayores dificultades técnicas por lo que se abandonaron. Estas variaciones en los recuentos obtenidos en las muestras pueden deberse a las implicaciones propias del modelo animal: variaciones anatómicas del fémur, diferencias en el fresado del canal, en la colocación del implante, en el sangrado del canal, en el sistema inmunitario de la rata, errores en el procesamiento de las muestras etc. Debido a esta variabilidad creemos que los resultados no deberían expresarse con la media como medida de tendencia central ya que ésta se ve afectada enormemente por los valores extremos sino con la mediana y así lo hemos hecho en nuestro estudio.

Durante el estudio tuvimos tres éxitos en ratas, cuyo tiempo de eutanasia estaba previsto a los 28 días. Una rata del grupo II, a las 2 semanas de la intervención, en el tercer estudio radiológico y las otras dos del grupo VI, al realizar el segundo estudio radiológico. Desconocemos la causa. No sabemos si pudo ser debido a la falta de destreza en el manejo anestésico de la rata, ya que estos sucesos tuvieron lugar al principio del estudio o pudiera estar relacionado con la anestesia repetida del animal en un tiempo relativamente corto. No hemos encontrado en la literatura ningún artículo que relacione mortalidad en ratas con uso repetido de estos compuestos. Debido a estas muertes se decidió no anestesiarse a los animales al realizar los estudios radiológicos.

Este trabajo tiene una serie de importantes limitaciones:

- Carece de análisis histológico o microscópico que confirme el diagnóstico de osteomielitis. ¿Qué ocurre en las ratas del grupo I y III que se sacrificaron a la semana de la intervención? ¿cuántas de ellas tenían osteomielitis? No lo sabemos, porque el diagnóstico de osteomielitis lo hemos basado en el estudio radiológico y no existen signos radiológicos de osteomielitis hasta las dos semanas.

- El limitado número de animales no permite que el trabajo tenga la suficiente potencia estadística para extrapolar ningún tipo de certeza.

A pesar de las limitaciones sí creemos que hemos alcanzado los objetivos principales que nos marcamos con este trabajo, que fueron:

-Realizar un estudio piloto, que sirviera de punto de partida para adquirir la experiencia y destreza necesaria en el manejo perioperatorio del animal de experimentación, para seguidamente investigar distintas estrategias para la prevención de la colonización de implantes de titanio por *S. aureus*.

-Crear un modelo de osteomielitis relacionado con implantes de titanio que fuera reproducible y averiguar la dosis mínima de bacterias que provocara infección ósea en un porcentaje significativo de ratas. En nuestro caso, con una dosis de inóculo mayor o igual de 1000 bacterias obteníamos signos radiológicos de osteomielitis en el 71% de las patas .

2.6 Conclusiones

En nuestro modelo, el inóculo mínimo para generar una osteomielitis experimental por *S. aureus* en ratas relacionada con implantes de Ti₆Al₄V sin necesidad de medios adyuvantes es de 1000 bacterias.

2.7 Bibliografía del Capítulo II

1. Hamblen DL. Hyperbaric oxygenation. Its effect on experimental *staphylococcal* osteomyelitis in rats. *J Bone Joint Surg Am.* 1968; 50:1129-41.
2. Fukushima N, Yokoyama K, Sasahara T, Dobashi Y, Itoman M. Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005; 125:169-76.
3. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Stemberger A, *et al.* A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003; 67:593-602.
4. An YH, Friedman RJ. Animal models of orthopedic implant infection. *J Invest Surg.* 1998; 11:139-46.
5. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun.* 1985; 47:581-6.
6. Power ME, Olson ME, Domingue PA, Costerton JW. A rat model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that provides a suitable system for studying the human infection. *J Med Microbiol.* 1990; 33:189-98.
7. Jacob E, Arendt DM, Brook I, Durham LC, Falk MC, Schaberg SJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Staphylococcus aureus* cell walls in experimental osteomyelitis. *J Clin Microbiol.* 1985; 22:547-52.
8. Fitzgerald RH, Jr. Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg Am.* 1983; 65:371-80.

9. Passl R, Muller C, Zielinski CC, Eibl MM. A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs. *J Trauma*. 1984; 24:323-6.
10. Rissing JP, Buxton TB, Fisher J, Harris R, Shockley RK. Arachidonic acid facilitates experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun*. 1985; 49:141-4.
11. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthop Clin North Am*. 1984; 15:517-35.
12. Rodeheaver GT, Rukstalis D, Bono M, Bellamy W. A new model of bone infection used to evaluate the efficacy of antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate cement. *Clin Orthop Relat Res*. 1983;178:303-11.
13. Petty W, Spanier S, Shuster JJ and Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 1985; 67:1236-44.
14. Mader JT, Stevens CM, Stevens JH, Ruble R, Lathrop JT, Calhoun JH. Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res*. 2002:58-72.
15. Patterson AL, Galloway RH, Baumgartner JC, Barsoum IS. Development of chronic mandibular osteomyelitis in a miniswine model. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993; 51:1358-62.
16. Morrissy RT, Haynes DW. Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology. *J Pediatr Orthop*. 1989; 9:447-56.

17. Buxton TB, Travis MT, O'Shea KJ, *et al.* Low-dose infectivity of *Staphylococcus aureus* (SMH strain) in traumatized rat tibiae provides a model for studying early events in contaminated bone injuries. *Comp Med.* 2005; 55:123-8.
18. Ramadan HH. Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 14:183-6.
19. Williams DL, Costerton JW. Using biofilms as initial inocula in animal models of biofilm-related infections. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100:1163-9.
20. Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol.* 2005; 175:7512-8.
21. Gaudin A, Amador Del Valle G, Hamel A, *et al.* A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbit. *Lett Appl Microbiol.* 2011; 52:253-7.
22. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006; 53:326-32.
23. Williams DL, Haymond BS, Woodbury KL, Beck JP, Moore DE, Epperson RT, *et al.* Experimental model of biofilm implant-related osteomyelitis to test combination biomaterials using biofilms as initial inocula. *J Biomed Mater Res A.* 2012; 100:1888-900.

➤ CAPÍTULO III

**ESTUDIO *IN VIVO* DE LA EFICACIA DE LAS
RADIACIONES ULTRAVIOLETAS EN LA
PREVENCIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE
IMPLANTES DE Ti_6Al_4V POR *S. AUREUS***

➤ Capítulo III

Estudio *in vivo* de la eficacia de las radiaciones ultravioletas en la prevención de la colonización de implantes de Ti₆Al₄V por *S. aureus*

3.1 Introducción

El titanio es un metal altamente reactivo con una gran afinidad química por el oxígeno, así, cuando es expuesto a la atmósfera reacciona en microsegundos formando una capa de óxido en su superficie de un grosor de 2-7nm¹ Este proceso es conocido como “pasivación”. Distintas propiedades de la superficie de implantes de titanio como son la biocompatibilidad y la resistencia a la corrosión se debe a esta capa^{1,2}. El dióxido de titanio (TiO₂) es su principal componente y se encuentra en la naturaleza en tres estructuras cristalinas: anatasa, rutilo y brookita.

3.1.1 Fotocatálisis de TiO₂

La actividad fotocatalítica del dióxido de titanio ha sido ampliamente estudiada y utilizada en aplicaciones biológicas, químicas e industriales. Se define la fotocatálisis como la habilidad de un material semiconductor para formar parejas “electrón–hueco” al absorber radiación electromagnética.

El TiO₂ es un semiconductor tipo n³ con un ancho de banda de energía de 3,2 eV para la estructura anatasa y 3 eV para la estructura rutilo. La actividad

fotocatalítica depende marcadamente del potencial redox de la superficie ⁴ y éste a su vez del ancho de banda del material. De aquí se deduce que la forma cristalina anatasa es más eficiente como material fotocatalizador que las otras formas del dióxido de titanio ⁵.

3.1.1.1 Reacciones de oxidación reducción

Cuando el TiO₂ absorbe fotones de radiación electromagnética mayores que su ancho de banda ($h\nu \geq E_g$), los electrones de la banda de valencia son promovidos a la banda de conducción del TiO₂, dejando un hueco electropositivo en la banda de valencia ⁶. De este modo se producen las parejas electrón – hueco ($e^- h^+$) en la superficie (Figura 3.1). Los electrones cargados (e^-) están espacialmente separados de los huecos electropositivos (h^+) formando separados centros oxidantes y reductores ⁶. Cuando el TiO₂ se encuentra en un medio oxigenado acuoso, los electrones cargados pueden reducir el O₂ y formar iones superóxidos (O₂⁻) mientras que los huecos electropositivos oxidizan el agua y forman radicales hidroxilos (OH[·]) (Figura 3.1). Ambos, hueco y OH[·], tienen una vida muy corta pero extremadamente reactiva al contactar con compuestos orgánicos, conduciendo a la degradación de la materia orgánica ⁷. Esta propiedad puede ser aplicada para matar bacterias.

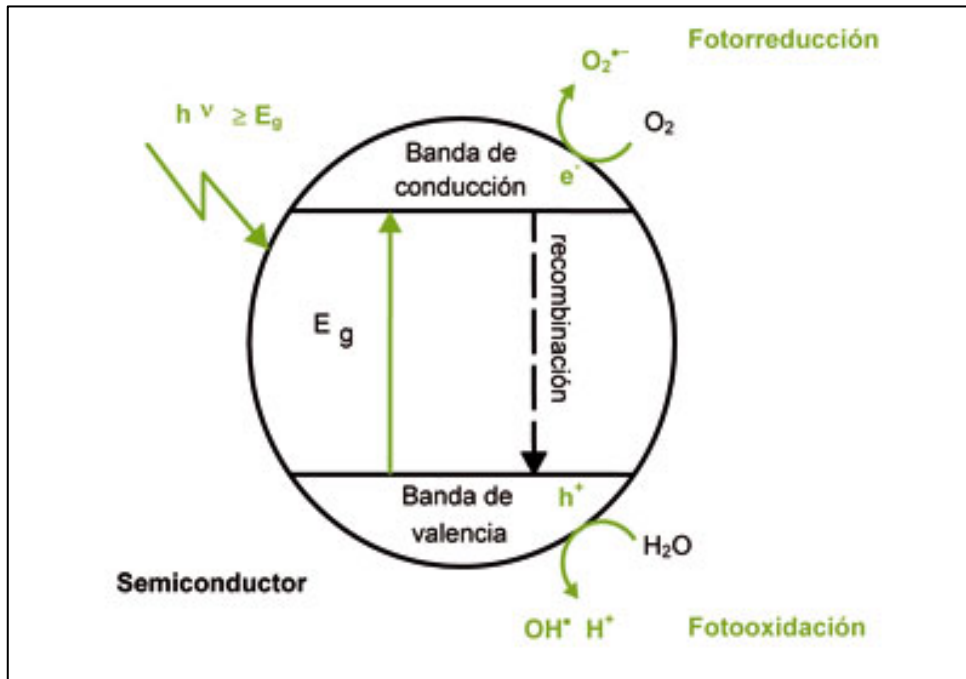


Figura 3.1: Esquema del proceso fotocatalítico del dióxido de titanio (Modificado de <http://www.interempresas.net/Quimica/Articulos/33925-Nuevo-sistema-de-eliminacion-de-compuestos-toxicos-y-corrosivos-en-aire-generados-en-EDARs.html>).

3.1.1.2 Desarrollo de superhidrofilicidad

El grado de repelencia de la superficie de un material específico al agua puede ser medido por el ángulo de contacto del agua, el cual es definido como el ángulo entre la superficie sólida y la línea tangente de la fase líquida en la interfase sólido-líquido-gas ⁸ (Figura 3.2).

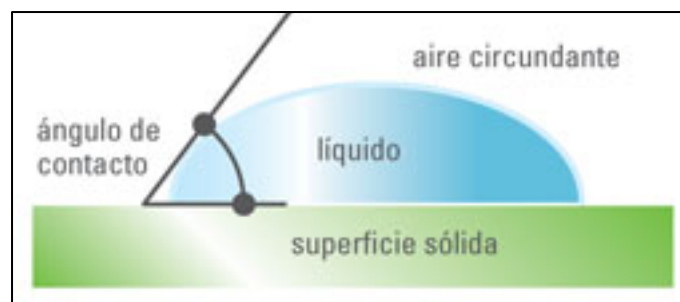


Figura 3.2: Esquema del ángulo de contacto (Modificado de <http://www.briteguard.com/109.html?L=9>).

Una superficie hidrofóbica tiene un ángulo de contacto del agua que es más elevado que el de una superficie hidrofílica. Casi ninguna superficie conocida de material inorgánico tiene un ángulo de contacto del agua menor de 10°. Cuando la superficie del dióxido de titanio es expuesto a la radiación ultravioleta provoca un efecto superhidrofílico que se traduce en un ángulo de contacto del agua que se aproxima a 0°⁹ (Figura 3.3).

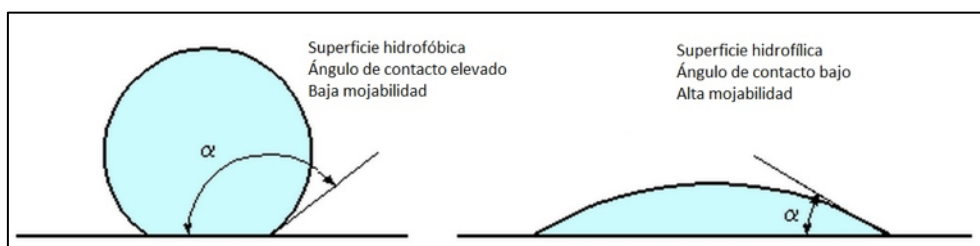


Figura 3.3: Diferencias en el ángulo de contacto entre una superficie hidrofóbica e hidrofílica (Modificado de <http://net-kreativa.blogspot.com.es/2013/07/neverwet-una-forma-respetuosa-de.html>).

3.1.1.3 Aplicaciones de la fotocatalisis

Las aplicaciones industriales del proceso fotocatalítico que tiene lugar con materiales fotoactivos son muy diversas, siendo las más conocidas la purificación de aguas, esterilización por descomposición, autolimpieza por superhidrofilicidad, etc.⁸

10.

Desde que en el año 1985 Matsunaga *et al.* publicaran que era posible matar células microbianas mediante fotocatalisis¹¹ se ha investigado ampliamente la posibilidad de inactivar y matar distintas bacterias, virus y hongos mediante fotocatalisis¹². Sin embargo, las aplicaciones médicas hasta el momento han sido únicamente experimentales sin utilización en clínica^{13, 14} posiblemente debido al efecto perjudicial de la radiación UV sobre las células humanas¹⁵.

El grupo de González-Martín ha demostrado *in vitro* que en el biomaterial Ti₆Al₄V, una vez que ha sido irradiado con luz UV, disminuye la fuerza de adherencia bacteriana sin comprometer su buena biocompatibilidad ¹⁶.

Pocos autores han estudiado los efectos remanentes que tienen lugar en un biomaterial fotocatalizador una vez que ha cesado la excitación UV. A este respecto, Gallardo-Moreno *et al.* también han observado *in vitro* que la superficie del biomaterial muestra un efecto bactericida remanente de al menos 60 minutos, tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas, siendo el efecto dependiente del tiempo de acción pero no de la cepa empleada ⁷.

3.2 Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es intentar demostrar *in vivo* los resultados obtenidos por el grupo de González-Martín *in vitro*:

- Valorar si el tratamiento de la superficie de agujas de Ti₆Al₄V con radiaciones ultravioletas previa a su implantación intramedular en fémur de ratas disminuye la tasa de colonización del implante.
- Valorar si el tratamiento de la superficie de agujas de Ti₆Al₄V con radiaciones ultravioletas previa a su implantación intramedular en fémur de ratas disminuye la tasa de colonización del hueso.
- Si se consigue demostrar que el titanio irradiado con radiaciones UV mantiene su efecto bactericida una vez implantado en un ser vivo, valorar cual es el número mínimo de bacterias inoculadas a partir del cual se pierde ese efecto protector .

- Si se consigue demostrar que el titanio irradiado con radiaciones UV mantiene su efecto bactericida una vez implantado en un ser vivo, valorar cual es la duración de dicho efecto.

3.3 Material y métodos

3.3.1 Material de osteosíntesis: Ti_6Al_4V

El material de osteosíntesis empleado en el presente trabajo fue el mismo que se describió en el apartado 2.3.1. del Capítulo II de esta Tesis.

Los alambres de 1.2 x 150 mm de Ti_6Al_4V se cortaron mediante un cortafrío en porciones de 1.2 x 20 y 1.2 x 10 mm, para llevar a cabo dos tipos de protocolos de implantación en el hospedador.

Antes del uso, las agujas se cantearon y se las sometió al mismo tratamiento anteriormente descrito en el apartado 2.3.1. del Capítulo II .

Las agujas se dividieron en dos grupos:

- Las que iban a ser empleadas como agujas control, que no fueron sometidas a ningún otro proceso.
- Las agujas que iban a ser utilizadas para estudiar el efecto bactericida de las radiaciones UV sobre la aleación de Ti_6Al_4V , las cuales fueron expuestas a una fuente de radiación UV durante 48 h con la ayuda de un dispositivo de resortes giratorios que permitía el giro constante de las agujas y que aseguraba la irradiación homogénea de la superficie de las mismas. Las agujas se colocaban en el centro de los resortes giratorios, a 10 cm de la

fuente de luz UV recibiendo una intensidad en torno a $4,2 \text{ mW/cm}^2$ (Figura 3.4).

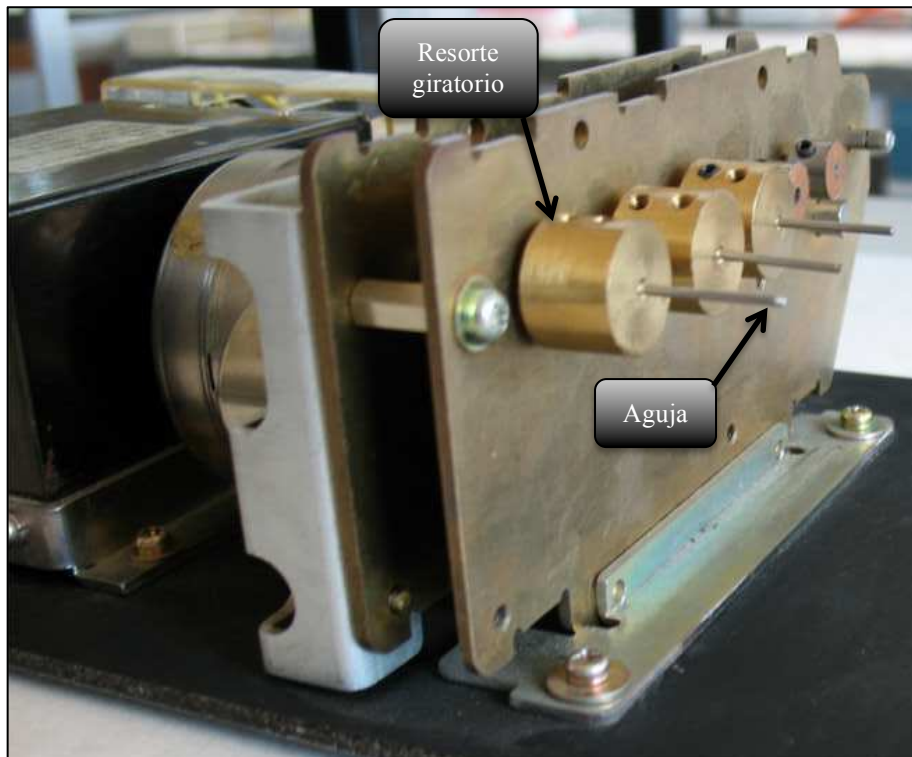


Figura 3.4: Dispositivo con resortes giratorios que permitía la irradiación homogénea de hasta tres agujas a las vez.

La lámpara de radiación ultravioleta empleada fue una modelo G15-T8, suministrada amablemente por Philips Ibérica España (Figura 3.5). Esta lámpara emite predominantemente radiación UV-C en una longitud de onda de 254 nm del espectro electromagnético (Figura 3.6).



Figura 3.5: Lámpara de radiación ultravioleta G15-T8.

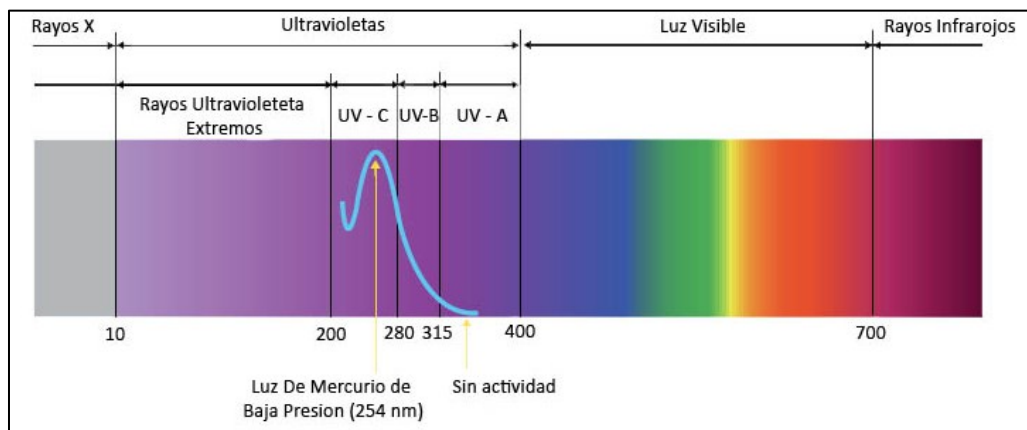


Figura 3.6: Espectro electromagnético. Las radiaciones UV-C tienen mayor poder energético, y por ello mayor poder nocivo contra el ADN celular, que las radiaciones UV-A o UV-B. 254 nm es la longitud de onda óptima para erradicar microorganismos. (Modificado de <http://esterilizacionaguauvioleta.fadecen.com/index.php/esterilizadores-uv/esterilizador-frs-dom/>).

3.3.2 Agente Patógeno

El patógeno utilizado fue *Staphylococcus aureus*, la cepa ATCC 29213 (American Type Culture Collection) con la misma preparación descrita en el apartado 2.3.3 del Capítulo II de esta Tesis.

3.3.3 Animal de experimentación

Como animales de experimentación se emplearon 56 ratas Wistar de sexo masculino de peso similar (300-350 g).

Se realizaron 2 protocolos o modelos de implantación:

- Protocolo (a) Implantación aleatoria de una aguja de titanio de 1.2 x 20 mm en el fémur de cada pata, una aguja irradiada y la otra sin irradiar. Así, en este protocolo la pata con la aguja irradiada actuaba como pata estudio, y la otra pata con la aguja sin irradiar como pata control.
- Protocolo (b) Implantación de 2 agujas de titanio de 1.2 x 10 mm en el fémur de cada pata, una aguja irradiada con luz UV y otra control sin irradiar. La localización proximal o distal en el fémur de las agujas anteriormente referidas se realizó mediante asignación aleatoria. Es decir, con este protocolo, en cada pata había dos agujas de 1.2 x 10 mm una irradiada y otra control no irradiada.

Antes del estudio definitivo con cada protocolo se realizó un estudio preliminar con 8 ratas para ensayar la técnica quirúrgica y para valorar la validez de ambos modelos. Se intervinieron 4 ratas según el protocolo (a), es decir, implantando en cada pata una aguja de 1.2 x 20 mm pero ambas sin irradiar y 4 ratas siguiendo el protocolo (b) implantando 2 agujas de titanio de 1.2 x 10 mm en cada pata, ambas

agujas sin irradiar.

Sobre las 48 ratas restantes se realizó el estudio definitivo siguiendo el protocolo de implantación (a) en 36 ratas y el protocolo de implantación (b) en 12 ratas (Tabla 3.1).

Tabla 3-1: Resumen de la asignación de los animales a los protocolos de estudio.

Protocolo	n	Eutanasia	Una aguja 1.2 x 20 mm en cada pata	Dos agujas 1.2 x 10 mm en cada pata
(a)	11	24 h	si	
(a)	10	48 h	si	
(a)	15	72 h	si	
(b)	12	24 h		si

3.3.4 Técnica quirúrgica, eutanasia, recogida y procesamiento de muestras

La técnica quirúrgica, eutanasia, recogida y procesamiento de muestras empleada sobre las ratas en este estudio fue básicamente la misma que fue descrita anteriormente en el Capítulo II apartados 2.3.4, 2.3.7 y 2.3.8 con las siguientes particularidades.

En este estudio una vez creada la cavidad intramedular la inoculación se realizó lentamente, con un volumen de 5 µL en cada pata, eran inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 con un número aproximado de bacterias oscilando entre 1360-878000.

En cada animal siempre se inoculaba el mismo número de bacterias en la pata estudio y en la pata control.

Finalmente previa asignación aleatoria, en los casos de protocolo de implantación (a) se introdujo en las cavidades intramedulares creadas en cada pata una única aguja de titanio Ti₆Al₄V de 1.2 x 20 mm, la irradiada en fémur de la pata estudio y la no irradiada en fémur de la pata control.

En los casos del protocolo de implantación (b) se introdujeron 2 agujas de titanio Ti₆Al₄V de 1.2 x 10 mm intramedular en el fémur de cada pata, una aguja irradiada y otra sin irradiar, la posición de cada aguja en cada pata, proximal o distal fue aleatoria.

La eutanasia de las ratas del protocolo (a) fue realizada a distintos tiempos 24, 48 o 72 horas post intervención, mientras que todas las ratas del protocolo (b) fueron sacrificadas a las 24 horas post-inoculación del *S.aureus*.

3.3.5 Caracterización hidrofobicidad/ hidrofilia de las agujas de titanio Ti₆Al₄V

Las agujas de aleación de titanio Ti₆Al₄V, antes y después de la irradiación con rayos ultravioleta, fueron sometidas a un análisis de hidrofobicidad para comprobar si el tipo y el tiempo de irradiación empleado eran capaces de inducir cambios hidrofílicos en la superficie de dichas agujas similares a aquellos observados en trabajos previos realizados con discos de Ti₆Al₄V ⁷. Para ello, después de ser irradiadas las agujas, estas fueron suspendidas horizontalmente dentro de la cámara ambiental de un goniómetro (G211, Krüss, Hamburgo, Alemania) con la ayuda de 2 soportes que sujetaban ambos extremos de cada aguja. Unas gotas de 1 µL de agua (Milli-Q Plus) eran cuidadosamente depositadas en la parte superior de la superficie de cada aguja utilizando el protocolo de deposición automática del dispositivo.

3.3.6 Análisis estadístico

En primer lugar se definieron las siguientes variables:

-Inóculo: número de bacterias inoculadas.

-Recuento fémures irradiados agitación: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido por agitación de los fémures que contenían agujas irradiadas con radiaciones ultravioletas, fémures estudio.

-Recuento fémures no irradiados agitación: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido por agitación de los fémures que contenían agujas no irradiadas con radiaciones ultravioletas, fémures control.

-Recuento fémures irradiado sonicación: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido por sonicación de los fémures que contenían agujas irradiadas con radiaciones ultravioletas.

-Recuento fémures no irradiado sonicación: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido por sonicación de los fémures que contenían agujas no irradiadas con radiaciones ultravioletas, fémures control.

-Recuento agujas irradiadas agitación: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido por agitación de las agujas irradiadas con radiaciones ultravioletas.

-Recuento agujas no irradiadas agitación: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido por agitación de las agujas no irradiadas con radiaciones ultravioletas, agujas control.

-Recuento agujas irradiadas sonicación: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido por sonicación de las agujas irradiadas con radiaciones ultravioletas.

-Recuento agujas no irradiadas sonicación: recuento de unidades formadoras de

colonias obtenido por sonicación de las agujas no irradiadas con radiaciones ultravioletas, agujas control.

-Tiempo en días de eutanasia: tiempo en días en el que se realiza la eutanasia a las ratas.

-Total fémures irradiados: recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con radiación ultravioleta. Es decir la suma de los recuentos obtenidos por agitación y sonicación.

-Total fémures no irradiados: recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en fémures que contenían agujas no irradiadas con radiación ultravioleta. Es decir la suma de los recuentos obtenidos por agitación y sonicación.

-Total agujas irradiadas: recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en agujas irradiadas con radiación ultravioleta. Es decir la suma de los recuentos obtenidos por agitación y sonicación.

-Total agujas no irradiadas: recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en agujas no irradiadas con radiación ultravioleta. Es decir la suma de los recuentos obtenidos por agitación y sonicación, agujas control.

-Total fémures + agujas irradiadas: recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en agujas irradiadas con radiación ultravioleta y sus correspondientes fémures. Suma de las variables total fémures irradiados y total agujas irradiadas.

-Total fémures + agujas no irradiadas: recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en agujas no irradiadas con radiación ultravioleta y sus correspondientes fémures. Suma de las variables total fémures no irradiados y total agujas no irradiadas.

El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 para MAC (SPSS, Chicago, IL, USA). Todos los resultados fueron expresados con medidas de tendencia central, medianas y de dispersión varianza. Las diferencias en recuento de colonias recuperadas después de la inoculación entre los distintos grupos de estudio fueron valoradas utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon de los rangos con signos para muestras relacionadas.

Valores de probabilidad menores de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

3.4. Resultados

En primer lugar se realizaron las pruebas de normalidad de Kolmorov-Smirnov y Shapiro –Wilk sobre las distintas variables objeto de estudio, obteniéndose un resultado estadísticamente significativo. Es decir ninguna variable seguía una distribución normal por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis estadístico.

Dos de las ratas pertenecientes al protocolo de estudio (a) con tiempo previsto de eutanasia 48 h fallecieron en la inducción anestésica por lo que no fueron incluidas en el análisis estadístico.

3.4.1 Hidrofobicidad medida por el ángulo de contacto

Después de irradiar las agujas de Ti_6Al_4V con la radiación UV durante diferentes tiempos, desde 15 h hasta 72 h, se observó que un tiempo de irradiación de 48 h garantizaba la completa hidrofización de la superficie de dichas agujas. Con

este tiempo observamos que los ángulos de contacto de las gotas de agua depositadas sobre las agujas cambiaban desde $70^\circ \pm 3^\circ$ a $12^\circ \pm 2^\circ$ (Figura 3.7).

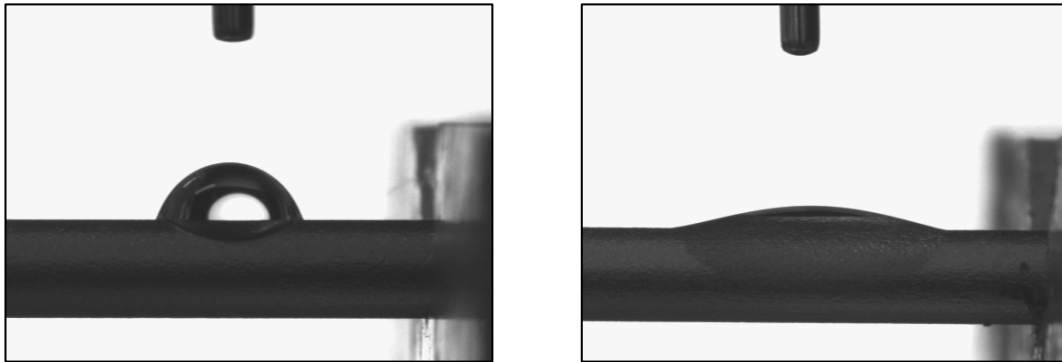


Figura 3.7: Ángulo de contacto del agua sobre la de superficie de una aguja de titanio Ti_6Al_4V antes (izquierda) y después (derecha) de la irradiación UV de la aguja durante 48 horas.

3.4.2 Experimento *in vivo* sobre la colonización bacteriana medida mediante recuento de UFC

Los experimentos *in vivo* de la colonización bacteriana de *S. aureus* sobre agujas de titanio y hueso se realizaron mediante dos protocolos de implantación con diferentes volúmenes de inóculos y tiempos de eutanasia.

3.4.2.1 Protocolo de implantación (a)

Implantación aleatoria de una aguja de titanio Ti_6Al_4V de 1.2 x 20 mm en cada pata, una aguja irradiada y otra sin irradiar. De este modo una pata actuaba como pata estudio, la que contenía la aguja irradiada y la otra pata como pata control, la que albergaba la aguja no irradiada.

3.4.2.1.1 Eutanasia a las 24 horas

3.4.2.1.1.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures a las 24 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que contenían agujas no irradiadas (controles) a las 24 horas post-inoculación (Figura 3.8).

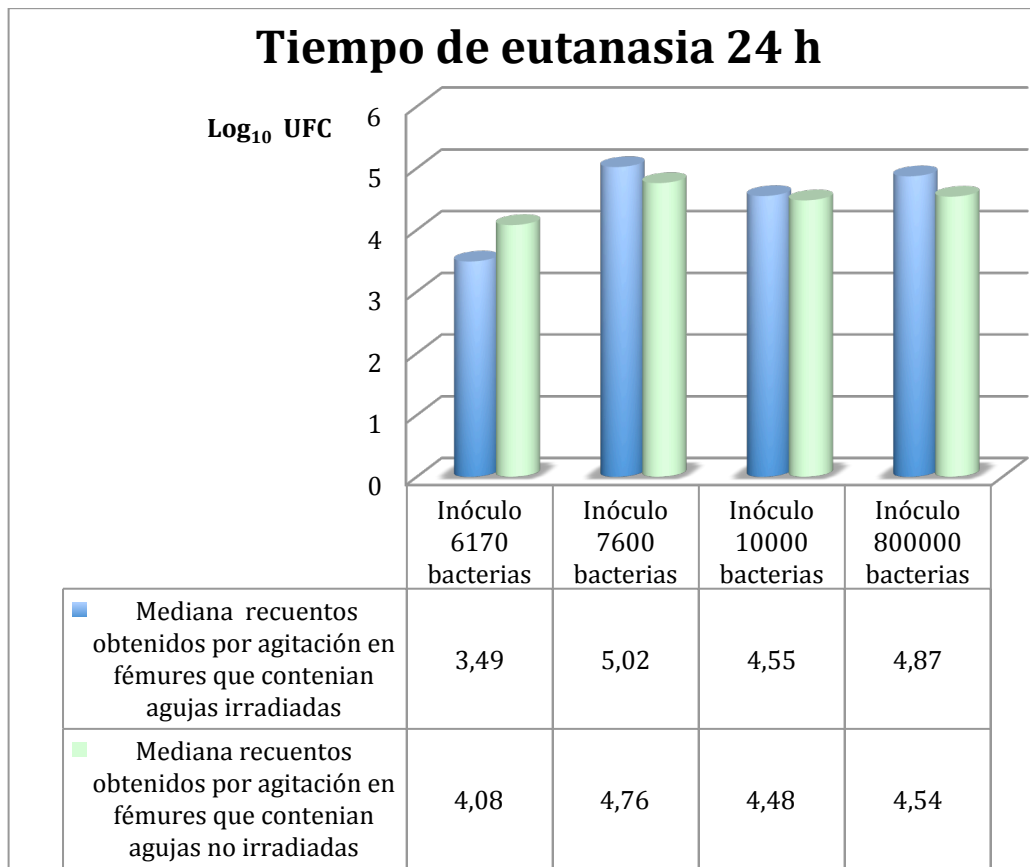


Figura 3.8: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con radiaciones UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo.

3.4.2.1.1.2 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures a las 24 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que contenían agujas no irradiadas (controles) a las 24 horas post-inoculación (Figura 3.9).

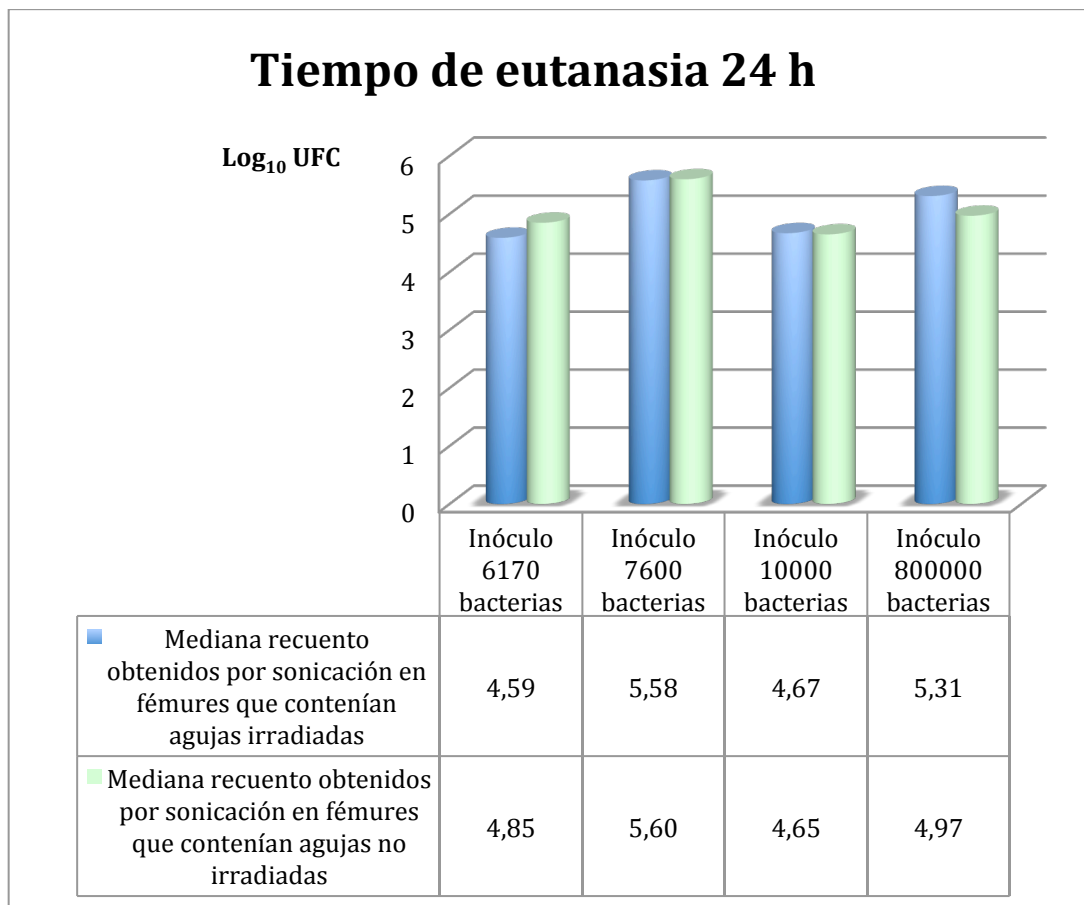


Figura 3.9: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con radiaciones UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo.

3.4.2.1.1.3 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio a las 24 h

La mediana expresada en Log_{10} de los recuentos de UFC obtenidos por agitación a las 24 horas post-inoculación (independientemente del inóculo) en agujas de titanio irradiadas con rayos UV fue de 4,26 y en agujas no irradiadas de 4,81. Esta diferencia, al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,026$). La reducción mediana obtenida en agujas irradiadas respecto a las no irradiadas fue del 71% (Figura 3.10 y 3.11).

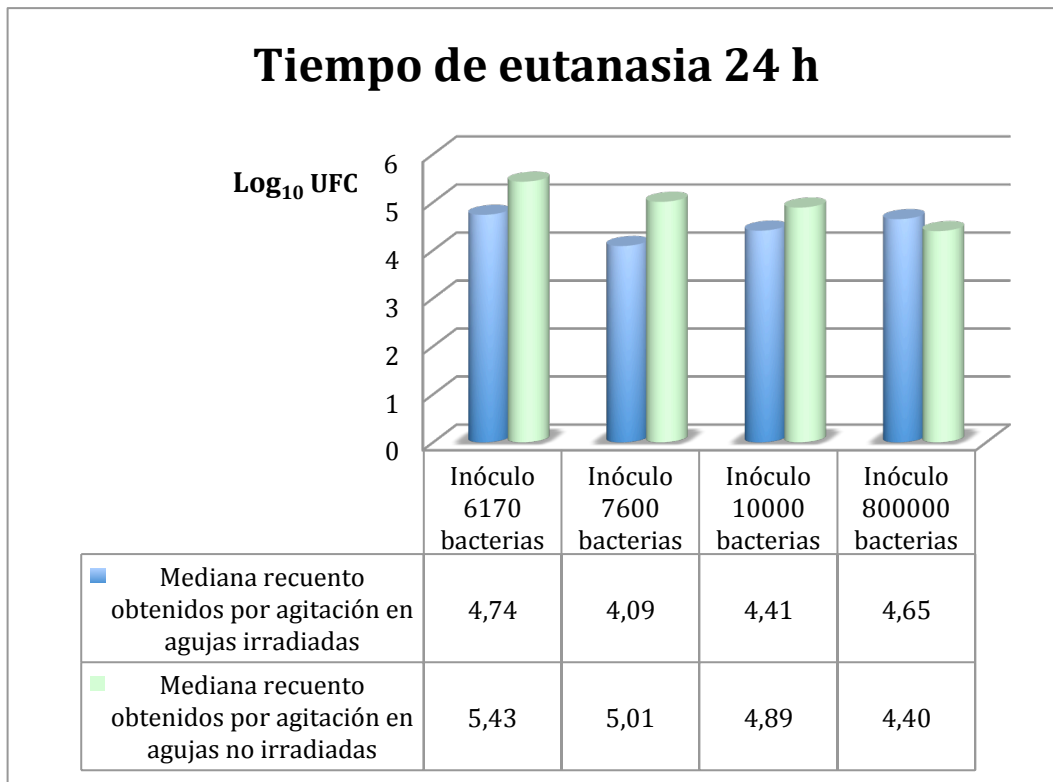


Figura 3.10: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con radiaciones UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo.

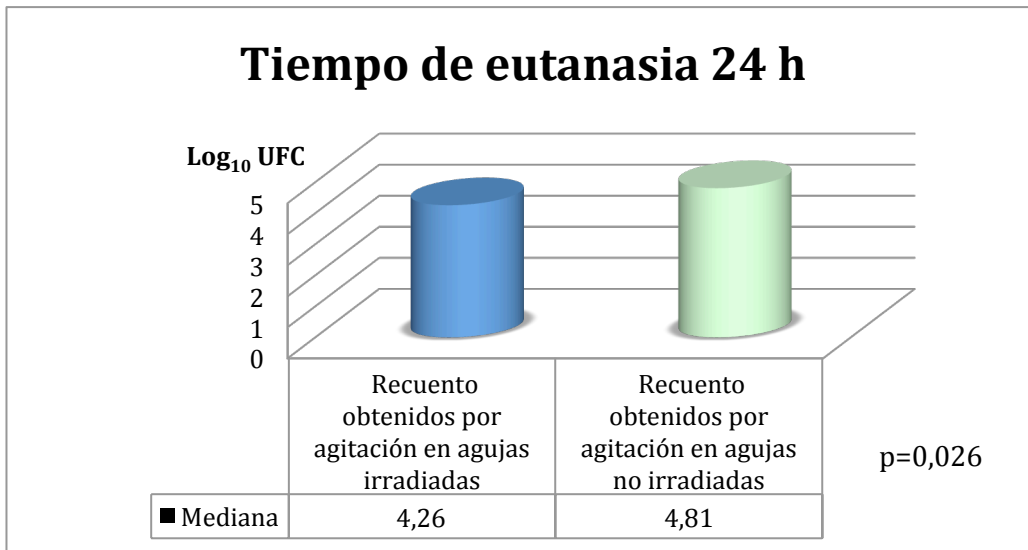


Figura 3.11: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (expresadas en Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con radiación UV y de agujas control no irradiadas, independientemente del inóculo, a las 24 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,026$)

3.4.2.1.1.4 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 24 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos obtenidos por sonicación en agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a agujas controles no irradiadas a las 24 horas post-inoculación (Figura 3.12).

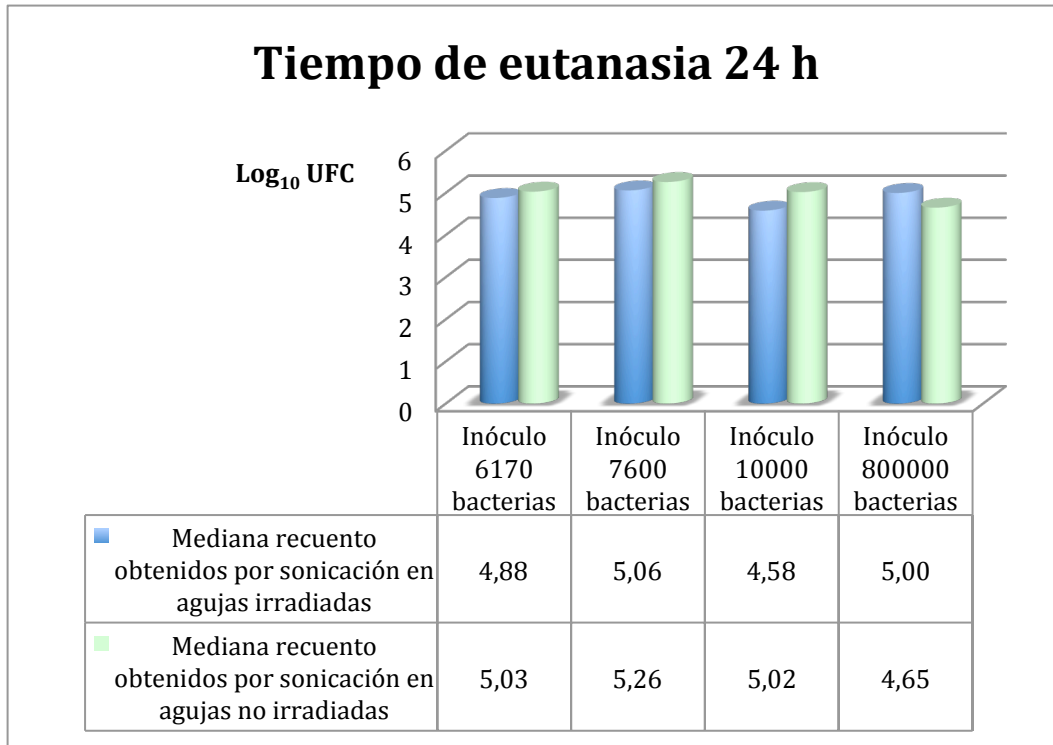


Figura 3.12: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con radiaciones UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo.

3.4.2.1.1.5 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures a las 24 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC totales (mediante las técnica de agitación + sonicación) obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a los fémures que contenían agujas no irradiadas (controles), a las 24 horas post-inoculación (Figura 3.13).

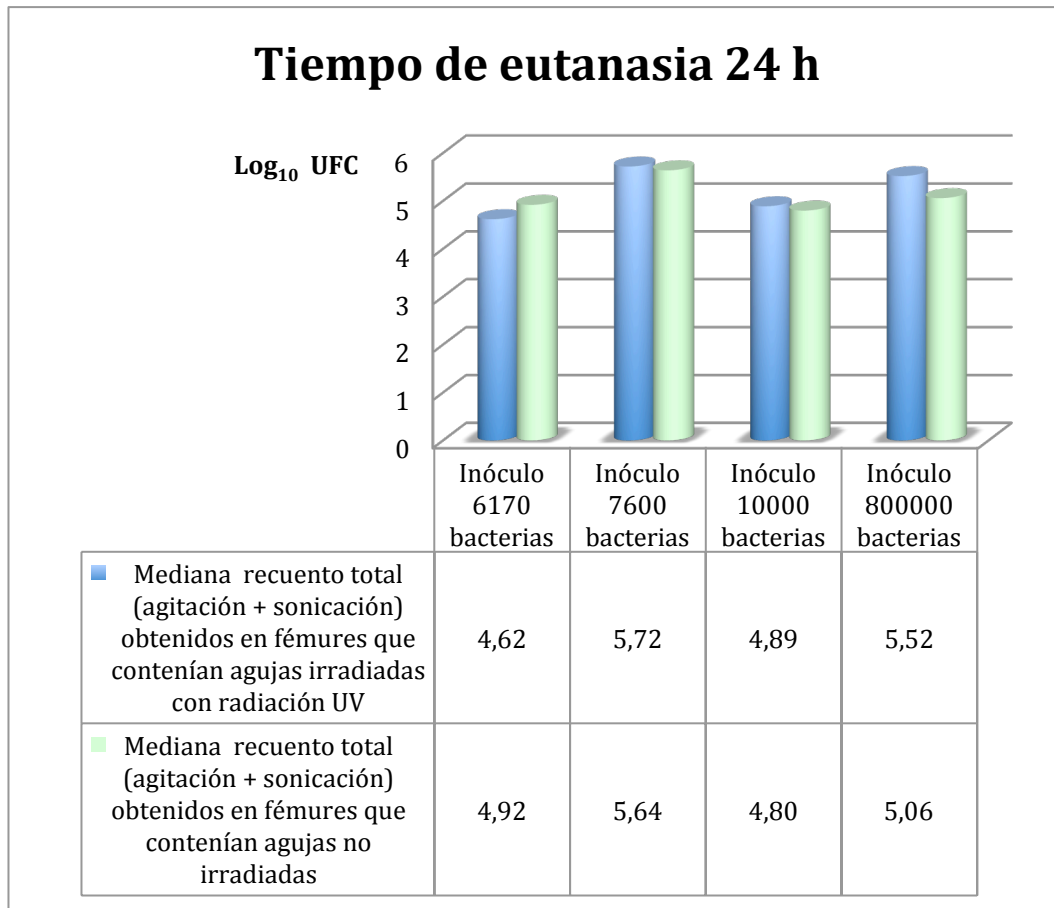


Figura 3.13: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo.

3.4.2.1.1.6 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio a las 24 h

Al analizar con la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas los recuentos de UFC totales (mediante las técnica de agitación + sonicación) obtenidos en las agujas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a agujas controles no irradiadas, a las 24 horas post-inoculación (Figura 3.14).

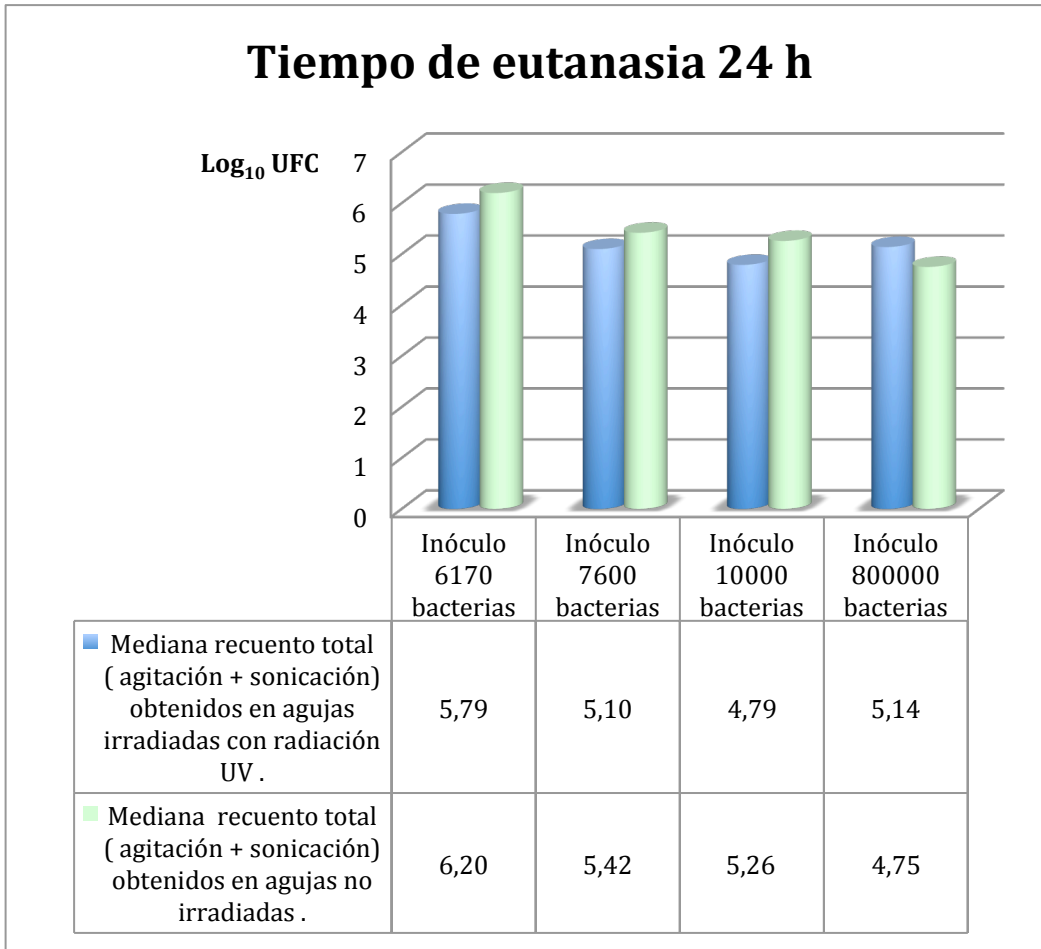


Figura 3.14: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos de agujas irradiadas con radiación UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 h del mismo.

Sin embargo, para inóculos menores o iguales a 10000 bacterias, la mediana expresada en Log_{10} de los recuentos totales de UFC obtenidos por agitación + sonicación a las 24 horas post-inoculación en agujas de titanio irradiadas con radiaciones UV fue de 4,97 y en agujas no irradiadas fue de 5,26 siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,017$). La reducción mediana obtenida en agujas irradiadas respecto a las no irradiadas fue del 49% (Figura 3.15).

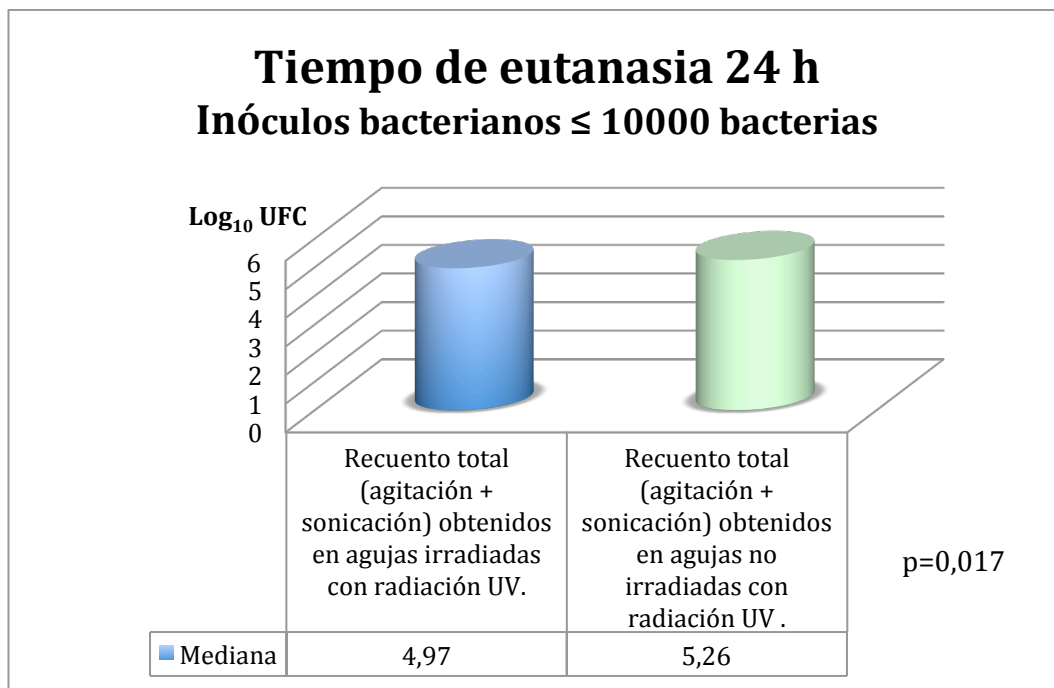


Figura 3.15: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos de agujas irradiadas con radiación UV y de agujas control no irradiadas, para inóculos ≤ 10000 bacterias, a las 24 h del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,017$).

3.4.2.1.1.7 Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas + fémures a las 24 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos en fémures + agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a los fémures + agujas control no irradiadas, a las 24 horas post-inoculación (Figura 3.16).

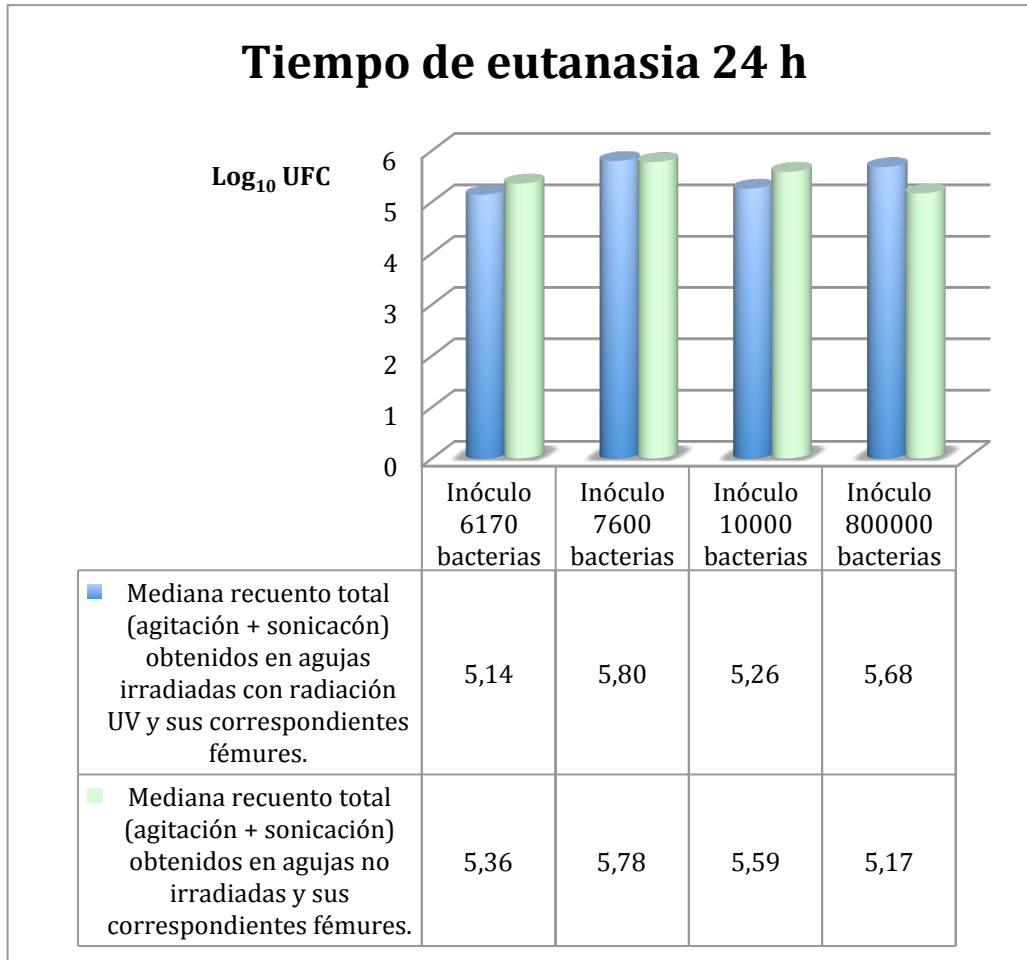


Figura 3.16: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos de fémures + agujas irradiadas con rayos UV y de fémures + agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 24 h del mismo.

3.4.2.1.2 Eutanasia a las 48 horas

3.4.2.1.2.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures a las 48 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que contenían agujas no irradiadas o controles a las 48 horas post-inoculación (Figura 3.17).

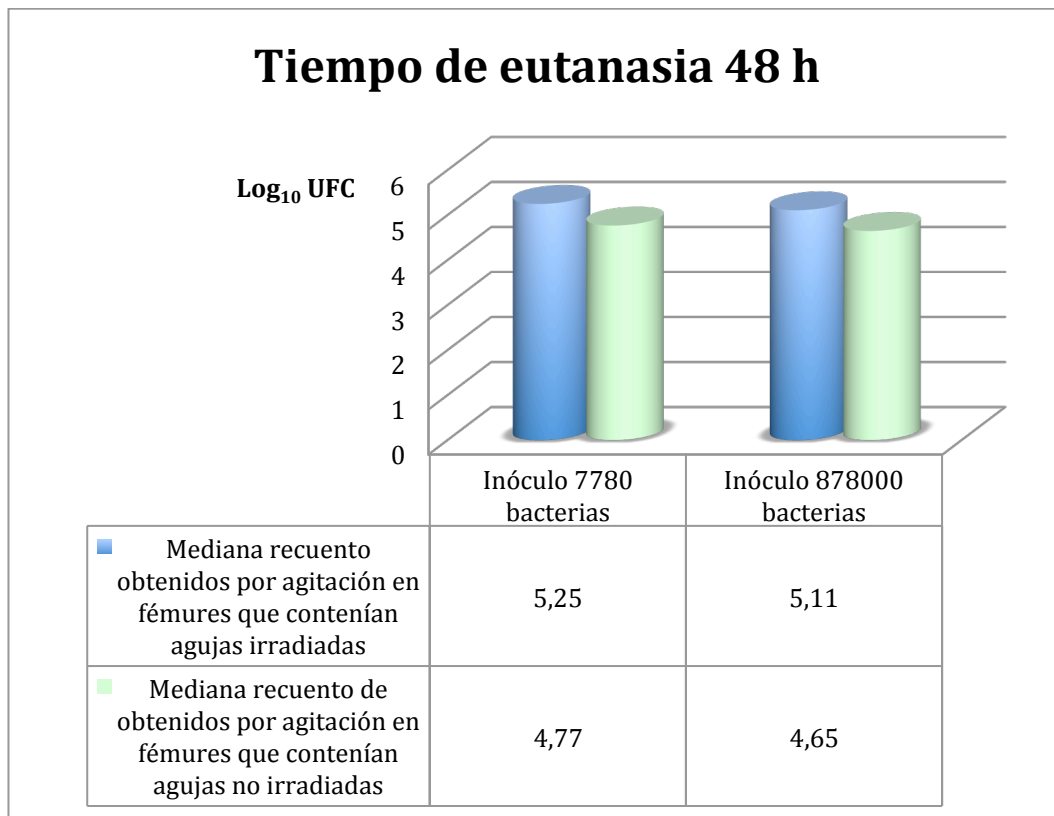


Figura 3.17: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo.

3.4.2.1.2.2 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures a las 48 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que contenían agujas no irradiadas (controles) a las 48 horas post-inoculación (Figura 3.18).

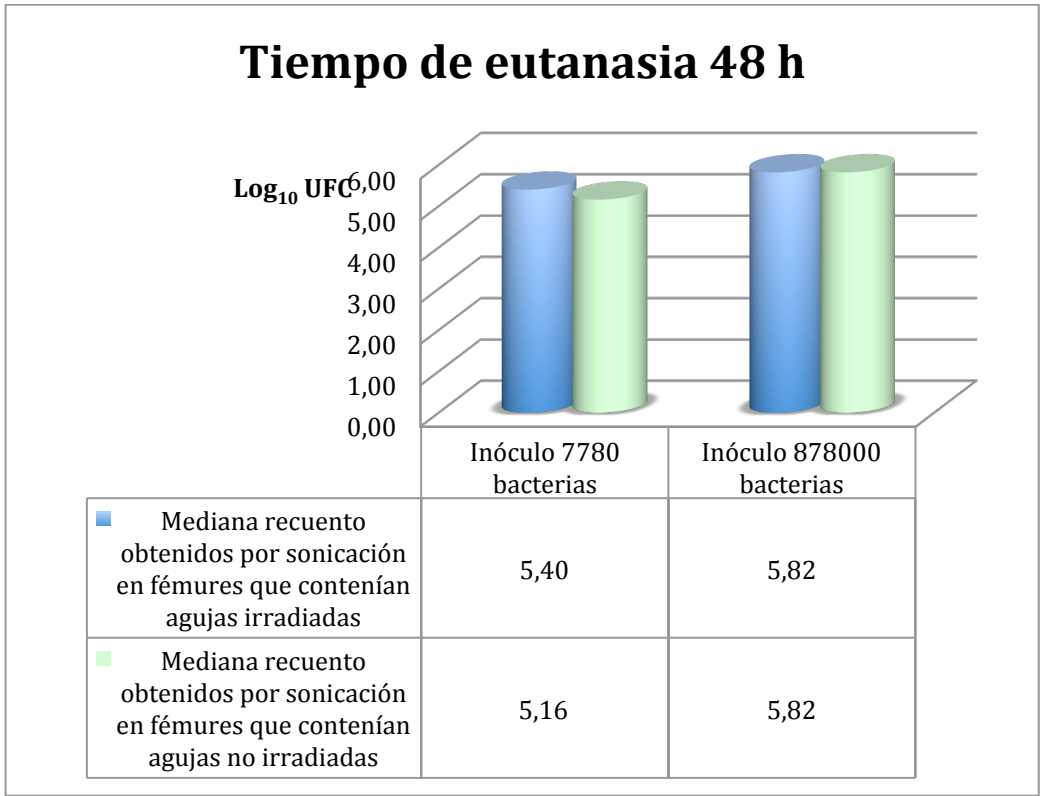


Figura 3.18: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo.

3.4.2.1.2.3 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio a las 48 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas irradiadas con rayos UV respecto a agujas no irradiadas (controles) a las 48 horas post-inoculación (Figura 3.19).

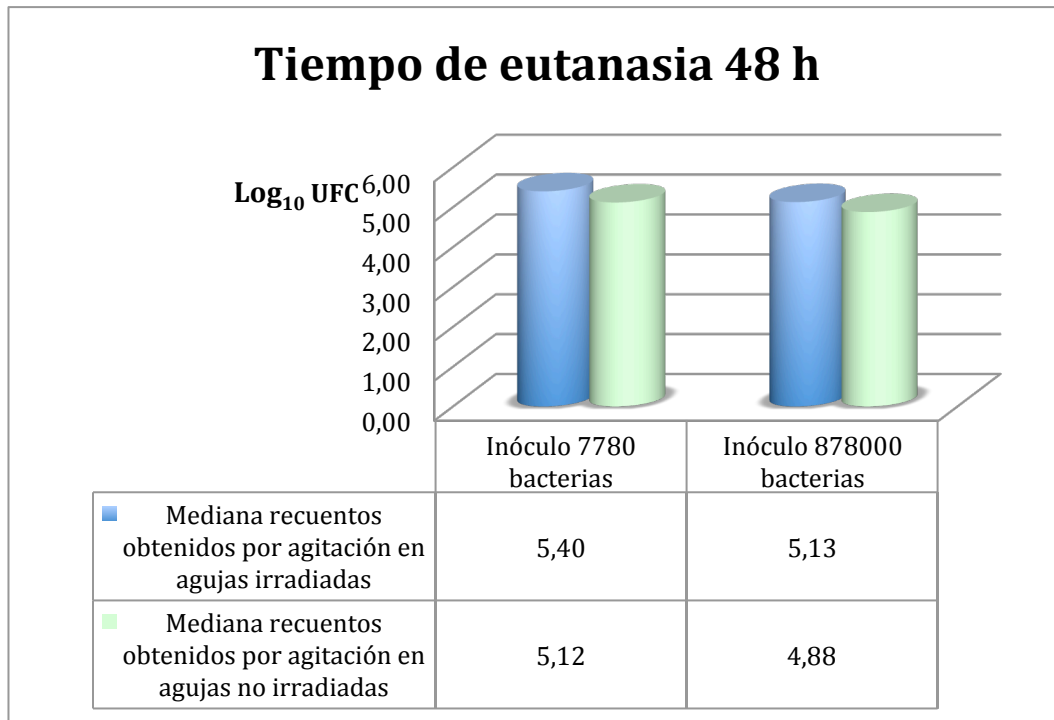


Figura 3.19: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo.

3.4.2.1.2.4 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 48 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a agujas controles no irradiadas a las 48 horas post-inoculación (Figura 3.20).

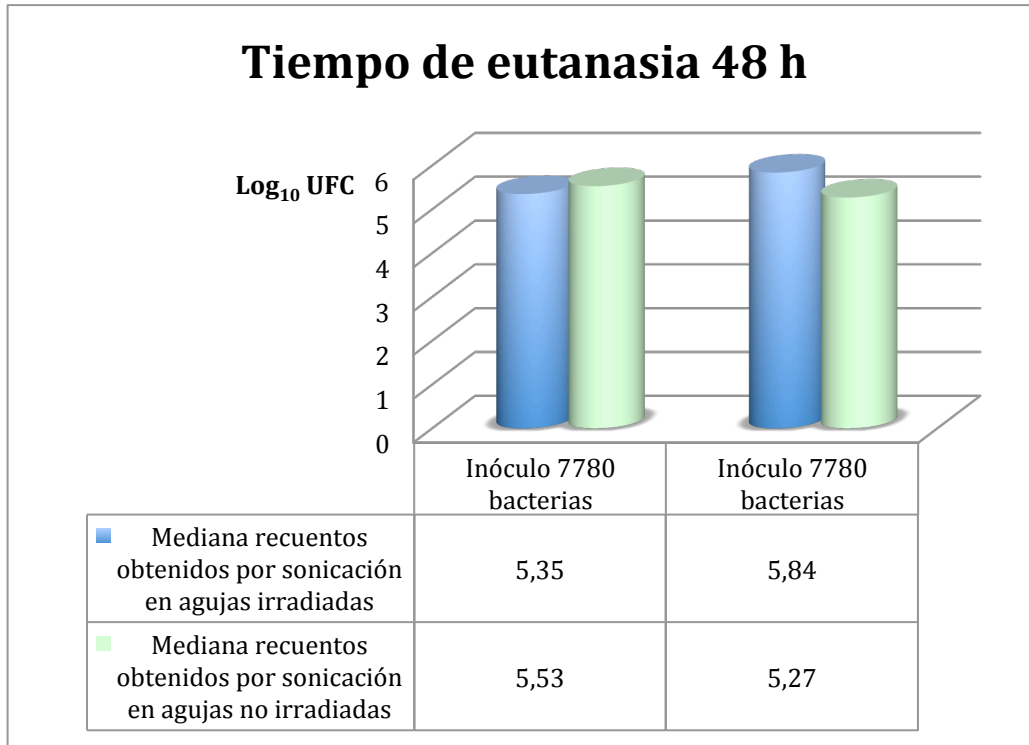


Figura 3.20: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo.

3.4.2.1.2.5 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures a las 48 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC totales (agitación + sonicación) obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a los fémures que contenían agujas no irradiadas (controles) a las 48 horas post-inoculación (Figura 3.21).

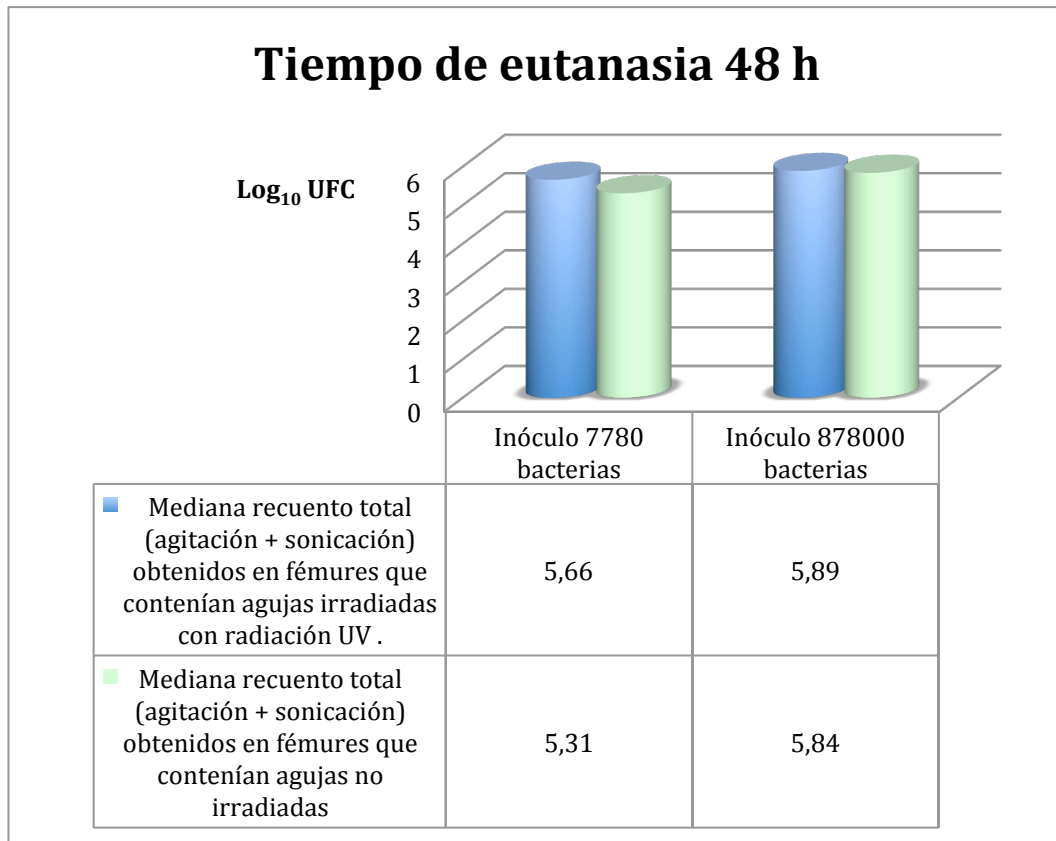


Figura 3.21: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo.

3.4.2.1.2.6 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio a las 48 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos totales (agitación + sonicación) obtenidos en agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a agujas no irradiadas (controles) a las 48 horas post-inoculación (Figura 3.22).

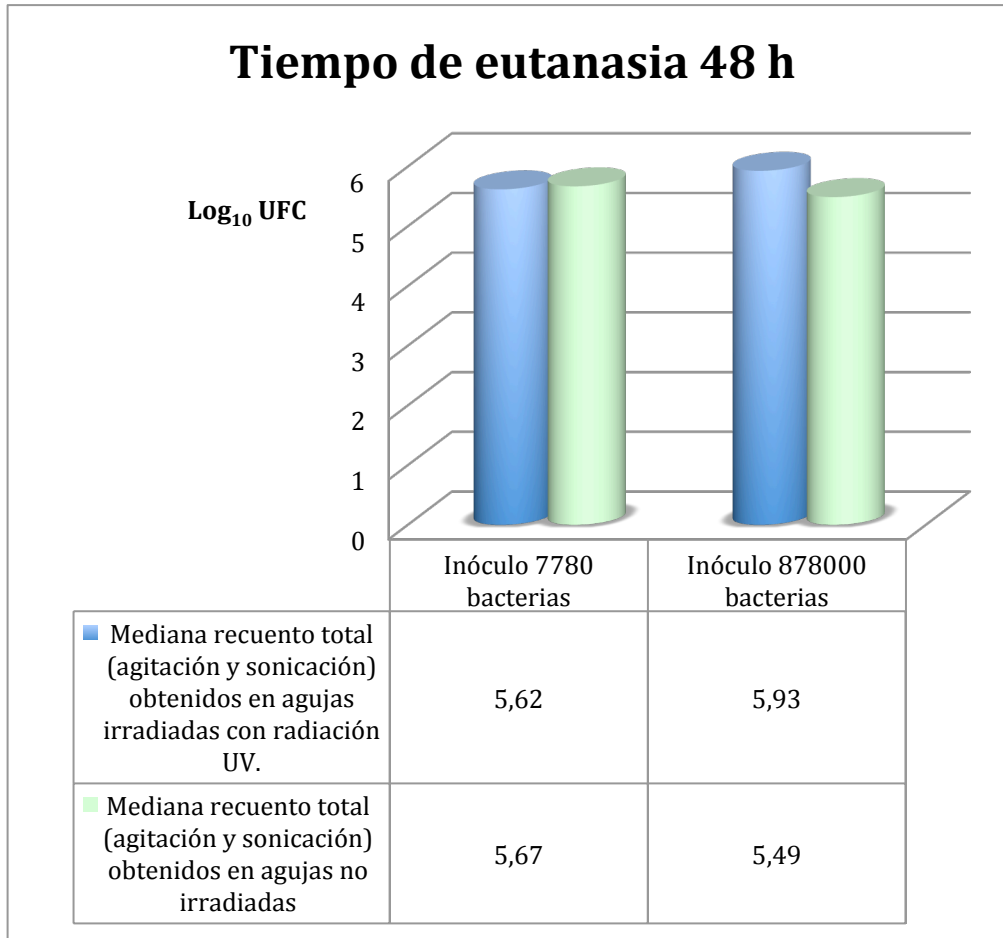


Figura 3.22: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo.

3.4.2.1.2.7 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas + fémures a las 48 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC totales obtenidos en fémures + agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a los fémures + agujas control no irradiadas, a las 48 horas post-inoculación (Figura 3.23).

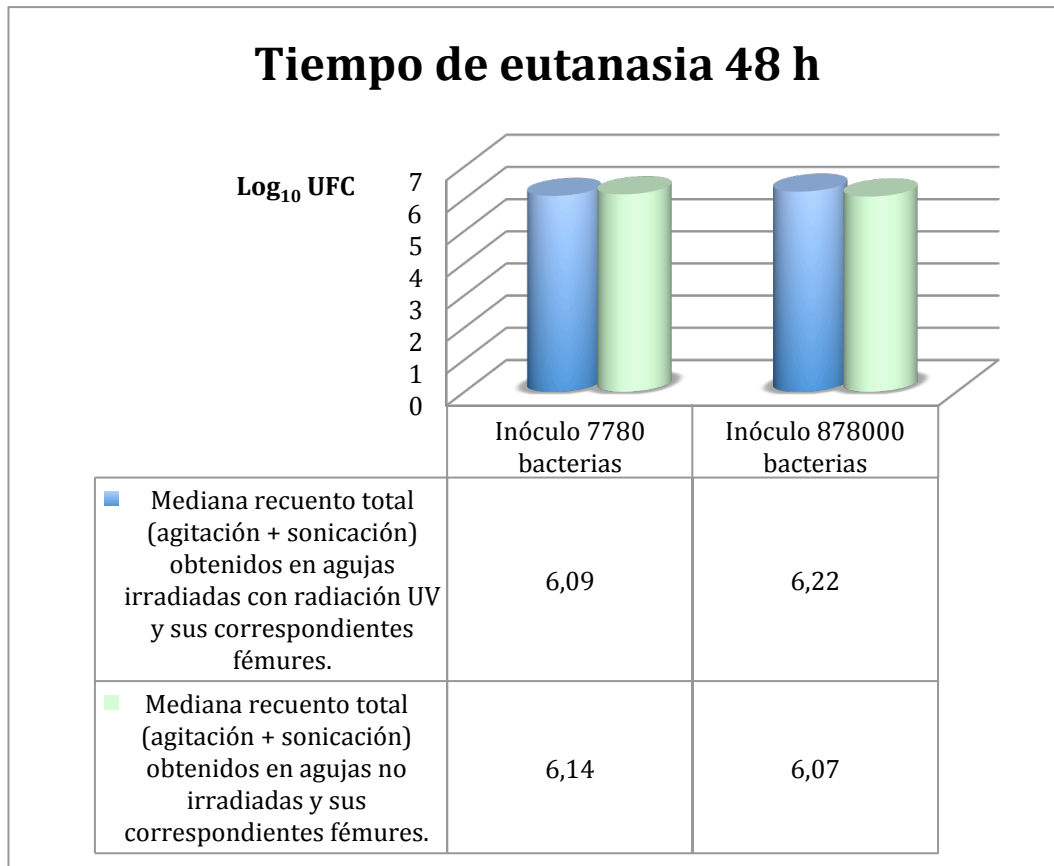


Figura 3.23: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas irradiadas con rayos UV y de fémur + agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 48 h del mismo.

3.4.2.1.3 Eutanasia a las 72 horas

3.4.2.1.3.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures a las 72 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que contenían agujas no irradiadas controles, a las 72 horas post-inoculación (Figura 3.24).

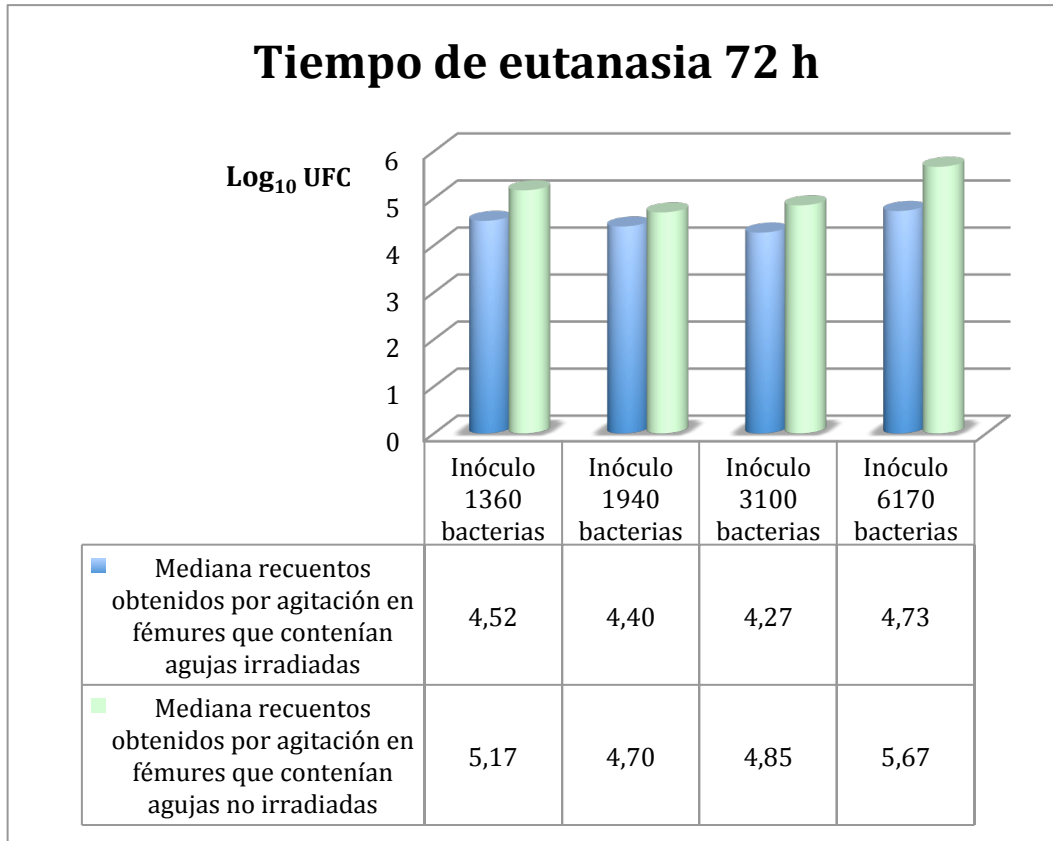


Figura 3.24: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo.

3.4.2.1.3.2 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures a las 72 h

La mediana expresada en Log_{10} de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación a las 72 horas post-inoculación en fémures que contenían agujas de titanio irradiadas con rayos UV fue de 4,92 y en fémures que albergaban agujas no irradiadas fue de 5,79. Esta diferencia, al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,02$). La reducción mediana obtenida en fémures que contenían agujas irradiadas respecto a las no irradiadas fue del 86%. (Figura 3.25 y Figura 3.26).

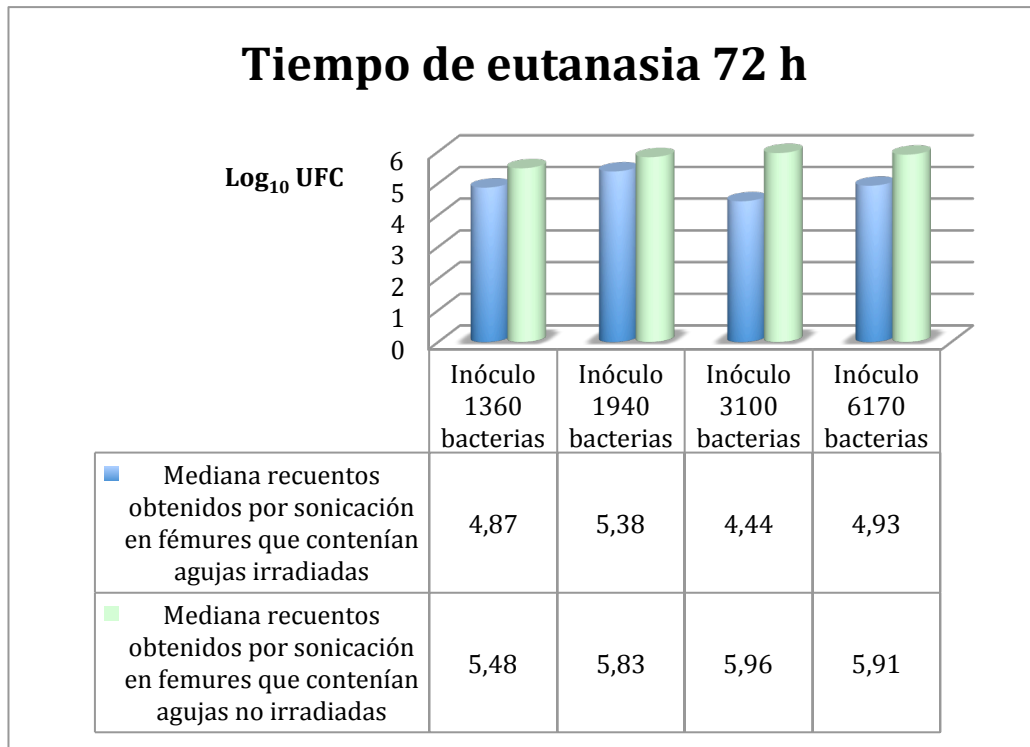


Figura 3.25: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures con agujas no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo.

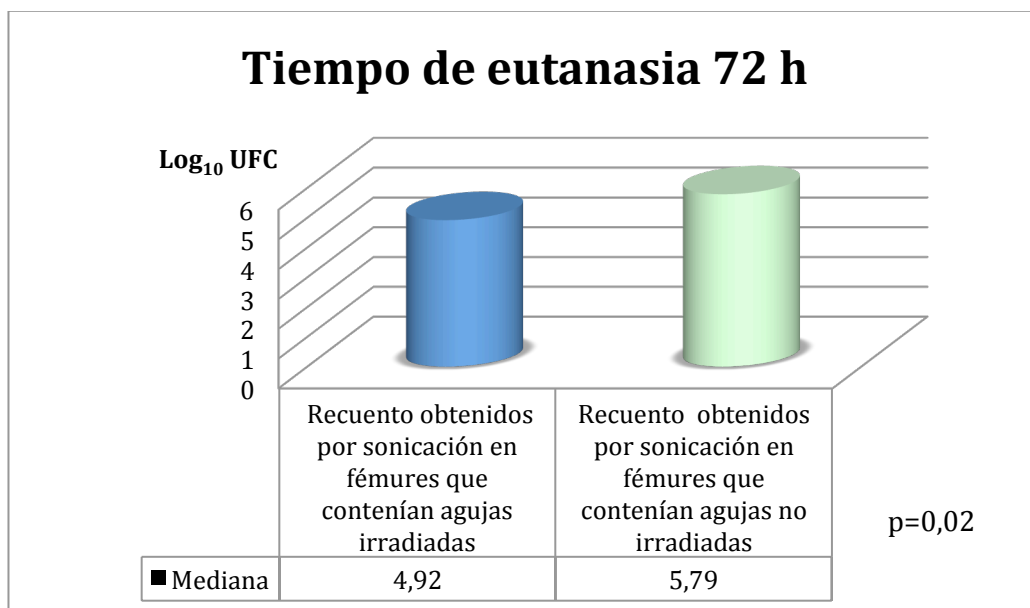


Figura 3.26: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación entre los fémures que contenían agujas irradiadas y de fémures control (contenían agujas no irradiadas), independiente del tamaño del inóculo, a las 72 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02$).

3.4.2.1.3.3 *Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio a las 72 h*

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas irradiadas con rayos UV respecto a agujas no irradiadas (controles) a las 72 horas post-inoculación (Figura 3.27).

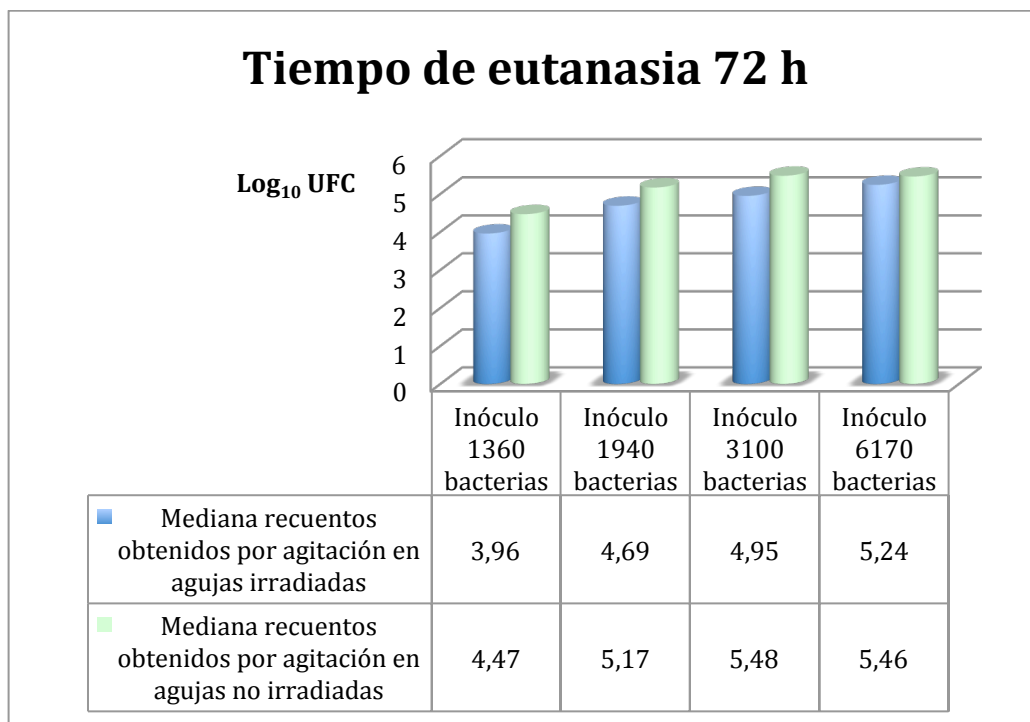


Figura 3.27: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo.

3.4.2.1.3.4 *Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 72 h*

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos por

sonicación en agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a agujas no irradiadas (controles) a las 72 horas post-inoculación (Figura 3.28).

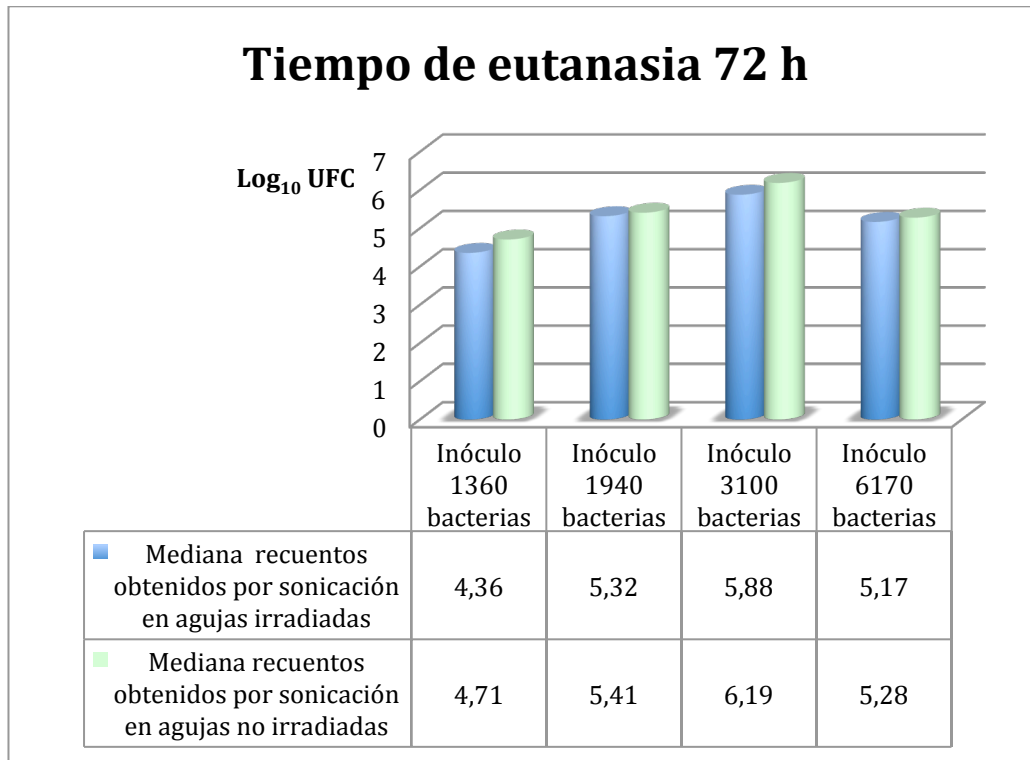


Figura 3.28: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo.

3.4.2.1.3.5 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures a las 72 h

La mediana expresada en Log_{10} de los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos a las 72 horas post-inoculación en fémures que contenían agujas de titanio irradiadas con rayos UV fue de 5.11 y en fémures que albergaban agujas no irradiadas de 6. Esta diferencia, al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,041$). La reducción mediana obtenida en fémures que contenían agujas irradiadas respecto a las no irradiadas fue del 87% (Figura 3.29 y Figura 3.30).

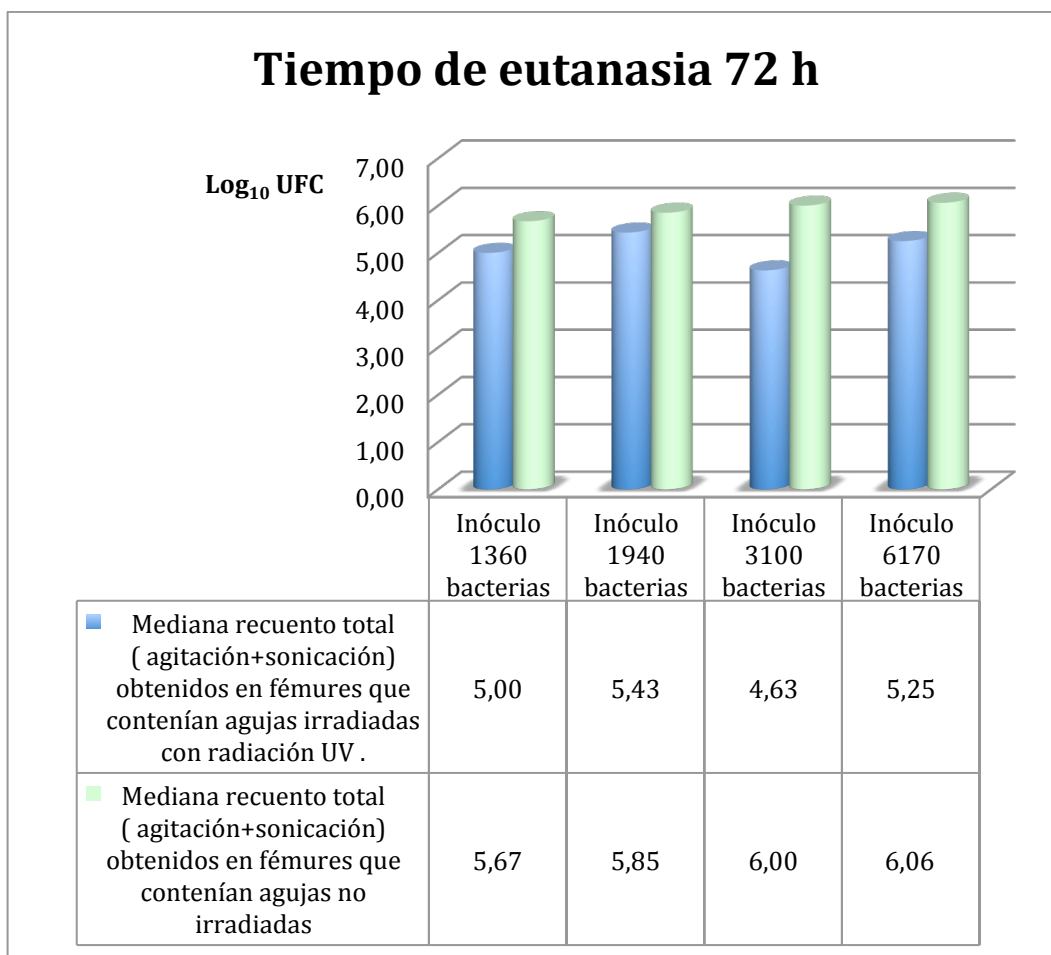


Figura 3.29: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo.

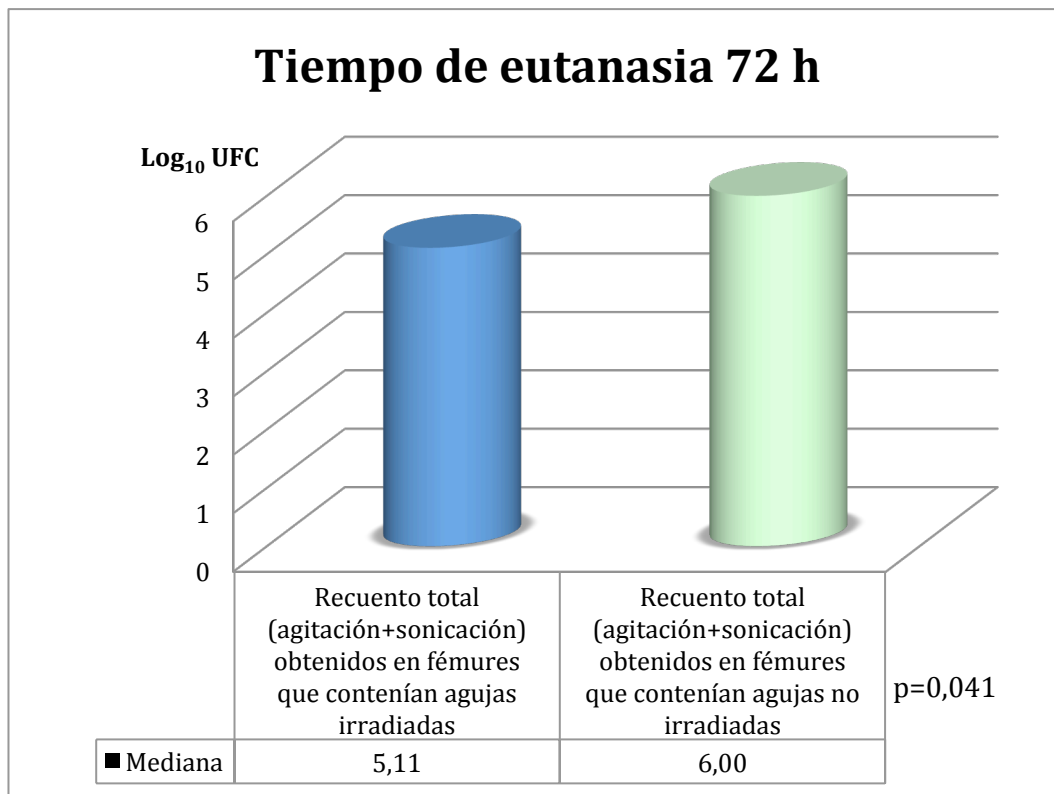


Figura 3.30: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos entre los fémures que contenían agujas irradiadas y de fémures control (contenían agujas no irradiadas), independiente del tamaño del inóculo, a las 72 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativa ($p=0,041$).

3.4.2.1.3.6 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio a las 72 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos totales de UFC (agitación + sonicación) obtenidos en agujas irradiadas con rayos UV respecto a agujas no irradiadas (controles) a las 72 horas post-inoculación (Figura 3.31).

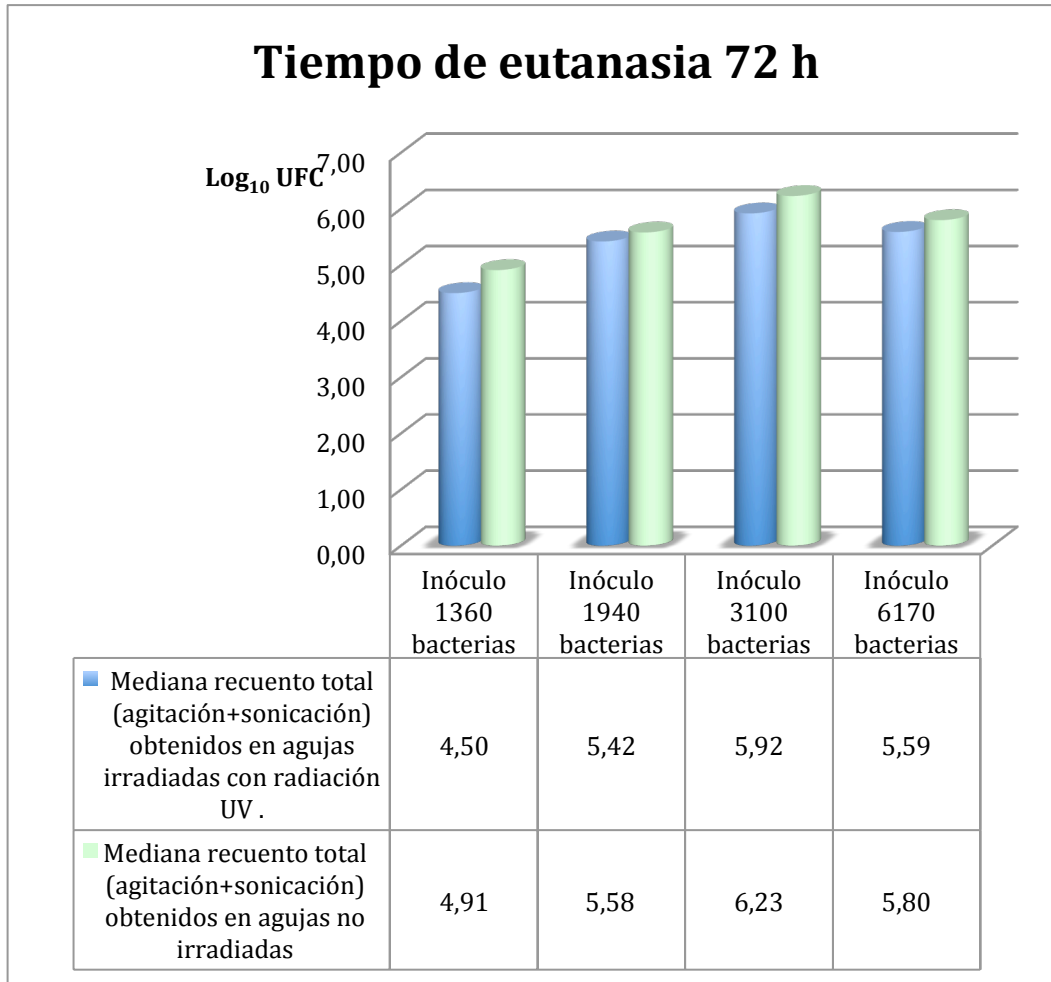


Figura 3.31: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo.

3.4.2.1.3.7 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas + fémures a las 72 h

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC totales (agitación + sonicación) obtenidos en fémures + agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures + agujas control no irradiadas, a las 72 horas post-inoculación (Figura 3.32).

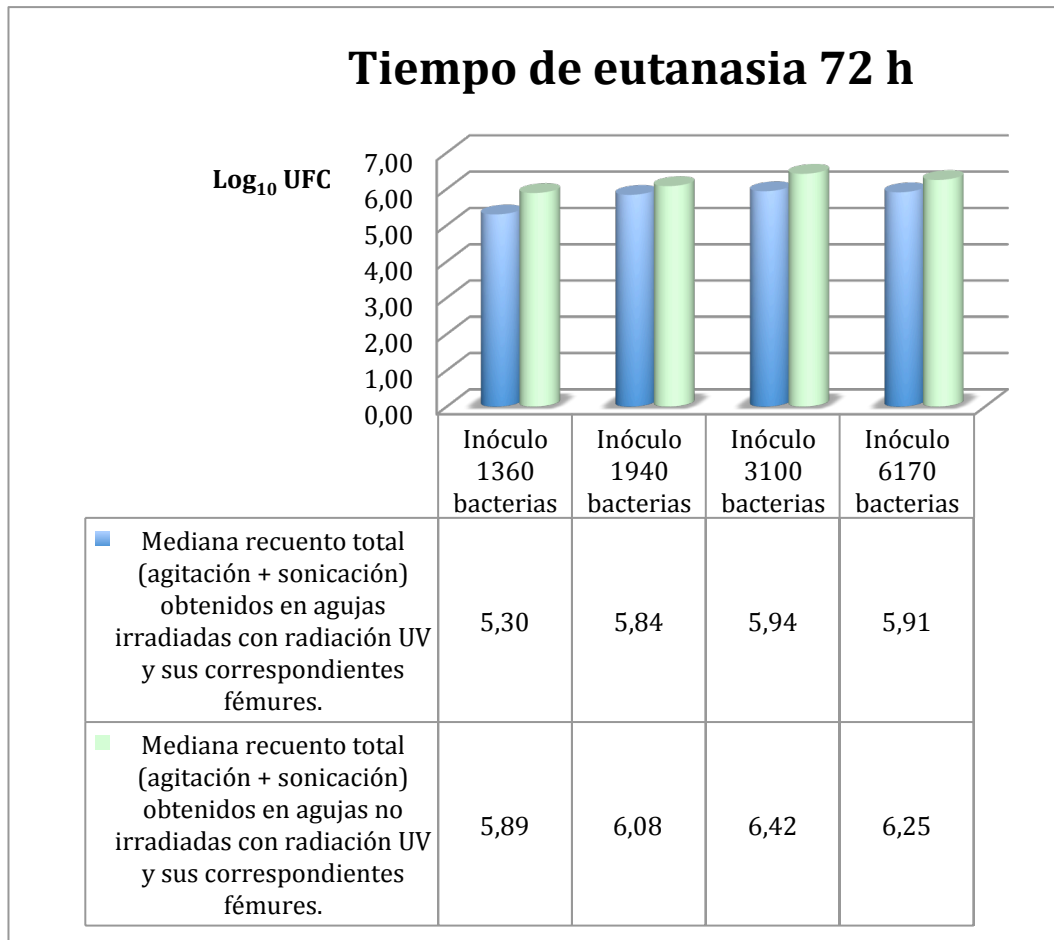


Figura 3.32: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémures + agujas irradiadas con rayos UV y de fémur + agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, a las 72 h del mismo.

3.4.2.1.4 Análisis global (con independencia del tiempo de eutanasia)

3.4.2.1.4.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en fémures en global

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos globales de UFC obtenidos por agitación en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV respecto a los fémures que contenían agujas control no irradiadas con independencia del tiempo de eutanasia (Figura 3.33).

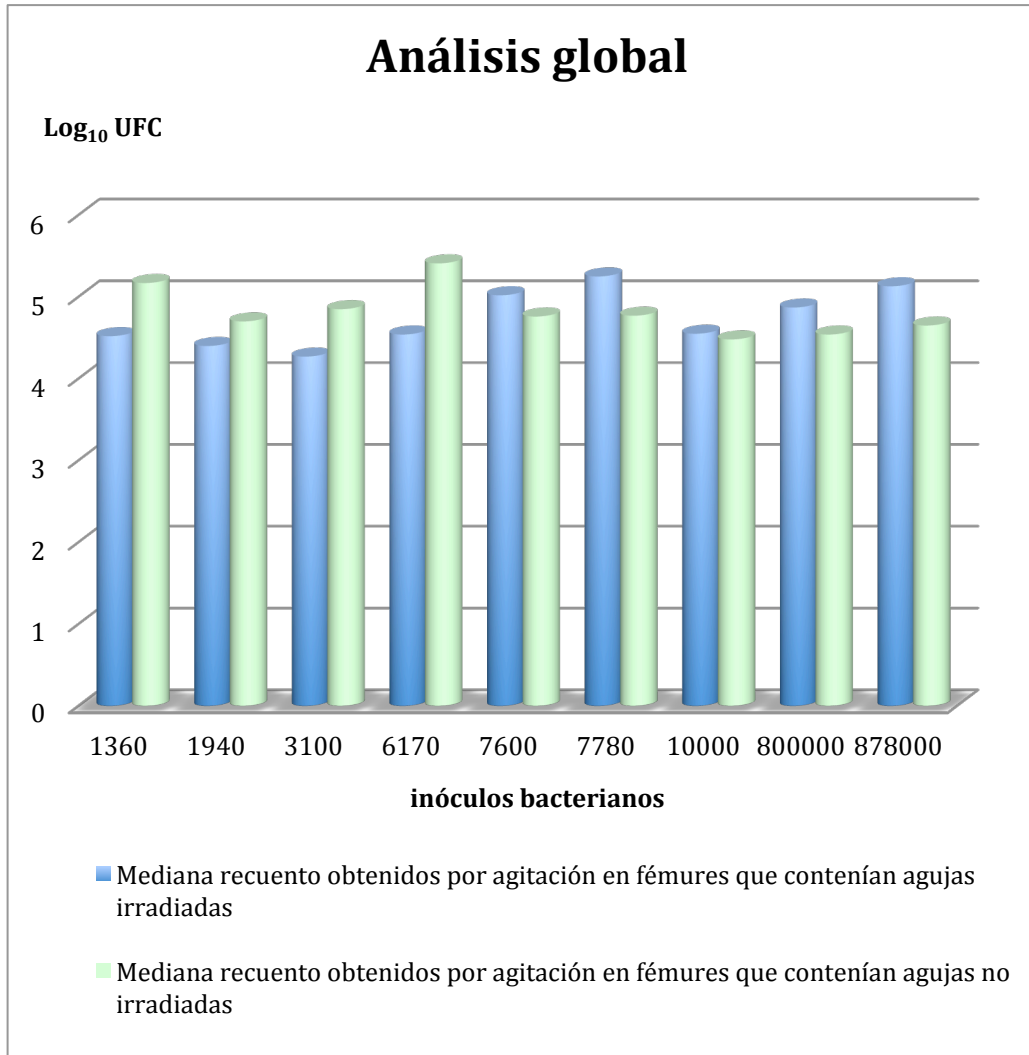


Figura 3.33: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia.

3.4.2.1.4.2 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en fémures en global

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos globales de UFC obtenidos por sonicación en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos

ultravioleta respecto a los fémures que contenían agujas control no irradiadas con independencia del tiempo de eutanasia (Figura 3.34).

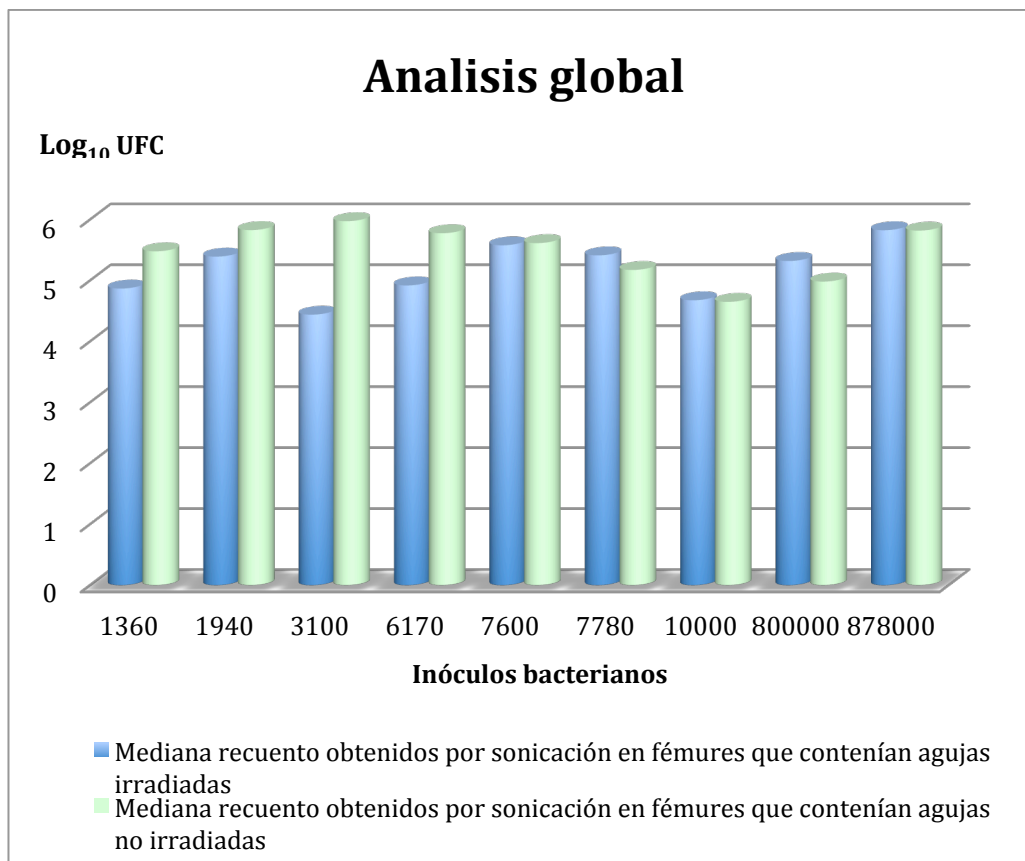


Figura 3.34: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de fémures que contenían agujas irradiadas con rayos UV y de fémures control, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia.

3.4.2.1.4.3 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio en global

Con independencia del tiempo de eutanasia, para inóculos menores o iguales a 7600 bacterias la mediana expresada en Log_{10} de los recuentos de UFC obtenidos por agitación en agujas de titanio irradiadas con rayos UV fue de 4,72 y en agujas no

irradiadas de 5,18. Esta diferencia, al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, no resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,053$). La reducción mediana obtenida en agujas irradiadas respecto a las no irradiadas fue del 65% (Figura 3.35 y Figura 3.36).

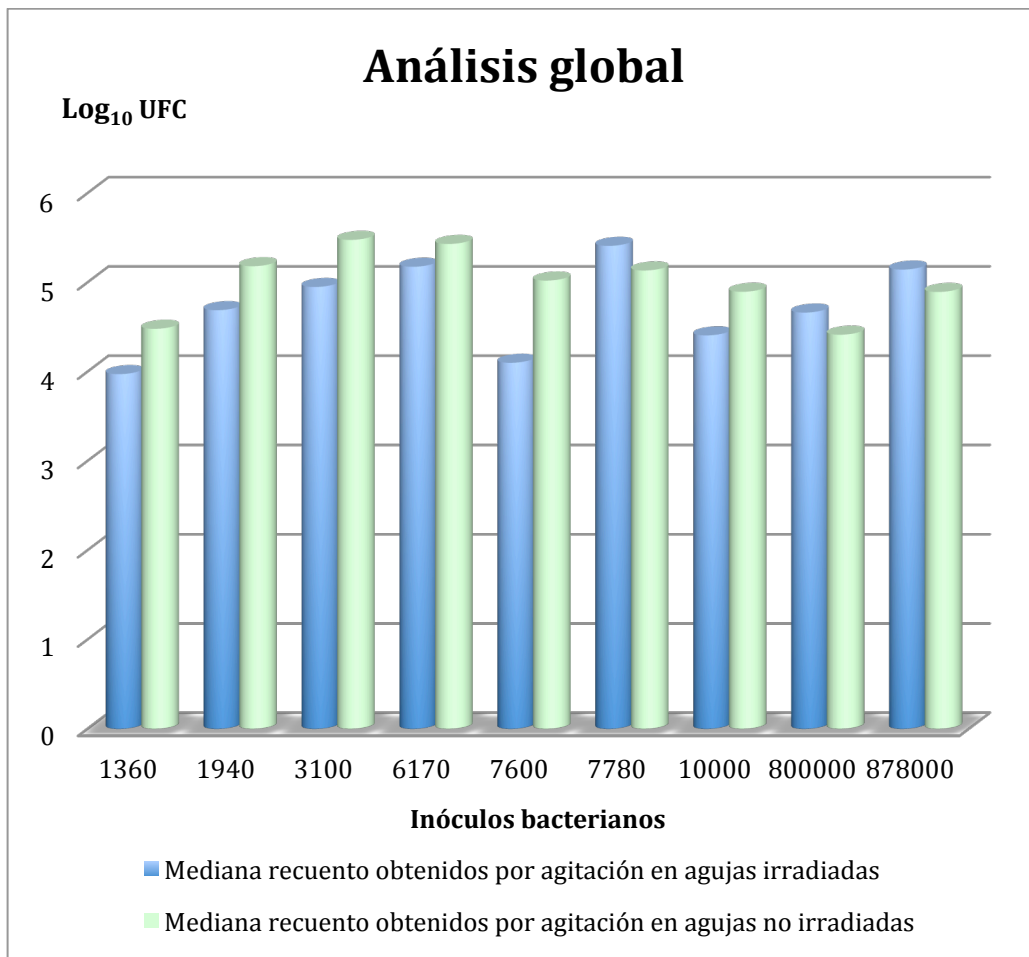


Figura 3.35: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia.

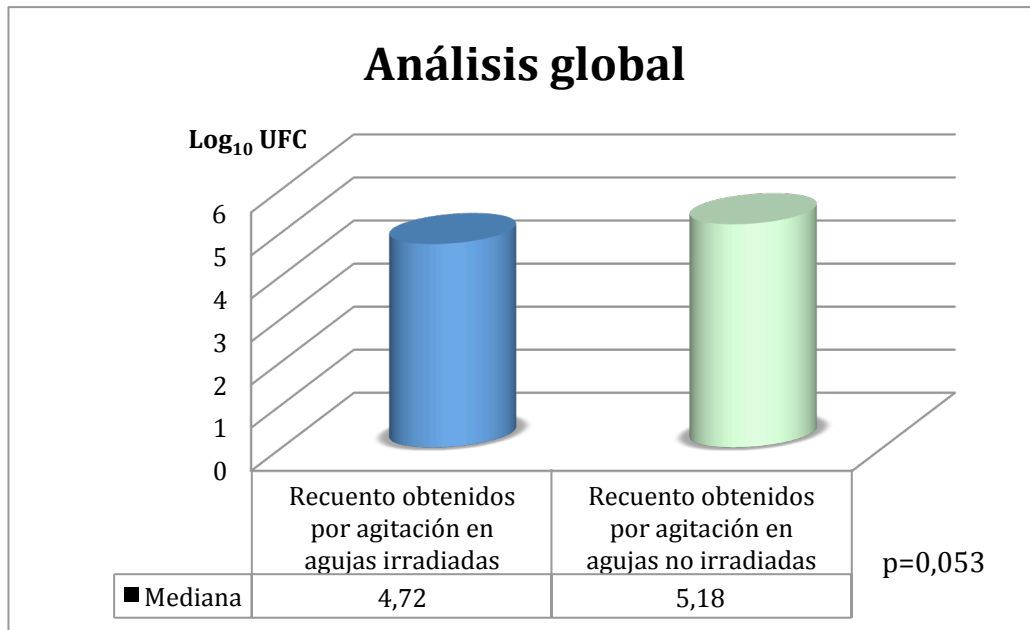


Figura 3.36: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por agitación de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, independiente del tiempo de eutanasia y para inóculos menores o iguales de 7600 bacterias, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,053$).

3.4.2.1.4.4 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio en global

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC globales obtenidos por sonicación en agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a las agujas control no irradiadas con independencia del tiempo de eutanasia (Figura 3.37).

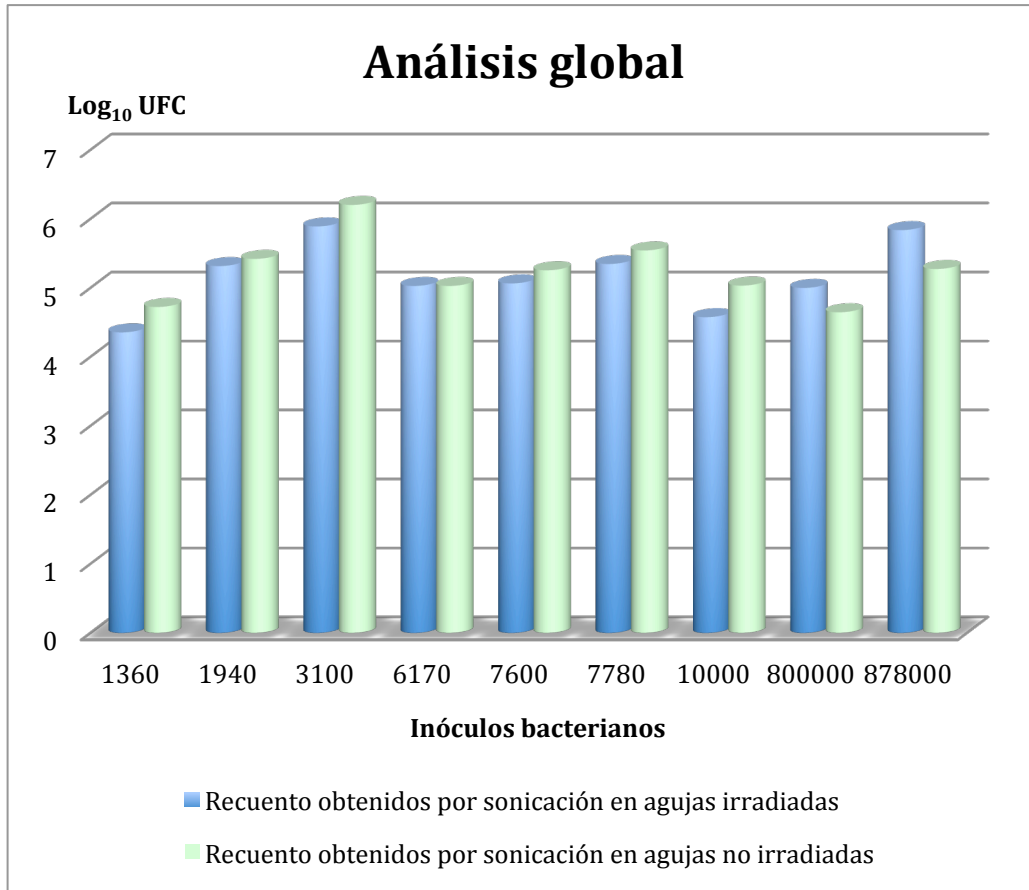


Figura 3.37; Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de agujas irradiadas con UV y de agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia.

3.4.2.1.4.5 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures en global

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC globales en total (obtenidos por agitación + sonicación) en fémures que contenían agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a los fémures que contenían agujas control no irradiadas, con independencia del tiempo de eutanasia (Figura 3.38).

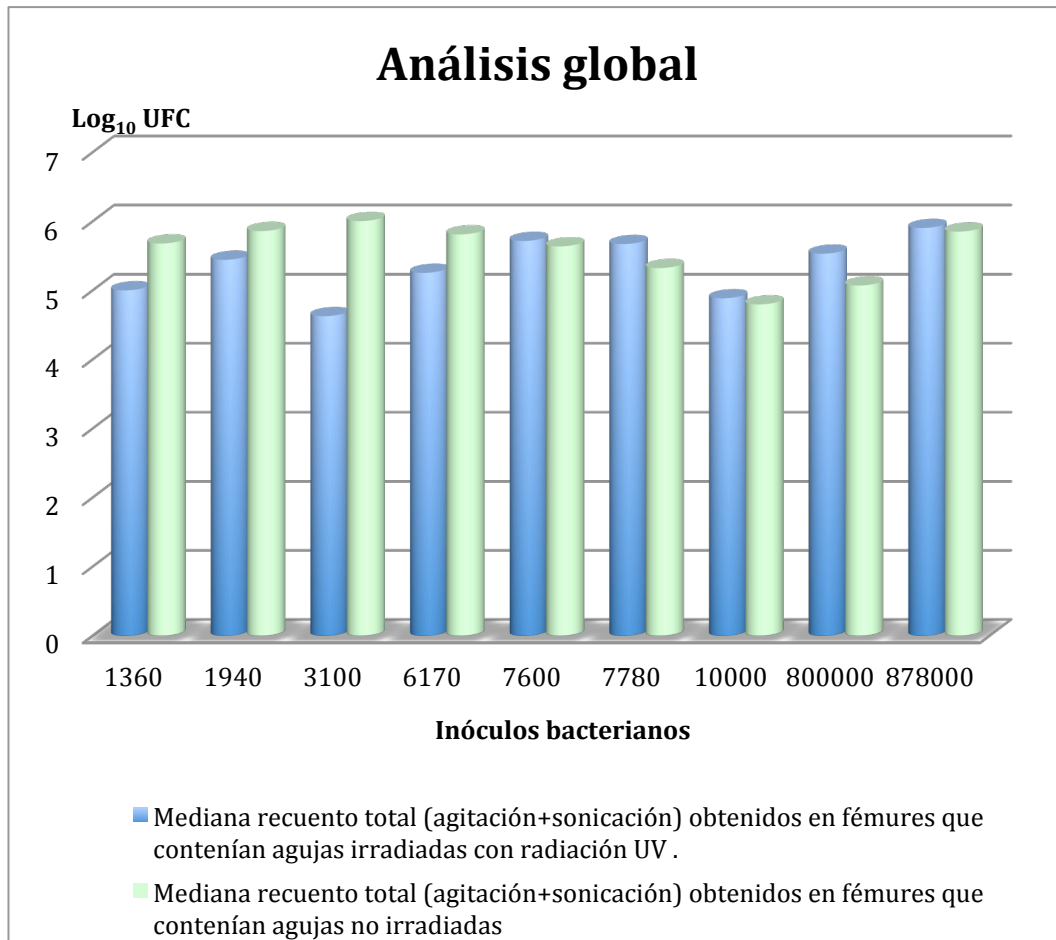


Figura 3.38: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures que contenían agujas irradiadas con UV respecto a los fémures que albergaban agujas control no irradiadas, en función del tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia.

3.4.2.1.4.6 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas de titanio en global

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos globales de UFC totales (obtenidos por agitación + sonicación) en agujas irradiadas con rayos ultravioleta respecto a las agujas control no irradiadas, con independencia del tiempo de eutanasia (Figura 3.39).

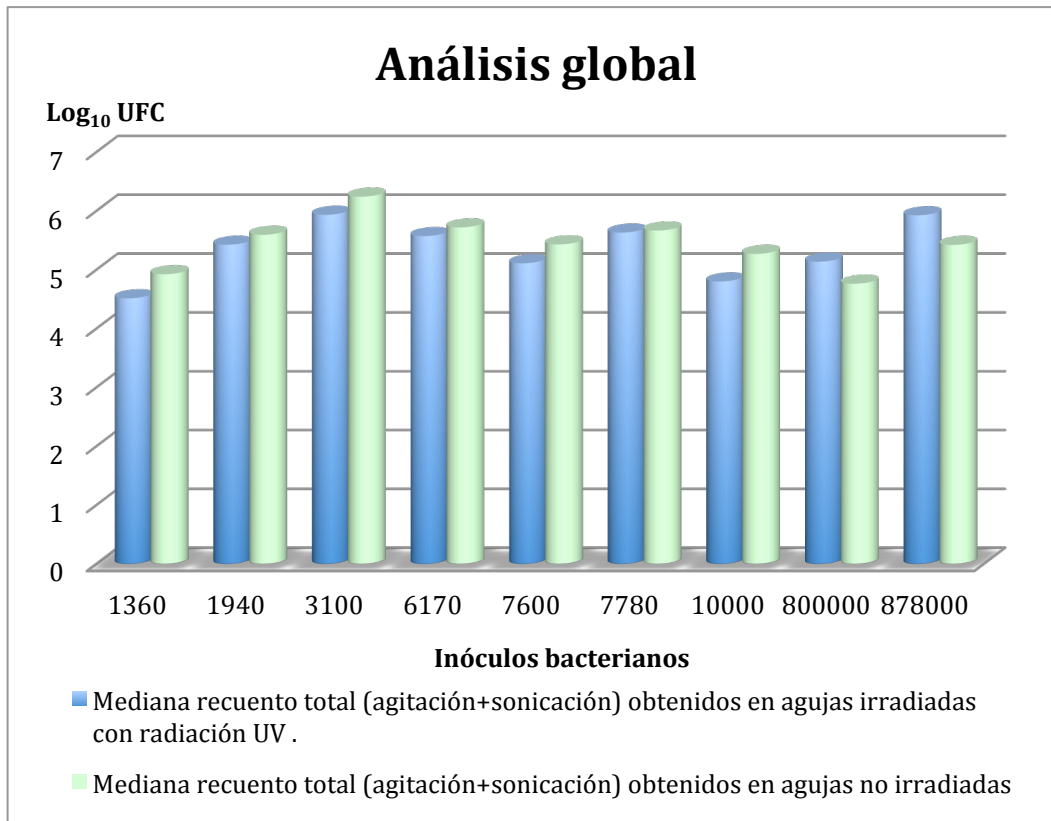


Figura 3.39: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de agujas irradiadas con rayos UV y de agujas control no irradiadas, en función de tamaño del inóculo, independiente del tiempo de eutanasia.

3.4.2.1.4.7 Análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas + fémures en global

Con independencia del tiempo de eutanasia, para inóculos menores o iguales a 10000 bacterias la mediana expresada en Log_{10} de los recuentos totales (obtenidos por agitación + sonicación) de UFC en fémures + agujas de titanio irradiadas con rayos UV fue de 5,80 y en fémures + agujas control no irradiadas de 6,06. Esta diferencia, al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,046$). La reducción mediana obtenida en fémures + agujas irradiadas respecto a las no irradiadas fue del 51% (Figura 3.40 y Figura 3.41).

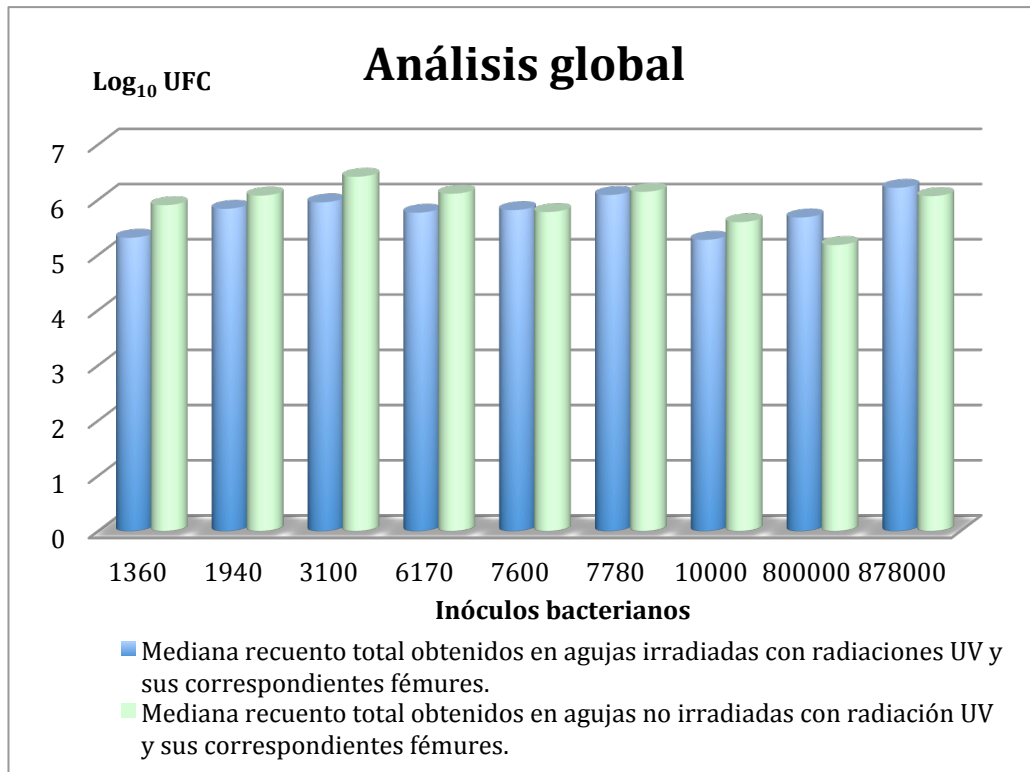


Figura 3.40: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémures + agujas irradiadas con rayos UV y de fémures + agujas control (no irradiadas), en función del tamaño del inóculo, independientemente del tiempo de eutanasia.

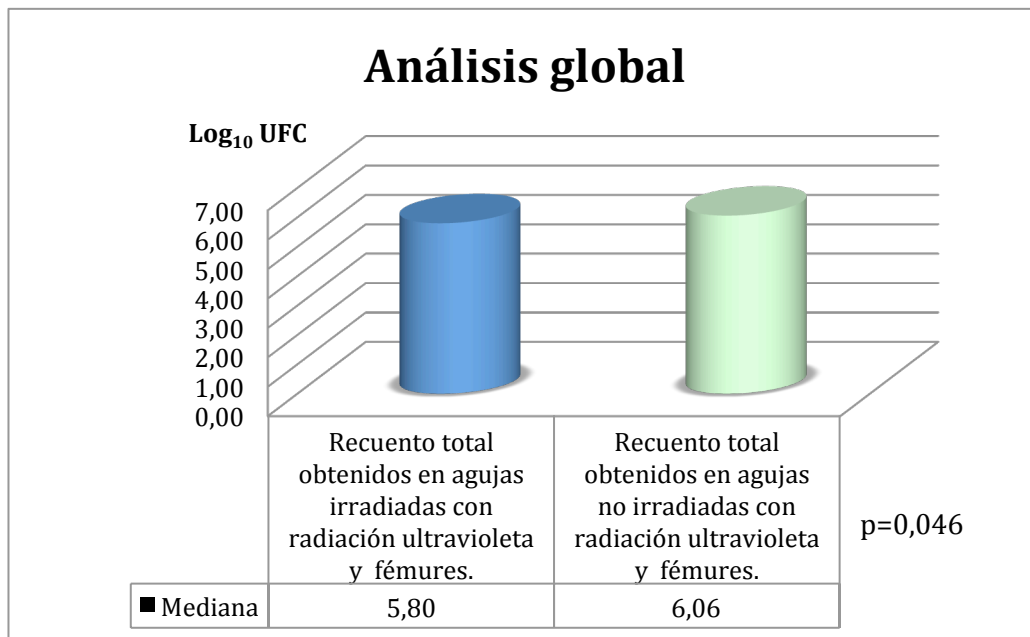


Figura 3.41: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur+ agujas irradiadas con UV y de fémur+ agujas control, independiente del tiempo de eutanasia y para inóculos menores o iguales a 10000 bacterias, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,046$).

3.4.2.2 Protocolo de implantación (b)

Implantación de 2 agujas de titanio de 1,2 x 10 mm en cada pata, una irradiada y otra sin irradiar. Es decir en cada pata existía una aguja irradiada, aguja estudio y una aguja no irradiada o control. La eutanasia de todas las ratas del protocolo (b) fue a las 24 h post-inoculación del *S.aureus*.

3.4.2.2.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación en agujas de titanio a las 24 h

La mediana de los recuentos expresada en Log_{10} de UFC obtenidos por sonicación a las 24 horas post-inoculación en las agujas de titanio irradiadas con radiación UV fue de 4,06 y en las agujas no irradiadas de 4,55 (sin tener en cuenta el tamaño del inóculo). Esta diferencia, al aplicar la prueba de Wilcoxon, resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,028$). La reducción mediana obtenida en agujas irradiadas respecto a las no irradiadas fue del 67% (Figura 3.42 y 3.43).

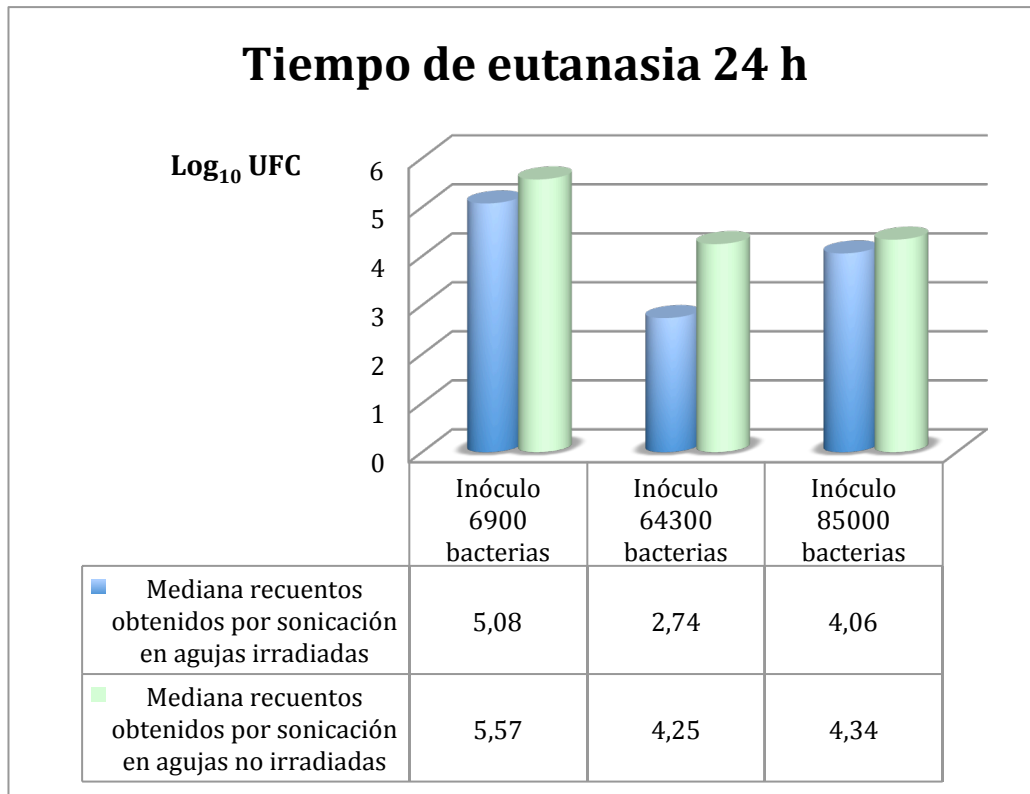


Figura 3.42: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación de las agujas irradiadas con radiaciones UV y de las agujas control (no irradiadas) en función del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo.

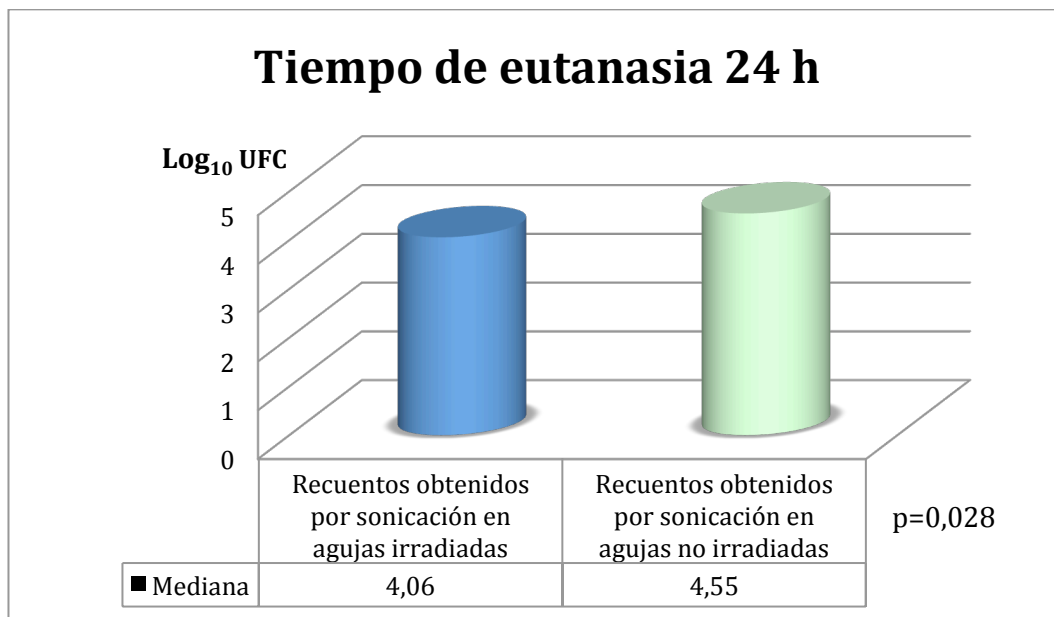


Figura 3.43: Gráfico que representa las diferencias en las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos por sonicación entre las agujas irradiadas con radiaciones UV y las agujas control (no irradiadas), independiente del tamaño del inóculo, a las 24 horas del mismo, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,028$).

3.5 Discusión

Las aleaciones de titanio son ampliamente utilizadas en implantes ortopédicos debido a su buena biocompatibilidad y propiedades mecánicas, pero las infecciones asociadas con estos implantes sigue siendo un importante problema socio-sanitario, fuente de múltiples complicaciones tales como prolongada hospitalización, complejos procedimientos de revisión, fallos de implante, retirada de implantes con la consiguiente carga económica y sufrimiento del paciente ¹⁷.

A pesar de las medidas generalizadas de asepsia quirúrgica empleadas en las intervenciones con implantes (esterilización del implante, desinfección del campo quirúrgico y profilaxis antibiótica), es imposible eliminar completamente la contaminación bacteriana. La incidencia de infecciones relacionadas con implantes quirúrgicos permanece entre el 0,2 y el 17.3% ^{18,19}.

En la patogenia de las infecciones relacionadas con implantes y formación de biocapa se cree que el paso crítico es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del biomaterial ²⁰, por lo que gran parte de la investigación se dirige a utilizar diferentes estrategias que dificulten dicha adhesión sin comprometer la osteointegración del material. Dicha adhesión primaria o inespecífica se considera que está mediada por fuerzas de origen fisico-químico donde propiedades como la hidrofobicidad del sustrato juega un papel fundamental. La duración de la fase inicial de adhesión es difícil de cuantificar pero, en los ensayos *in vitro* donde se ha evaluado, va desde los primeros minutos hasta varias horas después de comenzar el experimento ²¹.

En este sentido, la radiación ultravioleta se ha mostrado como una simple, económica y eficaz forma de modificar tales propiedades físico-químicas de la superficie del titanio. Experimentos *in vitro* han señalado que el tratamiento con radiaciones ultravioletas del Ti₆Al₄V inhibe la adhesión bacteriana sin comprometer la buena respuesta de osteoblastos y células pluripotenciales mesenquimales en las superficies tratadas ¹⁶.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* han mostrado también que el pre-tratamiento con radiaciones ultravioleta del titanio incrementa sustancialmente su capacidad osteoconductiva, posiblemente en asociación con la progresiva retirada de hidrocarburos de la superficie de TiO₂ ²². Somayaji *et al.* ²³ han publicado que cuando sobre una superficie de titanio se adhieren estafilococos previamente inactivados-muertos mediante una radiación ultravioleta se promueve la adhesión osteoblástica, la proliferación celular y se incrementa la expresión de la matriz extracelular mineralizada sobre el material.

Los trabajos que hasta ahora han utilizado la fotoactividad del TiO₂ con objetivos biomédicos se han basado en la irradiación *in situ* del biomaterial y la causa asociada a la inactivación bacteriana ha sido el efecto fotocatalítico. A pesar de ello, son pocos los artículos que han sido publicados utilizando *S. aureus*, el patógeno más común en las infecciones relacionadas con implantes. Shiraishi *et al.* ²⁴ demostraron *in vitro* la completa inactivación de *S. aureus* después de 90 minutos de irradiación ultravioleta sobre TiO₂. Oka *et al.* ²⁵ valoraron *in vivo* la eficacia fotocatalítica del TiO₂ en la inhibición de la colonización bacteriana de *S. aureus* en implantes percutáneos. La actividad fotocatalítica fue aparente reduciéndose el

número de bacterias colonizantes en las agujas tras haber sido irradiadas durante 60 minutos.

En cualquier caso, los efectos nocivos de la radiación ultravioleta en humanos podía limitar sus aplicaciones clínicas. A este respecto resulta muy interesante el trabajo de Gallardo-Moreno *et al.*⁷ que pone de manifiesto que la irradiación de la superficie de Ti₆Al₄V con luz ultravioleta C provoca un efecto bactericida residual post-irradiación que está presente, al menos, durante la primera hora después del cese de la radiación. Esto implicaría que en situaciones reales no sería necesario irradiar el material de osteosíntesis implantado en el paciente si no previo a su implantación.

Basándonos en esta hipótesis desarrollamos este estudio, cuyo principal objetivo era demostrar que el tratamiento de la superficie de Ti₆Al₄V con radiaciones ultravioletas previa a su implantación en un ser vivo disminuye la tasa de colonización del implante - hueso .

Nosotros en este estudio, en colaboración con el grupo de González-Martín, hemos observado que un tiempo de irradiación con rayos UV C de 48 horas garantiza la completa hidrofiliación de la superficie de las agujas de Ti₆Al₄V. Para la caracterización de la hidrofobicidad de la superficie irradiada mediante el ángulo de contacto se comprobaron diferentes volúmenes de gotas debido a las características de la superficie de contacto, área pequeña y curvada. Finalmente se observó que 1 μ L era un volumen adecuado ya que éste permitía un ángulo de contacto estable inmediatamente después de la deposición de la gota.

Aunque la superficie de la aguja no es la superficie ideal para cuantificar exactamente el ángulo de contacto (θ_w) debido a su curvatura, la estabilidad de las gotas permitió la comparación entre las distintas formas de las gotas en cada aguja

antes y después de ser irradiadas.

En la Figura 3.7 observamos dos típicas imágenes de gotas de agua sobre una aguja de Ti₆Al₄V antes de la irradiación UV (izquierda) y después de la irradiación UV (derecha), observándose cómo el ángulo de contacto disminuye claramente tras la hidrofiliación de la superficie por la radiación UV.

El grupo de González-Martin, en un trabajo anterior, obtuvo resultados parecidos irradiando discos de titanio Ti₆Al₄V, pero conseguían la hidrofiliación completa con solo 15 horas de irradiación ⁷. Esto podría ser debido a que los discos de titanio Ti₆Al₄V tienen una superficie plana y por ello la radiación UV que reciben es constante en el tiempo y homogénea mientras que en este estudio, al tratarse de agujas que tienen que ir girando para irradiarse completamente, la radiación no es constante en todos los puntos a la vez y para que la irradiación final sea homogénea en toda la superficie, se requiere mayor tiempo de radiación total. Esto podría tener implicaciones en un futuro si finalmente se aplicase en clínica esta técnica pues habría que considerar que la morfología de los dispositivos a irradiar puede influir en el tiempo necesario de irradiación para conseguir el efecto deseado.

Para valorar el efecto de la irradiación con rayos UV sobre agujas de Ti₆Al₄V, utilizamos 2 protocolos de implantación:

El protocolo (a) consistía en la implantación aleatoria de una aguja de titanio Ti₆Al₄V de 1,2 x 20 mm en cada pata, una aguja irradiada y otra sin irradiar. De este modo una pata actuaba como pata estudio, la que contenía la aguja irradiada y la otra pata como control, la que albergaba la aguja no irradiada. Esto nos permitía estudiar no solamente el efecto de las radiaciones UV sobre la colonización del *S. aureus* en las agujas sino también en los fémures correspondientes que contenían dicho

implante. Además de esto, en este protocolo se intentó dilucidar si existía variación de ese efecto en el tiempo y para ello se decidió realizar el estudio de la colonización en tres momentos distintos después de la inoculación e implante de las agujas, realizándose la eutanasia de los animales a las 24, 48 y 72 horas.

En los primeros resultados obtenidos con este modelo detectamos que existía gran variabilidad en los recuentos de UFC entre las agujas irradiadas y no irradiadas, independientemente del tamaño del inóculo. Aunque esta variabilidad podría ser debida a múltiples factores, nosotros observamos en este modelo (al igual que en el modelo de osteomielitis que se describió en el Capítulo II de esta Tesis) que el rebosamiento del inóculo bacteriano era diferente entre las patas, es decir, en unas patas rebosaba más volumen de inóculo que en otras, así la carga efectiva de bacterias a la que estaban expuestas las agujas irradiadas y controles podría ser diferente, lo que provocaría un sesgo que podría influir en el resultado final del recuento de UFC con el que nosotros evaluamos la colonización de agujas y fémures. En un intento de resolver esta limitación e intentar disminuir la variabilidad debida a distinto rebosamiento del inóculo en cada pata se diseñó el protocolo (b) que consistía en la implantación aleatoria de 2 agujas de titanio Ti_6Al_4V de 1,2 x10 mm en una misma pata, una aguja irradiada y otra sin irradiar, es decir, cada pata contenía una aguja irradiada y una aguja control. Con este modelo tanto la aguja irradiada como la no irradiada estaban expuestas al mismo inóculo y el rebosamiento afectaría en teoría a las 2 agujas por igual. Al analizar este modelo de implantación (b) obtuvimos una reducción mediana del 67% en los recuentos de UFC entre las agujas irradiadas y las agujas no irradiadas, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p=0.028$). A pesar de ello seguía existiendo variabilidad en los

recuentos de UFC obtenidos con distintos tamaños de inóculo independientemente de que las agujas estuvieran o no irradiadas entre las distintas ratas y esto lo atribuimos, entre otras posibles causas, a la mayor dificultad y manipulación de las agujas a la hora de su implantación sobre todo la segunda aguja. Además de este problema, en el modelo (b) teníamos la desventaja de que al albergar una misma pata la aguja irradiada y la no irradiada de control no nos permitía estudiar el efecto que podían tener las agujas irradiadas en los fémures que las contenían y por tanto finalmente lo abandonamos y continuamos con el protocolo de implantación (a).

En el protocolo de implantación (a) se estudiaron 2 tipos diferentes de variables: una de las variables estudiadas fue cómo influía el tiempo transcurrido desde el implante de las agujas sobre el recuento final de UFC pero además se quiso valorar cómo influía el tamaño del inóculo en dicho recuento final de UFC. Así, uno de los objetivos principales de este trabajo fue valorar la influencia de estas dos variables en detectar diferencias entre la superficie irradiada y la superficie control. En la literatura se han utilizado tamaños de inóculo desde 10^2 a 10^8 UFC en modelos *in vivo* para estudios de osteomielitis sobre implantes²⁶⁻²⁸. Nuestro trabajo está en el rango de inóculos de estos investigadores.

En los resultados hemos observado que cuando las ratas se sacrificaban a las 24 o 48 horas no existían diferencias estadísticamente significativas en la mediana de recuentos bacterianos obtenidos de fémures que contenían la aguja irradiada frente a los fémures que albergaban la aguja control (fémures control), pero a las 72 horas el análisis de los recuentos de UFC totales obtenidos en los fémures pone de manifiesto una reducción mediana del 87% obtenida en fémures que contenían agujas irradiadas respecto a los fémures controles ($p=0,041$).

Al analizar los resultados obtenidos en las agujas de Ti₆Al₄V para tiempos de eutanasia de 24 horas observamos una disminución de los recuentos de UFC totales obtenidos en agujas irradiadas respecto a las agujas controles, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para inóculos menores a 10000 bacterias, con una reducción mediana del 49% ($p=0,017$). No hemos podido demostrar diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de UFC recuperados de agujas irradiadas frente a los controles para tiempos de sacrificio mayores (48 y 72 horas). Ello puede ser debido a factores como son el tamaño de muestra, o a que el efecto de las radiaciones UV sea perecedero, siendo necesarios trabajos ulteriores para dilucidar este punto.

Al analizar globalmente los resultados, independientemente del tiempo de eutanasia, para inóculos menores a 10000 bacteria existe una disminución en los recuentos de UFC totales recuperados en patas irradiadas (aguja irradiada + fémur que la alberga) respecto a las patas control (aguja no irradiada + fémur que la alberga). La reducción mediana fue del 51%, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p=0,046$).

La disminución en el recuento de las bacterias aisladas, no sólo de la superficie de la aguja sino también del fémur, está de acuerdo con el mecanismo antibacteriano que desarrolla la superficie de la aleación Ti₆Al₄V tras ser irradiada con rayos UV, como han propuesto en trabajos anteriores ^{7, 16}. En ausencia de un proceso fotocatalítico responsable de tales cambios, la causa de las reducciones observadas en las muestras irradiadas debe atribuirse a la pérdida de hidrofobicidad de la aguja después de la radiación, a la emisión de radiación por parte de la superficie tras ser excitada y al exceso de conductividad superficial de la muestra. Estos dos últimos

procesos, como han puesto de manifiesto Gallardo- Moreno *et al.*^{7, 16} deben ser simultáneos y se deben producir mientras se lleva a cabo la recombinación electrón-hueco en el semiconductor TiO₂ excitado. En cualquier caso, dichos procesos no afectan únicamente a las bacterias en íntimo contacto con la superficie irradiada sino también a aquellas que se encuentran más alejadas, como se ha demostrado *in vitro* depositando bacterias no directamente sobre la superficie irradiada sino sobre láminas dieléctricas y conductoras con espesor de 0.2 mm que previamente se habían colocado sobre tal superficie excitada.

Para evitar posibles variables de confusión, como son la contaminación durante el procesamiento de las muestras, se realizó un análisis del organismo cultivado, no encontrándose ningún caso de contaminación.

Hemos observado en este trabajo que existe una gran variabilidad en los recuentos bacterianos obtenidos tanto en fémures como en agujas, independientemente de que estuvieran irradiadas o no. Tal variabilidad en el número de bacterias reflejan por un lado las particularidades intrínsecas de un modelo *in vivo* (variaciones anatómicas del fémur, en el sangrado del canal, sistema inmunitario de la rata, etc.) y por otro lado los posibles errores que se hayan podido cometer en las técnicas del estudio (diferencias en el fresado del hueso, en la colocación del implante, en la preparación de los inóculos, en el procesamiento de las muestras, etc.). Por esto creemos que resulta muy difícil reproducir *in vivo* los resultados obtenidos en un estudio *in vitro* ya que existe un grupo de variables que influyen en el resultado pero sobre las cuales no podemos tener ningún tipo de control .

Nuestro estudio *in vivo* no representa la realidad clínica sino el peor de los escenarios posibles, en el cual el implante es infectado con un inóculo importante de

bacterias sin el uso de antibióticos profiláctico. Esto no sucede en la práctica clínica diaria donde la profilaxis antibiótica es la norma y la exposición bacteriana accidental durante el proceso quirúrgico es mucho menor. Se ha recomendado que la biocarga en un quirófano convencional vacío no debe exceder de 35 UFC/ m³ y de 180 UFC/ m³ durante una intervención quirúrgica^{29,30}. En este contexto, la relativa corta vida activa de las superficies irradiadas de Ti6Al4V podría combatir efectivamente contra las bacterias que son introducidas peri-operatoriamente en el sitio de implantación como resultado de la contaminación accidental del implante, huesos o tejidos blandos circundantes. De este modo presumiblemente la irradiación del material de osteosíntesis de Ti6Al4V previo a su implantación podría ser más efectiva que en la situación *in vivo* presentada en este trabajo.

A pesar de las limitaciones intrínsecas al modelo *in vivo*, los resultados parecen corroborar los hallazgos obtenidos *in vitro*^{7, 16}. Es necesario realizar trabajos adicionales donde se valore la eficacia y el mecanismo de acción de las radiaciones ultravioleta en la prevención de la colonización bacteriana y subsiguiente infección en implantes de titanio así como su aplicabilidad para la práctica clínica diaria.

3.6 Conclusiones

En base a nuestros resultados, podemos concluir que:

- Para conseguir la completa hidrofiliación de la superficie de las agujas de Ti₆Al₄V con radiación UV-C son necesarias un mínimo de 48 horas con una lámpara que emita una longitud de onda de 254 nm y una intensidad en torno a 4,2 mW/cm².

- El tratamiento de la superficie de agujas de Ti₆Al₄V con radiaciones UV-C durante 48 horas previa a su implantación intramedular en fémur de ratas provoca una disminución en la tasa de colonización por *S. aureus* de dichas agujas irradiadas durante las primeras 24 horas post-intervención y en los fémures a la 72 horas, independientemente del tamaño del inóculo.

- Los efectos anteriormente referidos parecen ser dependientes en cierta medida del número de bacterias inoculadas y del tiempo transcurrido desde la irradiación de las agujas. Cuando los inóculos empleados son iguales o menores de 10000 bacterias existe una disminución de la colonización por *S. aureus* tanto en la aguja irradiada como en el fémur que la alberga. No hemos podido demostrar un efecto reductor de la tasa de colonización en las agujas irradiadas más allá de las 24 horas.

3.7 Bibliografía del Capítulo III

1. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent.* 1983; 49:832-7.
2. Solar RJ, Pollack SR, Korostoff E. *In vitro* corrosion testing of titanium surgical implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants. *J Biomed Mater Res.* 1979; 13:217-50.
3. Han Y, Xu K. Photoexcited formation of bone apatite-like coatings on micro-arc oxidized titanium. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 71:608-14.
4. Gopal J, George RP, Muraleedharan P, Khatak HS. Photocatalytic inhibition of microbial adhesion by anodized titanium. *Biofouling.* 2004; 20:167-75.
5. Sumita T, Yamaki, T, Yamamoto S, Miyashita A. Photo-induced surface charge separation of highly oriented TiO₂ anatase and rutile thin films. *Appl Surf Sci.* 2002; 200:21-6.
6. Fujishima A, Honda K. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature.* 1972; 238:37-8.
7. Gallardo-Moreno AM, Pacha-Olivenza MA, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, González-Martín ML. Bactericidal behaviour of Ti₆Al₄V surfaces after exposure to UV-C light. *Biomaterials.* 2010; 31:5159-68.
8. Hashimoto K, Irie H, Fujishima A. TiO₂ Photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Jpn J Appl Phys.* 2005; 44:8269-85.
9. Fujishima A Rao TN, Tryck DA. Titanium dioxide photocatalysis. *J Photochem Photobiol C: Photochemistry Review.* 2000; 1:1-21.

10. Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Nakamura N, Komine T. Continuous-sterilization system that uses photoconductor powders. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54:1330-3.
11. Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Wake H. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol lett.* 1985; 29:211-4.
12. Blake DM, Maness PC, Huang Z, Wolfrum EJ, Huang J, Jacoby WA. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Sep Purif Methods.* 1999; 28:1-50.
13. Ohko Y, Utsumi Y, Niwa C, Tatsuma T, Kobayakawa K, Satoh Y et al. Self-sterilizing and self-cleaning of silicone catheters coated with TiO₂ photocatalyst thin films: a preclinical work. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58:97-101.
14. Zhang AP, Sun YP. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2004; 10:3191-3.
15. Musk P, Campbell R, Staples J, Moss DJ, Parsons PG. Solar and UVC-induced mutation in human cells and inhibition by deoxynucleosides. *Mutat Res.* 1989; 227:25-30.
16. Gallardo-Moreno AM, Pacha-Olivenza MA, Saldana L, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, Vilaboa N, et al. In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. *Acta Biomater.* 2009; 5:181-92.
17. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.* 2004; 350:1422-9.

18. Wymenga AB, van Horn JR, Theeuwes A, Muijtjens HL, Slooff TJ. Perioperative factors associated with septic arthritis after arthroplasty. Prospective multicenter study of 362 knee and 2,651 hip operations. *Acta Orthop Scand*. 1992; 63:665-71.
19. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am*. 1999; 81:672-83.
20. Busscher HJ, Bos R, van der Mei HC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 128:229-34.
21. Muszanska AK, Nejadnik MR, Chen Y, van den Heuvel ER, Busscher HJ, van der Mei HC et al. Bacterial adhesion forces with substratum surfaces and the susceptibility of biofilms to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 4961-4.
22. Aita H, Hori N, Takeuchi M, et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*. 2009; 30: 1015-25.
23. Somayaji SN, Huet YM, Gruber HE, Hudson MC. UV-killed *Staphylococcus aureus* enhances adhesion and differentiation of osteoblasts on bone-associated biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 95:574-9.
24. Shiraishi K, Koseki H, Tsurumoto T, Baba K, Naito M, Nakayama K, et al. Antibacterial metal implant with a TiO₂-conferred photocatalytic bactericidal effect against *Staphylococcus aureus*. *Surface and Interface Analysis*. 2009; 41:17-22.

25. Oka Y, Kim WC, Yoshida T, Hirashima T, Mouri H, Urade H *et al.* Efficacy of titanium dioxide photocatalyst for inhibition of bacterial colonization on percutaneous implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 86:530-40.

26. Gracia E, Lacleriga A, Monzon M, Leiva J, Oteiza C and Amorena B. Application of a rat osteomyelitis model to compare *in vivo* and *in vitro* de antibiotic efficacy against bacteria with capacity to form biofilms. *J Surg Res.* 1998; 79:146-53.

27. Darouiche RO, Mansouri MD, Zakarevicz D, Alsharif A and Landon GC. In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89: 792-7.

28. Akiyama T, Miyamoto H, Yonekura Y, Tsukamoto M, Ando Y, Noda I *et al.* Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has in vivo antibacterial activity in the rat tibia. *J Orthop Res.* 2013; 31: 1195-200.

29. Arrowsmith LW. Air sampling in operating theatres. *J Hosp Infect.* 1985; 6: 352-3.

30. Brohus H, Balling KD and Jeppesen D. Influence of movements on contaminant transport in an operating room. *Indoor Air.* 2006; 16: 356-72.

➤ CAPÍTULO IV

**ESTUDIO *IN VIVO* DE LA EFICACIA DEL
FARNESOL EN LA PREVENCIÓN DE LA
COLONIZACIÓN DE IMPLANTES DE Ti₆Al₄V POR
*S. AUREUS***

➤ Capítulo IV

Estudio *in vivo* de la eficacia del farnesol en la prevención de la colonización de implantes de Ti₆Al₄V por *S. aureus*

4.1 Introducción

Las infecciones en biomateriales implantados en seres vivos están asociadas a un aumento considerable de la morbilidad y los costes. Las biocapas son frecuentemente resistentes a terapia antimicrobiana convencional y son difíciles de erradicar sin la retirada del biomaterial infectado ya que actúan como un reservorio, en el interior del cual las bacterias son prácticamente inaccesibles a los antibióticos y las defensas del hospedador ¹.

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosos mecanismos de defensa contra agentes antibacterianos por lo que la resistencia a viejos y nuevos productos farmacéuticos está incrementándose. La aparición de resistencia de *S. aureus* a múltiples antibióticos ha hecho que el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento para estas graves infecciones sea un motivo de preocupación urgente ².

Las infecciones por *S. aureus* meticilino resistente adquiridas en el hospital se están convirtiendo en un problema importante de salud pública ³ cuya incidencia se ha triplicado en los últimos años ⁴.

Debido al incremento progresivo en las resistencias de estas bacterias a antibióticos, los investigadores han estudiado diferentes moléculas orgánicas con capacidad antibacteriana. En este contexto los productos naturales, compuestos derivados de plantas como los aceites esenciales, han atraído considerablemente la atención. Históricamente estas sustancias han sido utilizadas para propósitos terapéuticos.

Los terpenoides son una amplia clase de metabolitos secundarios lipofílicos derivados del mevalonato y el isoprenil pirofosfato que se encuentran ampliamente en la naturaleza, sobre todo en las plantas, formando los componentes principales de los aceites esenciales ⁵. Estos son utilizados en perfumes, cosméticos, conservación de alimentos y con propósitos médicos (agentes antiinfecciosos y anticancerígenos) ⁶.

El farnesol (C₁₅H₂₆O) (Figura 4.1), es un compuesto orgánico natural, un alcohol sesquiterpeno acíclico, encontrado como un líquido incoloro con olor dulce aceitoso que se encuentra ampliamente distribuido en muchos aceites esenciales, como citronela, neroli, hierba de limón, rosa, almizcle y bálsamo ⁷. Es insoluble en agua, pero miscible con los aceites. Es el precursor de la mayoría de los sesquiterpenoides acíclicos y es un compuesto de partida importante para la síntesis orgánica.

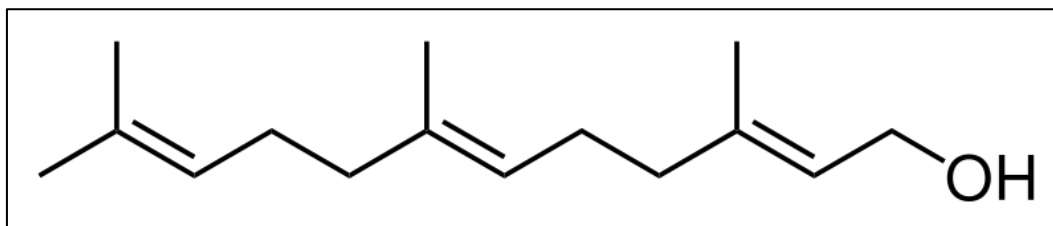


Figura 4.1: Estructura química del farnesol (Modificado de <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---F/Farnesol.htm>).

El farnesol ha sido descrito recientemente como una molécula del *quórum sensing* en el género *Candida* con probables propiedades antimicrobianas ⁸. Otros estudios han puesto de manifiesto que el farnesol afecta al crecimiento de un número importante de bacterias y hongos, tales como *S. aureus* ^{8,9}, *Streptococcus mutans* ¹⁰, *Fusarium graminearum* ¹¹, señalando su potencial uso como agente antimicrobiano¹² (Figura 4.2).

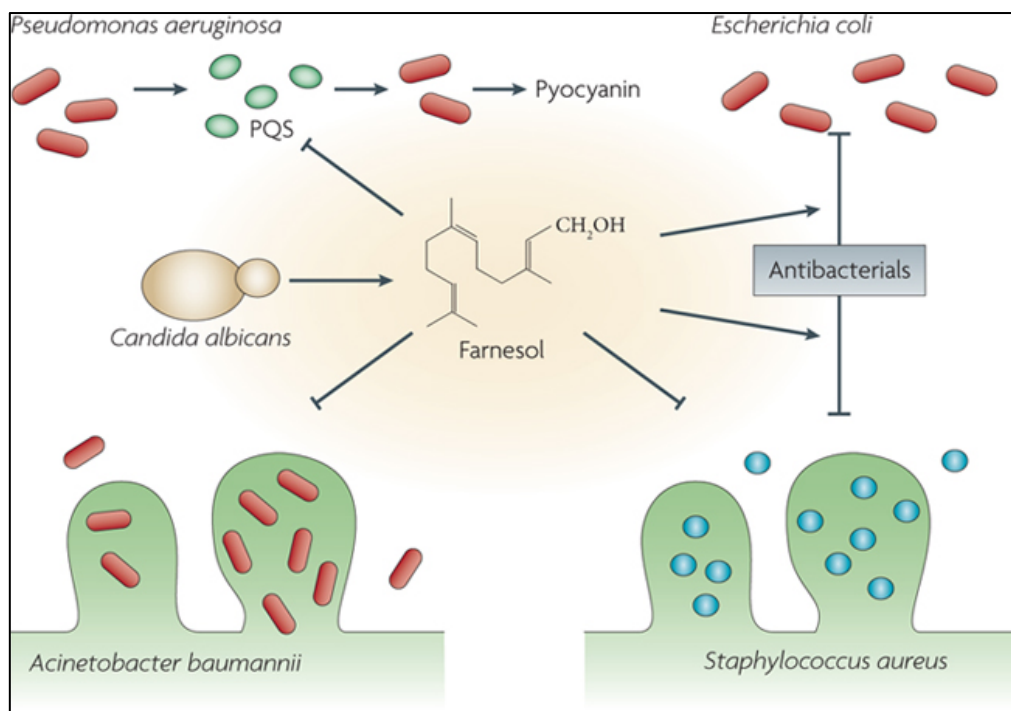


Figura 4.2: Farnesol interfiere en la integridad de la membrana del *S. aureus*, inhibe su habilidad para formar biocapa y aumenta su susceptibilidad a antimicrobianos. Además interfiere en el crecimiento de otras bacterias multiresistentes como *P. aeruginosa*, *E. coli* o *Acinetobacter baumannii*. (Modificada de http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n5/fig_tab/nrmicro2313_F5.html).

En un reciente artículo, Unnuntana *et al.* demostraron *in vitro* la capacidad del farnesol para inhibir la formación de biocapas de *S. aureus* metilino sensible a concentraciones de 30 mM sobre discos de titanio ¹³. Bhattacharyya *et al.* han sugerido que el farnesol penetra en la biocapa, se acumula en la membrana celular y

a través de su mecanismo de acción aumenta la porosidad de la membrana celular (Figura 4.3) ¹⁴.

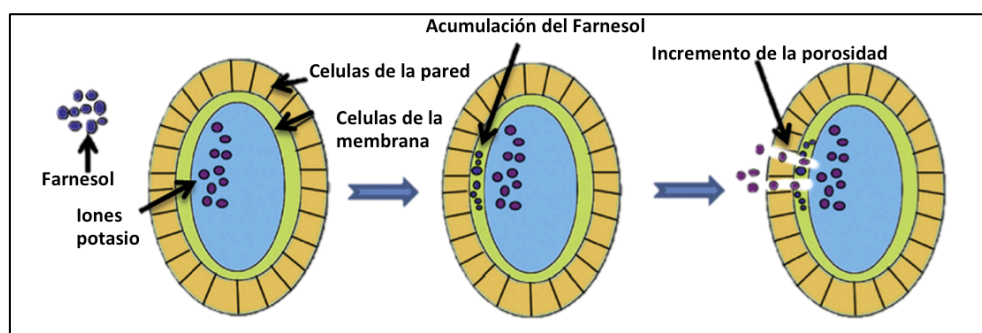


Figura 4.3: Ilustración que escenifica como actúa el farnesol sobre las biocapas de *S. aureus* aumentando la permeabilidad de las células de la pared y la membrana por inhibición de la producción de fibrina y la vía del mevalonato y desestabilización de la membrana celular que conduce a la lisis y pérdida de iones (Modificado de Bhattacharyya et al.).

Este aumento de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana a distintas sustancias podría incrementar la captación de antibióticos si se usaran en asociación con el farnesol haciendo que la dosis de antibióticos necesaria fuera menor y esto disminuiría la posible aparición de resistencias. Es decir, el farnesol incrementaría la susceptibilidad de las bacterias a antibióticos y otros compuestos antimicrobianos ⁵. Muy interesante a este respecto es la posible asociación con aminoglucósidos como la gentamicina, ya que ambas sustancias actúan sobre la membrana bacteriana pero con mecanismo de acción diferentes.

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos bactericidas que dañan la membrana celular creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana ¹⁵. Inhiben el crecimiento bacteriano actuando sobre la subunidad 30S de sus ribosomas y provocando la producción de proteínas anómalas ¹⁶. El daño a la membrana celular se pone de manifiesto por la pérdida de iones K^+ de las células

bacterianas ¹⁷. Esta clase de antibióticos no pueden penetrar fácilmente en células bacterianas intactas para afectar a la función ribosómica y requiere un mecanismo de transporte dependiente del ATP, por lo tanto, su efectividad se vería comprometida en regiones con limitado aporte de nutrientes dentro de la biocapa de *S. aureus* ¹⁸.

Jabra-Rizk *et al.* han demostrado *in vitro* un efecto sinérgico entre el farnesol y la gentamicina sobre biocapas de *S. aureus* ⁸.

4.2 Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es demostrar *in vivo* los resultados bactericidas obtenidos *in vitro* en la superficie del biomaterial Ti₆Al₄V tratada con farnesol:

- Analizar si el tratamiento con farnesol de la superficie de agujas de Ti₆Al₄V previa a su implantación en el fémur de ratas disminuye la tasa de colonización por *S. aureus* en dichas agujas.
- Valorar si el tratamiento con farnesol de la superficie de agujas de Ti₆Al₄V previa a su implantación en el fémur de ratas disminuye la tasa de colonización por *S. aureus* en dichos fémures.
- Estudiar en ratas el posible efecto sinérgico bactericida entre el tratamiento con farnesol de agujas de Ti₆Al₄V y una dosis profiláctica de gentamicina intraperitoneal.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Material de osteosíntesis: Ti_6Al_4V

El material de osteosíntesis empleado en el presente trabajo fue el mismo que se describió en el apartado 2.3.1. del Capítulo II de esta Tesis. Los alambres de 1.2 x 150 mm de Ti_6Al_4V se cortaron mediante un cortafrío en porciones de 1.2 x 20 mm .

Antes de su uso, las agujas se cantearon para evitar rebabas en los extremos por el corte.

El protocolo de limpieza de las agujas previa a su implantación fue el siguiente:

- Se frotó vigorosamente con DERQUIM DSF al 2% la superficie de las agujas con una gasa estéril.
- Se frotó vigorosamente con una gasa estéril la superficie de las agujas con agua destilada a 60°C.
- Posteriormente las agujas se sometieron a un proceso de sonicación en un baño de ultrasonidos inicialmente con agua destilada durante 15 minutos. A continuación otros 10 minutos en un recipiente con acetona al 70% para retirar los restos orgánicos. Finalmente se mantuvieron 10 minutos en etanol puro para eliminar los restos de acetona.
- Se secaron y se eliminó el máximo de etanol en un papel secante tocando uno de los lados.
- Se depositaron las agujas en el horno durante 30-60 minutos a 40°C (nunca menos de 30 minutos).

Las agujas empleadas para el estudio del efecto del farnesol además del proceso anterior fueron sometidas a:

1. Inmersión en piraña durante 1 hora para activar el óxido de titanio de modo que pudiera ser éste más reactivo de cara al farnesol.

Protocolo piraña: se añadieron 5 ml de H_2SO_4 concentrado a 5 ml de H_2O_2 del 30%, poco a poco con precaución por ser una reacción exotérmica, por lo que fue necesario dejarla en reposo durante unos 30 minutos.

2. Se lavaron con agua y etanol en un baño de ultrasonidos, 10 minutos en cada uno de ellos.
3. Finalmente las agujas estudio se introdujeron en la disolución de farnesol (30 mM) durante 24 horas. Se extrajeron las agujas y se dejaron secar en un papel absorbente estéril 2-3 horas en el horno Pasteur a 50°C.

4.3.2 Agente patógeno

El patógeno utilizado fue *Staphylococcus aureus*, la cepa ATCC 29213 (American Type Culture Collection) con la misma preparación descrita en el apartado 2.3.3 del Capítulo II de esta Tesis.

4.3.3 Animal de experimentación

Se planificó en este estudio intervenir 30 ratas Wistar de sexo masculino de peso similar (300-350 g).

Se realizaron dos protocolos de estudio :

- a) Con profilaxis antibiótica preoperatoria con gentamicina intraperitoneal, 4 mg/kg de peso administrada 30 minutos antes de la intervención.
- b) Sin profilaxis antibiótica preoperatoria.

Tanto en el protocolo (a) como en el (b) se realizó la implantación aleatoria de una aguja de titanio Ti₆Al₄V de 1.2 x 20 mm en cada fémur de las ratas, una aguja tratada con farnesol y otra sin dicho tratamiento, de modo que una pata actuaba como pata estudio, la que contenía la aguja con farnesol y la otra pata como control, la que albergaba la aguja sin farnesol.

La eutanasia de las ratas fue planificada en dos tiempos, a las 24 horas y a las 72 horas post intervención (Tabla 4.1).

Tabla 4-1: Resumen de la asignación de los animales a los protocolos de estudio.

Protocolo	n	Eutanasia	Una aguja 1.2 x 20 mm en cada pata	Profilaxis con gentamicina
(a)	7	24 h	si	si
(a)	8	72 h	si	si
(b)	7	24 h	si	no
(b)	8	72 h	si	no

4.3.4 Técnica Quirúrgica, eutanasia, recogida y procesamiento de muestras

La técnica quirúrgica, eutanasia, recogida y procesamiento de muestras que se empleó sobre las ratas fue básicamente la misma que anteriormente fue referida en el Capítulo II, apartados 2.3.4, 2.3.7 y 2.3.8, con las siguientes particularidades.

Una vez creado el canal intramedular en el fémur de la rata se inoculó lentamente en cada pata 10µL de diferentes inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 con un número aproximado de bacterias entre 300-1300. Siempre se inoculaba el mismo número de bacterias en la pata estudio y en la pata control. Finalmente, previa aleatorización, se introdujo en las cavidades creadas las agujas de titanio Ti₆Al₄V de 1.2 x 20 mm, con farnesol en la pata estudio y sin farnesol en la pata control.

4.3.5 Análisis estadístico

En primer lugar se definieron las siguientes variables:

-Inóculo: número de bacterias inoculadas.

-Recuentos obtenidos en pata-farnesol: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido de los fémures que contenían agujas con farnesol.

-Recuentos obtenidos en pata-control: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido de los fémures que NO contenían agujas con farnesol, fémures control.

-Recuentos obtenidos en aguja-farnesol: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido de las agujas con farnesol.

-Recuentos obtenidos en aguja-control: recuento de unidades formadoras de colonias obtenido de las agujas sin farnesol.

-Tiempo en días de sacrificio: tiempo en días en el que se realiza la eutanasia a las ratas.

-Recuentos totales obtenidos en pata + aguja farnesol: recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en agujas con farnesol y sus correspondientes fémures. Suma de las variables Log de recuentos obtenidos en pata-farnesol + Log de recuentos obtenidos en aguja-farnesol.

-Recuentos totales obtenidos en pata + aguja Control: Recuento total de unidades formadoras de colonias obtenidos en agujas sin farnesol y sus correspondientes fémures. Suma de las variables Log de recuentos obtenidos en pata-control + Log de recuentos obtenidos en aguja-control.

El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 para MAC (SPSS, Chicago, IL, USA). Todos los resultados fueron expresados con medidas de tendencia central tales como la media y la mediana y medidas de dispersión como la varianza. Las diferencias en recuento de colonias recuperadas después de la inoculación entre los distintos grupos de estudio fueron valoradas utilizando el test paramétrico de T-Student y el no paramétrico de Wilcoxon de los rangos con signos para muestras relacionadas.

Valores de probabilidad menores de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

4.4. Resultados

En primer lugar se realizaron las pruebas de normalidad de Kolmorov-Smirnov y Shapiro –Wilk sobre las distintas variables objeto de estudio, obteniéndose un resultado no estadísticamente significativo en todas las variables excepto en la variable Log de recuento pata control, es decir todas las variables seguían una distribución normal excepto la referida, por lo que se utilizaron tanto pruebas paramétricas como no paramétricas para el análisis estadístico.

El protocolo de estudio (a) no pudo completarse. Se decidió abandonar después de intervenir 3 ratas ya que no crecían bacterias ni en el grupo estudio ni en el

control no permitiendo ningún tipo de análisis estadístico.

El protocolo de estudio (b), se completó sobre las 15 ratas planificadas.

4.4.1 Eutanasia a las 24 horas post-inoculación

Tabla 4-2: Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en Log₁₀ UFC para tiempos de eutanasia de 24 h.

	Fémures que contenían agujas con farnesol	Fémures que contenían agujas sin farnesol	Agujas con farnesol	Agujas sin farnesol	Totales fémures + agujas con farnesol	Totales fémures + agujas sin farnesol
Media	4,47	4,43	3,79	4,63	4,59	5,02
Mediana	4,62	4,64	3,70	4,61	4,71	5,19
Varianza	0,81	1,12	0,89	0,10	0,77	0,11
Mínimo	3,26	2,60	2,90	4,12	3,41	4,63
Máximo	5,43	5,20	4,90	5,06	5,54	5,30
Rango	2,18	2,60	1,99	0,94	2,13	0,67

4.4.1.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en fémures a las 24 horas post-inoculación

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol respecto a los recuentos obtenidos de fémures que contenían agujas sin farnesol o controles, a las 24 horas post-inoculación (Figura 4.4).

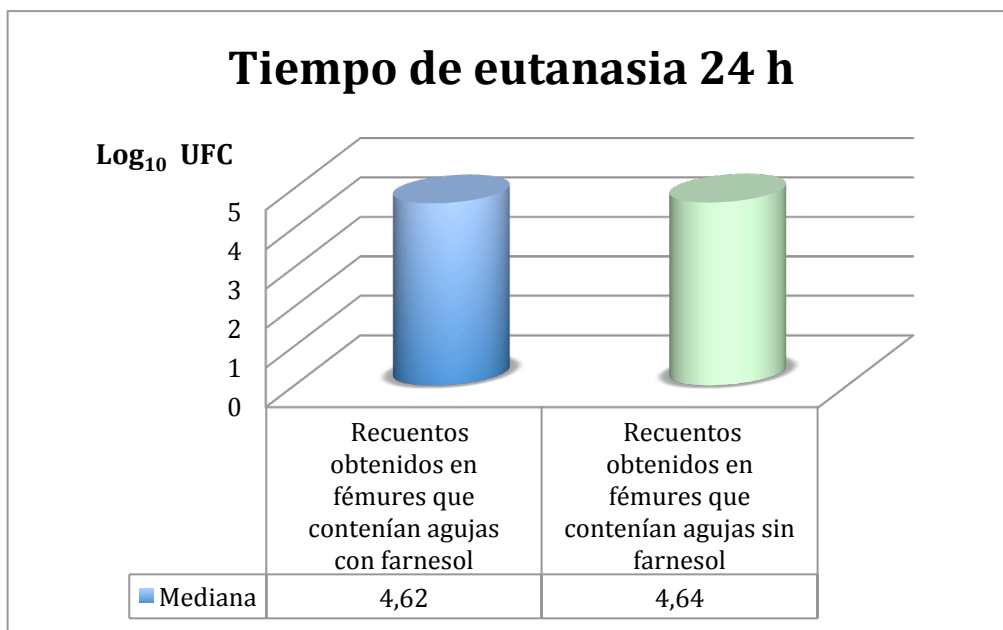


Figura 4.4: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol y de fémures control a las 24 horas post-inóculo.

4.4.1.2 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en agujas de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ a las 24 horas post-inoculación

Al aplicar la prueba de T-student para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol respecto a las agujas sin farnesol o controles, a las 24 horas post-inoculación (Figura 4.5).

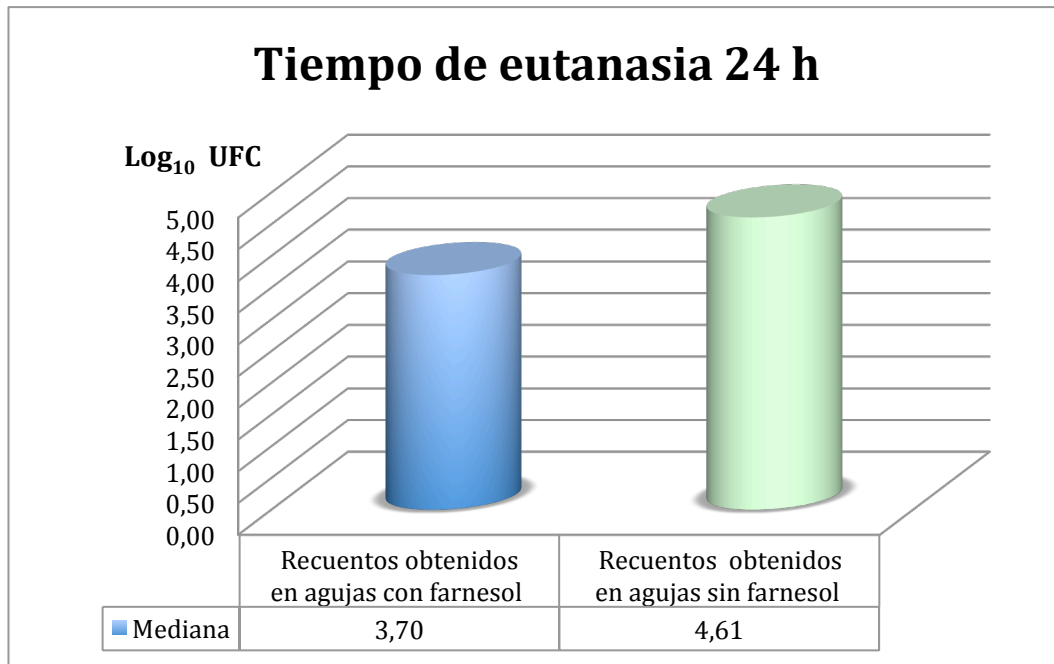


Figura 4.5: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol, a las 24 horas post-inóculo.

4.4.1.3 Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas + fémures a las 24 horas post-inoculación

Al aplicar la prueba de T-student para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures + agujas con farnesol respecto a los fémures + agujas sin farnesol o control, a las 24 horas post-inoculación (Figura 4.6).

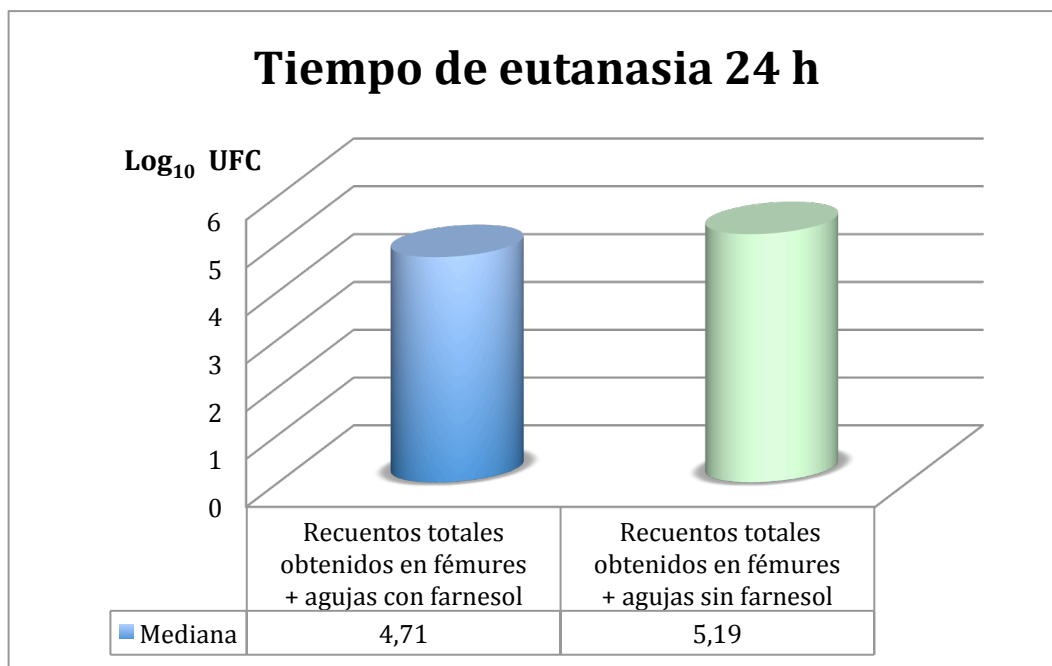


Figura 4.6: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas con farnesol y de fémur + agujas control sin farnesol a las 24 horas.

4.4.2 Eutanasia a las 72 horas post-inoculación

Tabla 4-3: Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en Log UFC para tiempos de eutanasia de 72 h.

	Fémures que contenían agujas con farnesol	Fémures que contenían agujas sin farnesol	Agujas con farnesol	Agujas sin farnesol	Totales fémures + agujas con farnesol	Totales fémures + agujas sin farnesol
Media	4,75	5,36	4,33	5,23	4,83	5,79
Mediana	5,05	5,30	4,31	5,26	5,14	5,79
Varianza	1,40	0,47	0,18	0,09	1,44	0,15
Mínimo	2,30	4,31	3,76	4,86	2,30	5,18
Máximo	6,14	6,29	4,99	5,60	6,14	6,31
Rango	3,84	1,98	1,23	,75	3,84	1,13

4.4.2.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en fémures a las 72 horas post-inoculación

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol respecto a los fémures que contenían agujas sin farnesol o controles, a las 72 horas post-inoculación (Figura 4.7).

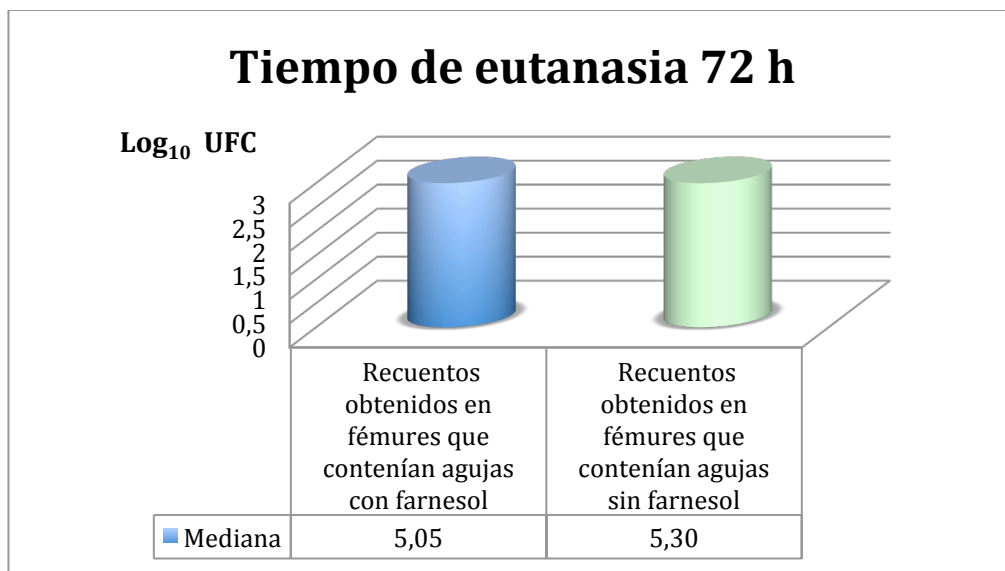


Figura 4.7: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol y de fémures control, a las 72 horas post-inoculación.

4.4.2.2 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en agujas de Ti_6Al_4V a las 72 horas post-inoculación

La mediana expresada en Log_{10} de los recuentos de UFC obtenidos a las 72 horas post-inoculación en agujas de titanio con farnesol fue de 4,31 y en agujas sin farnesol o controles fue de 5,26. Esta diferencia, al aplicar la prueba de T-student para muestras relacionadas, fue estadísticamente significativa ($p=0,004$). La reducción obtenida en agujas tratadas con farnesol respecto a las agujas controles

fue del 88 % (Figura 4.8).

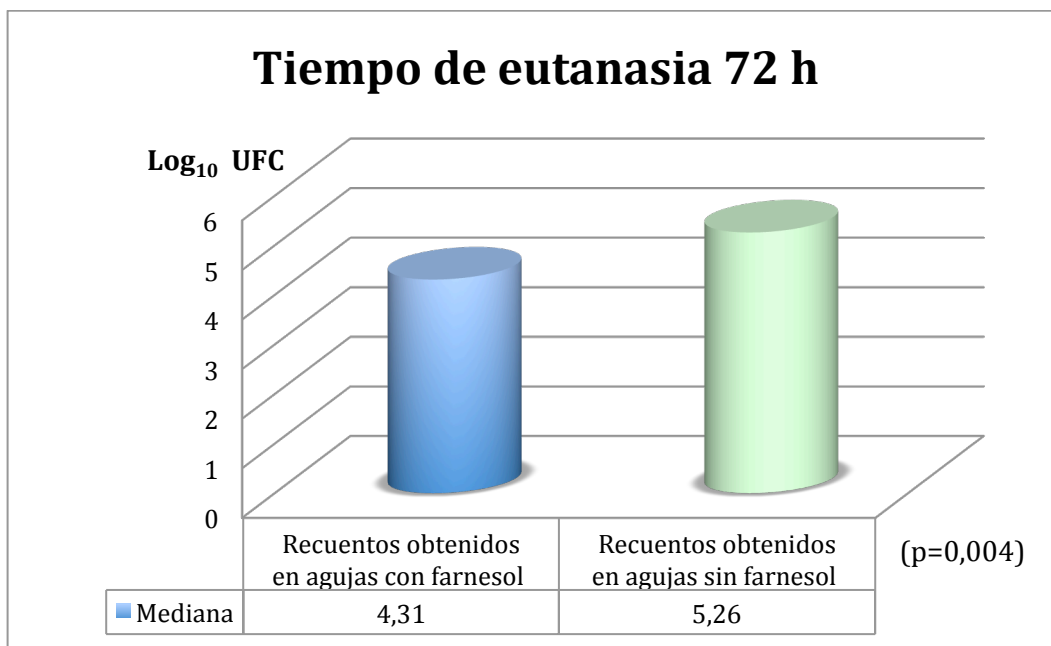


Figura 4.8: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol, a las 72 horas post-inoculación.

4.4.2.3 Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas + fémures a las 72 horas post-inoculación

Al aplicar la prueba de T-student para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures + agujas con farnesol respecto a los fémures + agujas sin farnesol o control, a las 72 horas post-inoculación (Figura 4.9).

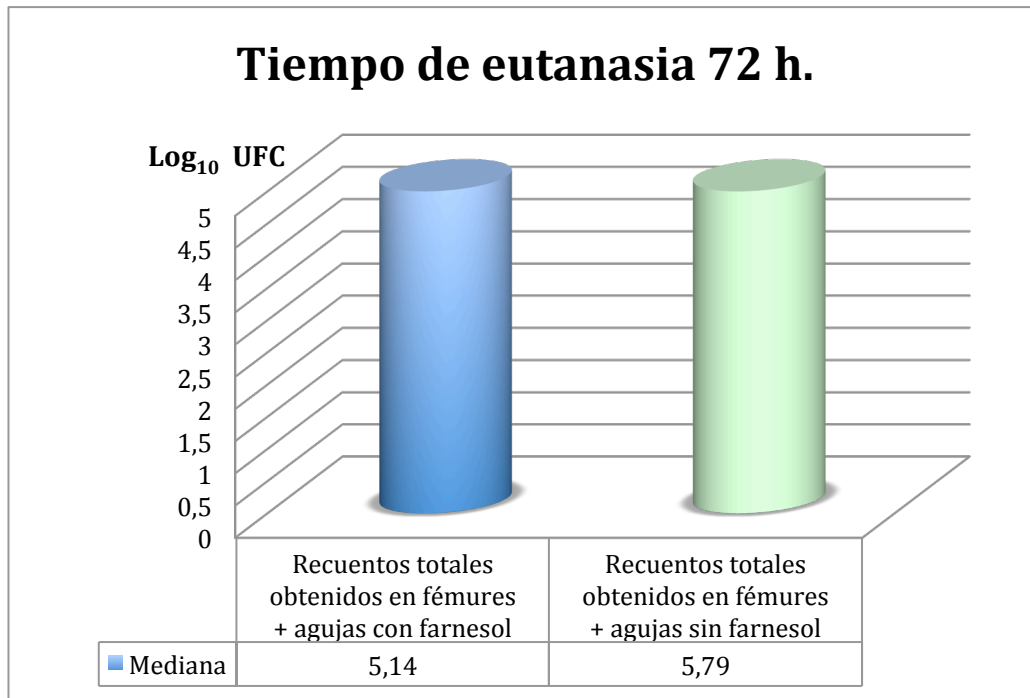


Figura 4.9: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas con farnesol y de fémur + agujas control sin farnesol, a las 72 horas.

4.4.3 Análisis global sin tener en cuenta tiempo de eutanasia

Tabla 4-4: Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en log UFC para tiempos de eutanasia de 48 h y 72 h.

	Fémures que contenían agujas con farnesol	Fémures que contenían agujas sin farnesol	Agujas con farnesol	Agujas sin farnesol	Totales fémures + agujas con farnesol	Totales fémures + agujas sin farnesol
Media	4,72	4,96	4,12	4,86	4,82	5,43
Mediana	5,00	5,09	4,26	4,86	5,07	5,30
Varianza	1,09	0,89	0,41	0,24	1,09	0,28
Mínimo	2,30	2,60	2,90	4,00	2,30	4,63
Máximo	6,14	6,29	4,99	5,60	6,14	6,31
Rango	3,84	3,68	2,09	1,60	3,84	1,69

4.4.3.1 Análisis de los recuentos de UFC obtenidos en fémures en global

Al aplicar la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol respecto a los fémures que contenían agujas sin farnesol o controles, independientemente del tiempo de eutanasia (Figura 4.10).

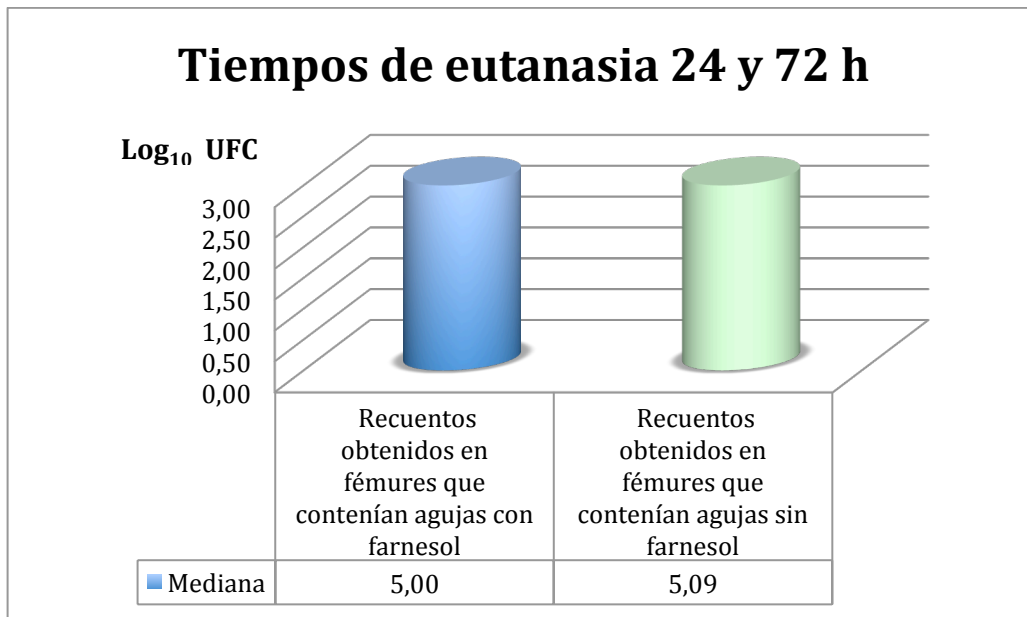


Figura 4.10: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de fémures que contenían agujas con farnesol y de fémures control, independientemente del tiempo de eutanasia.

4.4.3.2 Análisis de los recuentos obtenidos en agujas de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ en global

La mediana expresada en Log_{10} de los recuentos de UFC obtenidos independientemente del tiempo de eutanasia post-inoculación en agujas de titanio con farnesol fue de 4,26 y en agujas sin farnesol, controles, fue de 4,86. Esta diferencia, al aplicar la prueba de T-student para muestras relacionadas, resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,001$). La reducción mediana obtenida en agujas

con farnesol respecto a las agujas control fue del 74 % (Figura 4.11).

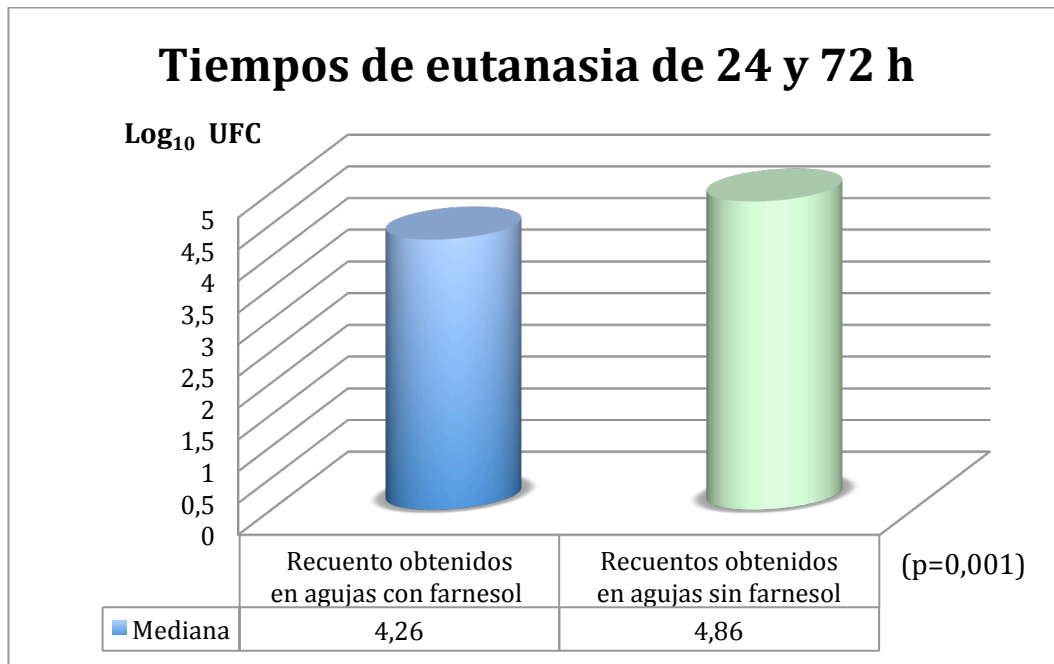


Figura 4.11: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol o controles, independientemente del tiempo de eutanasia.

4.4.3.3 Análisis de los recuentos totales de UFC obtenidos en agujas + fémur en global

Al aplicar la prueba de T-student para muestras relacionadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos totales de UFC obtenidos en fémures + agujas con farnesol respecto a los fémures + agujas sin farnesol o control, independientemente del tiempo de eutanasia (Figura 4.12).

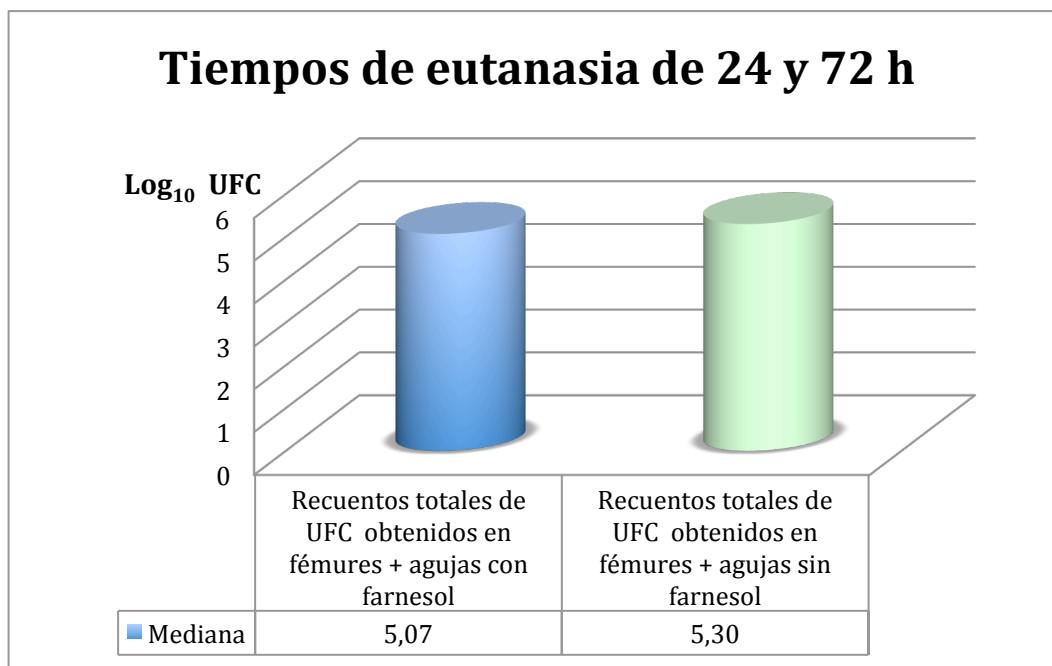


Figura 4.12: Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos totales de UFC obtenidos de fémur + agujas con farnesol y de fémur + agujas control sin farnesol, independientemente del tiempo de eutanasia.

4.5 Discusión

La rápida evolución de resistencias en bacterias patógenas, probablemente debido al abuso y mal uso de antibióticos, es actualmente un problema importante de salud pública. Por lo tanto hay una necesidad crítica de desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos con capacidad inhibitoria sin aumentar las resistencias. En este contexto las sustancias naturales empleadas en terapéutica tradicionalmente pueden jugar un importante papel.

El farnesol es un alcohol sesquiterpeno que se encuentra en los aceites esenciales de determinados frutos cítricos con actividad antimicótica y antibacteriana. Inicialmente se descubrió que el farnesol inhibía la comunicación intercelular en el hongo *Candida albicans*¹⁹. También se ha demostrado que inhibe el proceso de

filamentación y el sistema *quorum sensing* de hongos y ciertas bacterias^{8, 13}. El farnesol parece no tener efectos tóxicos sistémicos o mutágenos *in vitro* ni *in vivo*⁸.

Debido a todas estas propiedades, grupos de investigación han examinado su efecto en biocapas de *S. aureus in vitro*¹³. Unnuntana *et al.* demostraron la capacidad del farnesol para inhibir la formación de biocapas de *S. aureus* metilino sensible a concentraciones de 30 mM en discos de titanio¹³. Los grupos de Jabra-Rizk y Gomes demostraron que concentraciones menores, de rango 200-300 μM, aún tenían efecto antibacteriano sobre las biocapas de *S. aureus* y atribuían este efecto a la disrupción de la membrana celular del *S. aureus*^{8, 19}.

En la literatura no hemos encontrado estudios *in vivo* que investiguen la influencia del farnesol en la prevención de la colonización de implantes de titanio por *S. aureus*. Basados en el artículo de Unnuntana *et al.*, diseñamos este trabajo en ratas utilizando agujas de Ti₆Al₄V impregnadas en una disolución de farnesol (30 mM).

Al analizar los resultados obtenidos no hemos observado que existan diferencias estadísticamente significativas en la mediana de recuentos bacterianos obtenidos de fémures que contenían las agujas con farnesol frente a los fémures que albergaban las agujas control (fémures control). En cambio sí hemos encontrado unas diferencias estadísticamente significativas en los recuentos bacterianos obtenidos en agujas con farnesol respecto a sus controles a las 72 horas del inóculo.

La reducción mediana obtenida en agujas con farnesol respecto a las agujas control fue del 88 % (p=0,004).

Para tiempos de eutanasia de 24 horas no observamos una disminución estadísticamente significativa de los recuentos bacterianos obtenidos en agujas con

farnesol respecto a las agujas controles. Ello puede ser debido al pequeño tamaño de muestra de los subgrupos, de hecho, cuando se analizan en conjunto ambos subgrupos (24 y 48 horas), sí se obtienen diferencias estadísticamente significativas. La reducción mediana obtenida en agujas con farnesol respecto a las agujas control cuando se analizaron ambos subgrupos en conjunto fue del 74 % ($p=0,001$) .

El mecanismo íntimo de acción por el cual el farnesol tiene efecto antibacteriano se desconoce, aunque existen diferentes teorías aceptadas. El mecanismo de acción principal de esta sustancia parece ser que es la disrupción de la membrana celular del *S. aureus*. Dado el carácter lipídico de esta pequeña molécula es relativamente fácil para el farnesol acumularse en la membrana celular provocando su rotura, evidenciándose esta por el aumento de la liberación de iones de potasio de las células de la membrana^{8,9}. Este aumento de iones potasio ocurre a los 10 segundos de la adicción del farnesol lo que indica que el farnesol es capaz de dañar la membrana de *S. aureus* muy rápido⁹. El farnesol también reduce la formación de matriz de fibrina por *S. aureus* mediante inhibición de la coagulasa^{8,13,19,20} e inhibe la vía de mevalonato dificultando la apropiada producción y reparación de la membrana celular^{14,20}. El farnesol, por tanto, incrementa la permeabilidad de la membrana de las células bacterianas, de forma inespecífica, a componentes químicos exógenos, incluidos antibióticos. Esto permitiría mejorar la eficacia de los antimicrobianos sobre las bacterias y en la biocapa de *S aureus*. Algunos estudios *in vitro* han demostrado la capacidad del farnesol para incrementar la susceptibilidad de microorganismos a antimicrobianos, indicando su posible uso como fármaco adyuvante⁸. Brehm-Stecher *et al.*⁵ han publicado el incremento de susceptibilidad de *S. aureus* a ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina y

vancomicina, así como de *E. coli* a polimixina B, cuando estos fármacos son combinados con farnesol.

Nosotros, en nuestro estudio, hemos intentado demostrar *in vivo* una posible sinergia entre el farnesol y una dosis profiláctica de 4 mg/kg de gentamicina intraperitoneal en la prevención de colonización de *S. aureus* sobre agujas de Ti₆Al₄V en fémures de ratas (protocolo de estudio (a)). No pudimos completar este protocolo de estudio porque los recuentos bacterianos que obteníamos, tanto en las agujas impregnadas con farnesol y sus fémures como en las agujas y fémures controles (sin farnesol), eran nulos, no permitiendo ningún tipo de análisis estadístico. Ello quizás fuera debido a que la dosis profiláctica de gentamicina era excesiva para un estudio *in vivo* usando como inóculo células planctónicas, ya que para nuestro conocimiento todos los estudios que habían investigado dicha sinergia habían sido *in vitro*⁸, por lo tanto sin la participación del sistema inmune, y con biocapas formadas, siendo conocido que las células planctónicas son más susceptibles que las que forman biocapas al sistema inmune y a la acción de los antibióticos²¹.

Las biocapas que se forman sobre dispositivos médicos implantados en zonas no estériles (dientes, lentes de contactos, etc..) suelen estar formadas la mayoría de las veces por una flora mixta, más que por un organismo aislado, siendo las especies más frecuentemente encontradas *estafilococos* y *Candida spp*^{22, 23}. Esta asociación es especialmente frecuente y difícil de tratar en pacientes inmunocomprometidos. En este contexto creemos que el uso del farnesol, una molécula con capacidad de inhibir múltiples especies tales como, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida spp*, etc podría ser especialmente útil.

La toxicidad local y sus posibles efectos nocivos sobre la osteointegración es siempre una preocupación cuando se utiliza cualquier agente nuevo directamente sobre el hueso. Unnuntana *et al.*¹³ investigaron *in vitro* los efectos del farnesol sobre los osteoblastos en discos de titanio. Estos autores demostraron que concentraciones de farnesol entre 3 y 30 mM tenían efectos negativos irreversibles sobre pre-osteoblastos, estos se unían entre sí, formaban conglomerados, pero no se extendían sobre la superficie del titanio. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios que muestran que el farnesol causa desorganización citoesquelética y apoptosis en otro tipos de células como son las tumorales^{24,25}. Actualmente no hay estudios *in vivo* que estudien a largo plazo la posible toxicidad local o general de esta sustancia. Sería necesario realizar estudios *in vivo* valorando histológicamente y radiográficamente a largo plazo el posible efecto negativo del farnesol sobre la osteointegración del titanio.

La principal limitación de este trabajo es el tamaño muestral que nos impide tener una población mínima suficiente en los distintos subgrupos para valorar otras variables, como por ejemplo la influencia del tamaño del inóculo bacteriano en el efecto bactericida del farnesol sobre las agujas de Ti₆Al₄V, tal y como se hizo en el Capítulo III de esta Tesis. Por esa razón en este estudio, el número de bacterias inoculadas es muy similar entre 300-1300 y la eutanasia solamente se realizó en dos tiempos, a las 24 y 72 horas.

4.6 Conclusiones

A raíz de los resultados obtenidos al realizar este estudio, y a pesar de la variabilidad intrínseca de los modelos *in vivo*, podemos concluir que el tratamiento con farnesol de agujas de Ti₆Al₄V, a una concentración de 30 mM, parece disminuir la tasa de colonización por *S. aureus* en dichas agujas implantadas en el fémur de una rata.

No hemos podido demostrar un efecto similar de disminución de la tasa de colonización en los fémures que contenían las agujas tratadas con farnesol ni la existencia de una posible sinergia entre el farnesol y la gentamicina.

4.7 Bibliografía del Capítulo IV

1. Hajdu S, Lassnigg A, Graninger W, Hirschl AM, Presterl E. Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Orthop Res.* 2009; 27:1361-5.
2. Shah PM. The need for new therapeutic agents: what is the pipeline? *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11 Suppl 3:36-42.
3. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5:275-86.
4. Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clin Orthop Relat Res.* 2008; 466:1710-5.
5. Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:3357-60.
6. Kuroda M, Nagasaki S, Ohta T. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59:425-32.
7. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46:446-75.

8. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:1463-9.
9. Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 237:325-31.
10. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1302-9.
11. Semighini CP, Murray N, Harris SD. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS Microbiol Lett.* 2008; 279:259-64.
12. Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-De-Sousa TM, Báo SN, Kyaw CM, *et al.* Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8:13.
13. Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirtliff ME, Greenfield EM. The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts. An *in vitro* study. *J Bone Joint Surg Am.* 2009; 91:2683-92.
14. Bhattacharyya S, Agrawal A, Knabe C, Ducheyne P. Sol-gel silica controlled release thin films for the inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials.* 2014; 35:509-17.
15. Thompson PR, Boehr DD, Berghuis AM, Wright GD. Mechanism of aminoglycoside antibiotic kinase APH(3')-IIIa: role of the nucleotide positioning loop. *Biochemistry.* 2002; 41:7001-7.

16. Davies J, Davis BD. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem.* 1968; 243:3312-6.
17. Dubin DT, Davis BD. The effect of streptomycin on potassium flux in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1961; 52:400-2.
18. Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology.* 2000; 146:547-9.
19. Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol.* 2009; 59:118-22.
20. Kaneko M, Togashi N, Hamashima H, Hirohara M, Inoue Y. Effect of farnesol on mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot.* 2011; 64:547-9.
21. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006; 53:326-32.
22. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol.* 2002; 51:344-9.
23. Jabra-Rizk MA, Johnson JK, Forrest G, Mankes K, Meiller TF, Venezia RA. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia at a large teaching hospital. *Clin Infect Dis.* 2005; 41:1064-7.
24. Scheper MA, Shirtliff ME, Meiller TF, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Farnesol, a fungal *quorum-sensing* molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia.* 2008; 10:954-63.

25. Miquel K, Pradines A, Favre G. Farnesol and geranylgeraniol induce actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225:869-76.

➤ CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

➤ Capítulo V

Conclusiones generales

En este capítulo resumimos las conclusiones más importantes que hemos obtenidos al realizar esta Tesis. Doctoral.

Conclusiones finales

El principal objetivo de la presente Tesis fue desarrollar un modelo de osteomielitis en ratas con objeto de estudiar *in vivo* la efectividad de nuevas estrategias físico-químicas para la prevención de la colonización por *S. aureus* en aleaciones de Ti₆Al₄V.

Para alcanzar este objetivo realizamos diferentes trabajos:

1. -Capítulo II: Modelo experimental *in vivo* para el estudio de osteomielitis por *S. aureus* sobre implantes de Ti₆Al₄V.
2. -Capítulo III: Estudio *in vivo* de la eficacia de las radiaciones UV en la prevención de la colonización de implantes de Ti₆Al₄V por *S. aureus*.
3. -Capítulo IV: Estudio *in vivo* de la eficacia del farnesol en la prevención de la colonización de implantes de Ti₆Al₄V por de *S. aureus*.

Las principales conclusiones de esta Tesis son las siguientes:

1. En nuestro modelo, el inóculo mínimo para generar una osteomielitis experimental por *S. aureus* en ratas relacionada con implantes de Ti₆Al₄V sin necesidad de medios adyuvantes es de 1000 bacterias.
2. Existe una gran dificultad en reproducir los resultados obtenidos *in vitro* en un modelo *in vivo* debido, entre otros factores, a las características intrínsecas inherentes del animal de experimentación que no son controlables.
3. Para conseguir la completa hidrofiliación de la superficie de las agujas de Ti₆Al₄V con radiación ultravioleta C son necesarias un mínimo de 48 horas con una lámpara que emita una longitud de onda de 254 nm y una intensidad en torno a 4,2 mW/ cm².
4. El tratamiento de las agujas de Ti₆Al₄V con radiaciones ultravioletas (longitud de onda de 254 nm) durante 48 horas previa a su implantación intramedular en el fémur de las ratas, parece disminuir la tasa de colonización por *S aureus*, no sólo de la superficie de dichas agujas, sino también de los fémures que las contienen, siendo este efecto dependiente del número de bacterias inoculadas y del tiempo transcurrido desde la irradiación.
5. La implantación de agujas de Ti₆Al₄V impregnadas con una disolución de farnesol (30 mM) en fémures de ratas, parece provocar una disminución en la tasa de colonización por *S. aureus* de dichas agujas, este efecto no es encontrado en los fémures que las contienen.

6. Creemos que es necesario realizar estudios *in vivo* a largo plazo para valorar la posible toxicidad y los efectos sobre la osteointegración, tanto de las radiaciones ultravioletas como del farnesol sobre la superficie de los implantes de Ti_6Al_4V .

