UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

USO DE TRANSPORTADORES DE ANTIBIÓTICOS EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES ÓSEAS Y DE OTROS TEJIDOS

por

José Pedro INVERNIZZI CABRERA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Revisión Monográfica

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

9.2.2 Liberación del antibiótico……51
9.2.3 Propiedades del sulfato de calcio……56
9.2.3.1 Propiedades regenerativas……56
9.2.4 Sulfato de calcio como transportador de antibióticos……57
9.2.5 Preparación de implantes de sulfato de calcio con antibióticos……..…60
9.3 Fosfato de calcio/Hidroxiapatita……..…62
9.4 Hueso molido/Injerto de hueso……..……64
9.5 Polímeros naturales (materiales a base de proteínas)……64
9.5.1 Colágeno……...65
9.5.1.1 Colágeno como transportador de antibiótico……67
9.5.1.2 Característica de elución……68
9.5.1.3 Esponjas de colágeno……...71
9.5.1.4 Membranas y hojas de colágeno……..76
9.5.1.4.1 Membranas de colágeno……..76
9.5.1.4.2 Hojas de colágeno……77
9.5.1.5 Uso clínico en veterinaria……77
9.5.2 Hialuronato……79
9.5.3 Fibrina……79
8.5.4 Chitosán……80
9.6 Polímeros sintéticos biodegradables……..80
9.6.1 Características generales……...80
9.6.2 Proporciones de los polímeros……..82
9.6.3 Diferentes pesos……..82
9.6.4 Diferentes antibióticos……83
10. DISCUSIÓN..……..85
11. CONCLUSIONES……92
12. BIBLIOGRAFÍA……94

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM……Concentración inhibitoria mínima.

PMM…….Polimetilmetacrilato.

PPMM……..……...Perlas de polimetilmetacrilato.

PLA…….Ácido poliláctico.

PGA…….……Ácido poliglicólico.

PLGA…….Ácido poliláctico co-glicólico.

SC……..Sulfato de calcio.

PCL…….Policaprolactona.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1: Transportadores utilizados en el depósito local de antibiótico y antibióticos utilizados…….24

Tabla 2: Transportadores: Ventajas y desventajas……..27

Tabla 3: CIM para Enterobactereaceae…….31

Tabla 4: CIM para *P. aeruginosa*……31

Tabla 5: CIM para *Streptococcus*……32

Tabla 6: CIM para *Staphylococcus* coagulasa negativa…….32

Tabla 7: CIM para *S. aureus*……32

Tabla 8: CIM para la Tobramicina……..…33

Tabla 9: Ventajas y desventajas de algunos antibióticos utilizados en formulaciones de liberación lenta……35

Tabla 10: Características de elución *in-vitro* de diferentes antibióticos desde PPMM……..41

Tabla 11: Información acumulada de estudios *in-vitro* con antibióticos cargados en materiales biodegradables……...47

Tabla 12: Datos de estudios *in-vivo* de materiales biodegradables cargados con antibióticos……..48

Tabla 13: Cuadro comparativo de los diferentes injertos óseos……49

Figura 1: Proporciones de sulfato de calcio y cloruro de sodio respectivamente. (1:0, 4:1, 2:1, 1:1) A: Vista de arriba. B: Vista lateral……... 52

Figura 2: Liberación total de ceftazidina (mg): peso del sulfato de calcio vs porosidad del sulfato de calcio (%)……53

Figura 3: Liberacion de ceftazidime (mg): peso de las perlas de sulfato de calcio vs sulfato de calcio hemihidratado……...53

Figura 4: Log de la concentración de ceftazidime (µg/ml^{-1}) vs tiempo en días……54

Figura 5: (A, B, C). Secuencia radiográfica de humero de perro luego del implante de pellets de SC…….54-55

Figura 6: Formación de nuevo hueso en forma de laminillas concéntricas……55

Figura 7: Radiografías seriadas del defecto bilateral en el humero de un canino…59

Figura 8: Niveles séricos de tobramicina……...59

Figura 9: Concentración local de tobramicina……..60

Figura 10: Llenado del molde inferior de silicona con la mezcla de sulfato de calcio y antibiótico…….61

Figura 11: Colocación de la parte superior del molde…….....……...61

Figura 12: Retiro de las perlas del molde……..61

Figura 13: Perlas de sulfato de calcio……62

Figura 14: Diferentes presentaciones del colágeno……66

Figura 15: Cinética de liberación *in-vitro* obtenida de 3 diferentes tipos de colágeno con gentamicina manufacturadas con parámetros diferentes de presión.....…….69

Figura 16: Cinética de liberación *in-vivo* obtenida de 3 diferentes productos de colágeno con gentamicina fabricados por compresión térmica utilizando una barrera adicional de colágeno plano……70

Figura 17: Modelo propuesto para un perfil de liberación de antibiótico óptimo *in-vivo* (“tipo minivan”)……71

Figura 18: Esponjas de colágenos impregnadas en antibiótico……72

Figura 19: Esponja de colágeno……..73

Figura 20: Comportamiento de una esponja de colágeno *in-vitro* e *in-vivo*……74

Figura 21: Esponja de colágeno impregnada en gentamicina implantada en tejido óseo…….78

1. RESUMEN

Las infecciones óseas y de tejidos blandos son un problema serio dentro de la cirugía ortopédica y reconstructiva. Especialmente, la osteomielitis crónica es una infección difícil de tratar y erradicar, requiriéndose muchas veces de antibioticoterapia parenteral a largo plazo con múltiples cirugías de desbridamiento para lograr una terapia efectiva.

Las infecciones articulares también son patologías que requieren tratamientos agresivos y de largo plazo, con a veces tratamientos invasivos, terminando muchas veces en la destrucción de los componentes articulares, dándole a esta patología el carácter de emergencia en lo que al tratamiento se refiere.

Existen varios métodos para tratar este tipo de patologías. En esta revisión, se pondrá en manifiesto aquellos métodos que utilicen diferentes transportadores de antibióticos para combatirlas.

Los transportadores utilizados pueden ser absorbibles o no absorbibles. Dentro de los no absorbibles encontramos al polimetilmetacrilato, de origen sintético y muy utilizado en infecciones ortopédicas con grandes resultados. También están los absorbibles que pueden ser de origen sintético como el ácido poliláctico, o de origen natural, como es el caso del colágeno, ambos con muy buenos resultados en el tratamiento y control de las infecciones musculo esqueléticas.

2. SUMMARY

Bone and soft tissue infections are a serious problem in orthopaedic and reconstructive surgery. Especially chronic osteomyelitis is a very difficult infection to treat and eradicate, requiring in lot of cases long term systemic antibiotic therapy with multiple debridement surgeries to reach an effective therapy.

Articular infections are pathologies that require aggressive and long term treatment too, some time with invasive techniques, leading sometimes to the destruction of the articular components, giving this pathology, the character of emergency in which treatment concerns.

There are various methods to treat these pathologies. In this revision, there will be shown those who use different antibiotic carriers to overcome them.

Carriers used are absorbable or not absorbable. As a part of not absorbable carriers, there is polymetilmethacrylate, a synthetic carrier with a wide clinical use having good results in orthopaedic infections. There are also absorbable carriers which can be synthetic, as polylactic acid, or natural, as collagen, both with good results in the treatment and control of musculoskeletal infections.

3. INTRODUCCIÓN

La infección es definida como un desbalance homeostático entre el tejido del hospedador y la presencia de microorganismos en concentraciones que excedan 10^5 organismos por gramo de tejido o la presencia de *Streptococcos* beta-hemolíticos (Mangram y col. 1999; Sussman y Bates-Jensen, 2001; Baxter, 2012).

La ocurrencia de infección, está asociada al tipo de herida, desde laceraciones traumáticas de piel y quemaduras hasta ulceras crónicas o complicaciones quirúrgicas vinculadas o no al uso de implantes (Campton – Jhonson y Wilson, 2001). Aunque interviene la virulencia del microorganismo, la infección de las heridas generalmente se produce cuando el número de microorganismos alcanzan una concentración que excede la capacidad de defensa del huésped (Stashak, 1994).

Si los mecanismos de defensa del huésped son aptos para sobrellevar la invasión de microorganismos a través de una respuesta inmune adecuada, la herida debería curar por la vía de cuatro fases; fase inflamatoria, de desbridamiento, de reparación y fase de maduración (Stashak, 1994). De no ser así, el desarrollo de un proceso infeccioso puede seriamente limitar el proceso de curación de la herida, interferir con el cierre de la misma y hasta podría llevar a una bacteriemia, sépsis y falla multi sistémica (Zilberman y col., 2008). Animales que sufren desordenes inmuno supresivos obviamente enfrentan un riesgo mucho mayor de infección. En adición, las complicaciones asociadas a las infecciones, podrían aumentar en la población general debido a un aumento en la resistencia bacteriana (Zilberman y col., 2008).

La infección puede ocurrir dentro de los 30 días post quirúrgicos o hasta un año luego de realizado el procedimiento si se utilizó un implante (Baxter, 2012).

Son signos de infección local crónica la presencia de fístulas y formación de abscesos en el sitio quirúrgico. El cultivo de organismos tomados de una muestra aséptica más los signos clínicos, conducen al diagnóstico (Hayes y col., 2013).

Con el fin de evitar las infecciones, nuevos métodos fueron desarrollados aplicando el uso de transportadores de antibióticos en forma local, generando de esta forma grandes concentraciones de la droga en el sitio de implante, evitando concentraciones sistémicas de la misma, evitando la posibe toxicidad que pueda presentar su uso sistémico. Además de beneficiar al propietario y paciente en costos, mano de obra, comodidad en el tratamiento y seguridad del mismo.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 FACTORES DE RIESGO PARA LAS INFECCIONES EN GENERAL

Los factores de riesgo que pueden influir en el desarrollo de las infecciones están relacionados al microorganismo, al huésped y a otros factores (Baxter, 2012).

- Factores relacionados al microorganismo:
  - Número.
  - Virulencia.

- Factores relacionados al huésped:
  - Condiciones sistémicas:
    - Shock.
    - Estado nutricional: obesidad o mal nutrición.
    - Presencia de infecciones remotas.
    - Estado inmunitario.

- Otros factores:
  - Preparación del paciente y del cirujano.
  - Duración del procedimiento quirúrgico.
  - Grado de dificultad quirúrgica y trauma del tejido.
  - Método de incisión de la piel.
  - Uso de implantes.
  - Presencia de materiales contaminantes.

Las razones biológicas para la falla en el tratamiento de las infecciones se pueden categorizar en tres grupos:

1) La droga falla en alcanzar su objetivo.

2) La misma no es activa frente al patógeno.

3) El blanco es alterado (Li y col., 2004).

4.2 OSTEOMIELÍTIS

3.2.1 DEFINICIÓN

La osteomielitis es una infección caracterizada por la destrucción progresiva inflamatoria del hueso, con necrosis y formación de hueso nuevo en oposición, involucrando los diferentes componentes óseos: periostio, cavidad medular y hueso cortical (Lew y Waldvogel, 2004).

4.2.2 ETIOLOGÍA

La infección puede ocurrir por tres vías: hematógena, traumática e iatrogénica. La hematógena en equinos, es casi exclusiva de los potrillos con cuadros de sépsis, dándose a menudo en las articulaciones, físis o epífisis. Las traumáticas son secundarias a una laceración o una herida punzante, pudiendo infectar hueso, tendones, vainas y articulaciones. La infección iatrogénica, es generalmente secundaria a un proceso quirúrgico (Goodrich, 2006).

Los microorganismos más comunes de encontrarse son: microorganismos entéricos gram negativos y en adultos, de mayor a menor incidencia; Enterobacterias, *Streptococcus* no beta hemolíticos, *Staphylococcus* coagulasa positivos, *Streptococcus* beta hemolíticos y *Staphylococcus* coagulasa negativos (Goodrich, 2006).

4.2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El diagnóstico y tratamiento tempranos usualmente llevan a la resolución completa de la infección. No obstante, un retraso en el diagnóstico o una terapéutica inadecuada pueden ocasionar el desarrollo de una infección crónica, la que persiste por años, acompañándose de pérdida de la estructura normal del hueso y consecuentemente con alteraciones en la función (Drancourt y col., 1993).

Es un problema clínico particularmente difícil, que requiere un desbridamiento quirúrgico agresivo con o sin reconstrucción ósea y antibiótico terapia sistémica. El desbridamiento de los cuerpos extraños y el tejido necrótico que pueda representar un nido para la infección persistente, a menudo resulta en defectos óseos (Drancourt y col., 1993).

En el hueso normal, no existe ninguna barrera anatómica o funcional que impida la penetración de los antibióticos. Incluso, se ha visto una estrecha relación entre la concentración sérica y la ósea, de tal manera que los hallazgos en el suero en la fase de meseta pueden predecir la cantidad de antibiótico en el hueso. Sin embargo, en esta patología, hay que considerar las peculiaridades del foco de infección como acidez, isquemia y bajo potencial redox, que pueden hacer fracasar la acción del antibiótico. Además, alguna de las bacterias actuantes puede adherirse al hueso, mediante la formación del biofilm, protegiéndose así de la acción de los antibióticos y mecanismos de defensa naturales. Estas peculiaridades, junto a la supervivencia intracelular y la capacidad de mostrar resistencias fenotípicas de algunos agentes

causales como el *S. aureus*, explican el fracaso de los antimicrobianos, la persistencia de la infección y la necesidad de altas dosis y tratamientos combinados y prolongados (Drancourt y col., 1993).

4.2.4 TRATAMIENTO

El tratamiento antimicrobiano en la osteomielitis aguda, requiere una actuación empírica inmediata, previa recogida de muestras adecuadas, mientras que en la crónica es preferible aguardar a conocer el diagnóstico etiológico. Cuando el organismo es identificado, se aplica antibioticoterapia sistémica por un periodo de 6 semanas, con el antibiótico seleccionado por la sensibilidad de la bacteria actuante (Turner y col., 2005). Otros tratamientos indican la administración sistémica de antibióticos por 7 a 10 días o hasta que se controle la infección y luego seguir administrando antibióticos en forma oral por un mes, por la facilidad de administración, relativa eficacia y costos menores (Goodrich, 2006).

El antibiótico seleccionado debe ser activo frente al microorganismo causal, alcanzar concentraciones superiores a la concentración inhibitoria mínima (CIM) en el foco de infección, mantenerlas en los intervalos entre dosis y permanecer estable en el medio. Además, por la larga duración del tratamiento y las dosis elevadas que se emplean hay que tener en mente la tolerancia y la vía de administración del propio antimicrobiano, con disponibilidad de formas orales y bajo costo. Esto puede ser suficiente para alcanzar la curación de las formas agudas, pero no así en las crónicas que generalmente precisan cirugía (Turner y col., 2005).

La combinación penicilina-gentamicina son usualmente utilizadas para tratar la osteomielitis hasta tener el resultado del cultivo y antibiograma (Goodrich, 2006).

La administración sistémica de drogas por un período prolongado puede traer problemas como la toxicidad y tampoco es segura en los casos de osteomielitis, ya que en estos casos, usualmente existe un pobre aporte vascular, necesario para lograr que el antibiótico llegue al sitio de infección. Además, existe el riesgo con el uso de antibióticos en forma sistémica, de generar cepas resistentes, disminuyendo la disponibilidad de antibióticos efectivos (Turner y col., 2005).

4.3 ARTRITIS SÉPTICA

La artritis séptica es el problema más grave encontrado en una articulación. Puede provocar una rápida destrucción del cartílago con pérdida irreversible de la superficie articular en el momento de la presentación (Stashak, 2004).

4.3.1 DEFINICIÓN

Es la inflamación aguda de los componentes articulares (cápsula articular y membrana), producido por la invasión y multiplicación de microorganismos (Mc Ilwraith y Trotter, 1997).

4.3.2 ETIOLOGÍA

Puede producirse por varios mecanismos: por vía hematógena, penetración local o traumática, por extensión de infecciones de áreas vecinas, así como de forma iatrogénica, asociada generalmente con una inyección intra articular (Adams, 1998).

La artritis séptica hematógena se observa con mayor frecuencia en los potrillos jóvenes. En este caso el compromiso articular es secundario a una septicemia que generalmente es portada por el cordón umbilical del neonato o a la falla en la transferencia pasiva de inmunidad (Tremaine, 2000). Las articulaciones se alteran en general bilateralmente y existen varias afectadas en forma simultánea (Adams, 1998). Además, en una infección por *Rodococcus equi*, se puede producir una sinovitis inmuno-mediada determinando una artritis (Tremaine, 2000).

Los microorganismos más comunes comprometidos son: *Streptococcus sp*, *Stafylococcus sp, Escherichia coli* y anaerobios, que pueden ser introducidos

Se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada del antibiótico sino que, a su vez, las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. Confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloramfenicol y β -lactámicos (Chambers y col., 2006).

5. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE ANTIBIÓTICOS

La medicina, tanto humana como veterinaria, ha intentado desde siempre avanzar en los tratamientos de las diferentes condiciones de los pacientes. El uso de diversos biomateriales es utilizado para varios fines, como prótesis, transportadores de sustancias, estimuladores de crecimiento óseo y otros.

En el caso de las infecciones, nuevos métodos y materiales se fueron inventando y desarrollando con el fin de minimizar costos y riesgos para el paciente y/o propietario. Los biomateriales han sido utilizados con este fin.

5.1 CLASIFICACIÓN DE BIOMATERIALES

I. Según su composición química:

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

II. Según su respuesta biológica tras ser implantado:

a) Biotolerables. Estos son encapsulados mediante una capa de tejido fibroso conjuntivo. (Polimetilmetacrilato –PMM-, acero inoxidable, aleaciones de Cromo-Cobalto).

b) Bioinertes. La superficie del material, recubierta por una capa de óxido estable, presenta contacto directo con el hueso sin tener efecto en la osteogénesis. (Alúmina, circonia, titanio).

c) Bioactivos. Se produce un enlace químico directo con el hueso circundante. (Cerámicas de fosfato de calcio, cerámicas de óxidos de silicio o biovidrios).

d) Biodegradables o no Biodegradables. Si el material se descompone mediado por un sistema biológico o no. (Colágeno, Acidos polilácticos).

5.2 TRANSPORTADORES

En sus orígenes, para lograr la liberación local del antibiótico, se dispersaba la droga en forma de polvo luego de desbridar y antes del cierre de la herida (Rushtone, 1997). En consecuencia, en poco tiempo se alcanzaban altas concentraciones locales por un periodo de tiempo corto, lo que potencialmente resultaba en daño tisular (Tsourvakas, 2012). Por otro lado, Garcia y col., (2013), concluyeron en un estudio in-vivo en ratas, a las que se indujo una osteomielitis por *Staphylococcus* sensibles a la meticilina, que no había diferencia entre aplicar antibiótico en polvo sobre la zona afectada o realizar solamente el desbridamiento.

Otro método, consistía en empapar una gasa de algodón o lino quirúrgico en antibiótico y dejarlo en la herida hasta que esta cierre.

Aunque el sistema ideal de depósito de antibiótico no ha sido descubierto, algunos sistemas transportadores que han sido utilizados con éxito están listados en la tabla 1, junto con algunos de los antibióticos utilizados en los mismos.

Tabla 1. TRANSPORTADORES UTILIZADOS EN EL DEPÓSITO LOCAL DE ANTIBIÓTICOS Y ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS

TRANSPORTADORES	**ANTIBIOTICOS**
PMM	
	Vancomicina
	Tobramicina
	Cefazolina
	Ciprofloxacina
	Gentamicina
	Amikacina
	Cefuroxima
	Metronidazol
	Ceftiofur
	Penicilina
	Eritromicina
	Clindamicina
	Acido Fusídico
	Lincomicina
	Cefalexina
	Colistina
YESO/ SULFATO DE CALCIO	
	Gentamicina
	Tobramicina
HIDROXIAPATITA/ FOSFATO DE CALCIO	
	Gentamicina

	Amikacina
	Ceftiofur
HUESO MOLIDO	
	Tobramicina
COLAGENO	
	Gentamicina
	Amikacina
	Tetraciclina
FIBRINA	
	Tetraciclina
	Gentamicina
	Ciprofloxacina
	Cefotaxime
CHITOSAN	
	Vancomicina
	Amikacina
PLGA/PLA/PGA	
	Gentamicina
	Polimixina B
	Vancomicina
	Tobramicina
	Clindamicina
	Cefazolina
	Ciprofloxacina

Abreviaturas: PMM: Polimetilmetacrilato. PLGA: Acido poliláctico-co-glicólico. PLA: Acido poliláctico. PGA: Acido poliglicólico. Modificado de Tsourvakas, (2012)

Los transportadores son materiales de origen natural o sintético, a los que se impregna con una sustancia, la cual es liberada en el lugar donde se implante este material.

La sustancia que se impregna en el transportador, se libera del mismo por el principio de elución, el cual, según la enciclopedia universal, se define como el "*proceso por el que se separan sustancias absorbidas por un cuerpo por medio de un lavado progresivo con un líquido apropiado".*

En el caso de los transportadores de antibiótico, el principio de elución se da gracias al líquido extracelular y la sangre, que se ponen en contacto con el transportador, permitiendo que la sustancia absorbida sea liberada en tiempo y forma dependientes de las características del transportador utilizado.

Existe una gran variedad de transportadores desarrollados para el depósito local de antibióticos, los que pueden ser divididos en no biodegradables y biodegradables (Kanellakopoulu y Giamarellos-Bourboulis, 2000). Dentro de los no biodegradables encontramos al cemento óseo o polimetilmetacrilato (PMM), mientras que el grupo

de los biodegradables lo podemos sub dividir según su origen en naturales como el colágeno, o sintéticos como los polímeros de la lactida y glicolida.

El cemento de PMM, más utilizado en forma de perlas de polimetilmetacrilato (PPMM) fue aprobado para su uso en el tratamiento de la osteomielitis (Seligston y col. 1993; Klemm, 2001) y representa el actual estándar de oro para el depósito local de antibiótico en cirugías ortopédicas en humanos (Nelson, 2004). Este producto ha demostrado ser eficaz, pero tiene el inconveniente de necesitar intervención quirúrgica para retirarlo una vez cumplida su función. La remoción quirúrgica es usualmente más complicada que la implantación porque el tejido cicatrizal y las adherencias pueden llevar a una infección posquirúrgica, debido tanto a la condición local como sistémica del paciente. Además, el segundo procedimiento tiene el riesgo de las complicaciones anestésicas e inferir costos extras. Neut y col., (2001) encontraron que a pesar de la liberación de antibiótico, las PPMM actuaban como una superficie a la cual las bacterias se podían adherir, crecer y desarrollar resistencia al antibiótico.

Una alternativa al uso de estos sistemas, son los sistema biodegradables aptos para el transporte de antimicrobianos, cuya principal ventaja es la de no necesitar remoción del sitio de implantación una vez finalizada la liberación de la droga, ya que se degradan en el lugar. Estos han demostrado ser efectivos en el control de infecciones óseas y de tejidos blandos (Garvin y col., 1994; Summerhays 2000; Gursel y col., 2001; Zulauf y col., 2001; McDufee 2012).

Los implantes biodegradables sintéticos pueden proveer altos niveles de antibiótico en el tejido por el período de tiempo necesario para erradicar completamente la infección y hacer coincidir la tasa de biodegradación del implante con el tipo de infección a tratar (Kanellakopoulu y Giamarellos-Bourboulis, 2000), controlar la magnitud y duración del depósito de antibiótico, obliterar el espacio muerto y guiar su reparación.

Otros métodos incluyen el agregado de antibióticos a injertos óseos y sustitutos óseos (Shinto y col., 1992; Witso y col., 2000; Li y Hu, 2001) u otros polímeros de origen natural donde el antibiótico es adsorbido a la superficie del material y luego es liberado en la herida como por ejemplo el colágeno.

La efectividad de tales dispositivos es fuertemente dependiente de la tasa y la forma en que la droga es liberada (Wu y col., 2006). Estas características son determinadas por la matriz dentro de la cual el antibiótico será cargado, el tipo de droga y su tasa de depuración. Si la droga se libera muy rápido, toda la droga puede ser liberada antes que se controle la infección. Si la liberación es retrasada, la infección se puede iniciar más adelante, haciendo de esta manera más difícil el manejo de la herida (Zilberman y col., 2008).

Tabla 2. TRANSPORTADORES: VENTAJAS Y DESVENTAJAS			
Sustancia	**Aplicación y comentario**	**Ventajas**	**Desventajas**
PMM	No biodegradable, bimodal: 5% liberado en las primeras 24 horas, seguido por un período prolongado de liberación lenta.	Amplia experiencia clínica en humanos y en medicina veterinaria. Mezcla simple con varios antibióticos.	Cirugía secundaria para su remoción. Riesgo de propagar flora resistente.
PLGA	El tiempo de degradación depende del peso molecular y la proporción de lactida/glicolida. Procedimientos variables para cargar la droga (micro encapsulación, sinterización de la mezcla, aparatos creados *in-situ*). Liberación bimodal con hasta el 50% de liberación inicial dentro de las primeras 24 horas.	Puede ser formulado para un uso específico. Amplia experiencia clínica para tejidos. Compatibilidad de la sustancia pura. Protección de la droga de la epimerización y degradación por irradiación gama es posible.	No hay protección al antibiótico de la hidrólisis prematura.
COLÁGENO	Tiempo de degradación dependiente de la perfusión. Liberación inicial elevada en tejido óseo.	Suave adaptación a la deformación, introducidas con éxito en articulaciones de equinos y vacunos con alta liberación inicial permitiendo eliminar los gérmenes y evitando la aparición de resistencia.	Potencial infección con prion de EEB no registrada en medicina veterinaria. Inflamación intra articular asociada.
SULFATO DE CALCIO	Gran liberación del antibiótico en las primeras 24 horas.	Propiedades osteoconductivas y osteoinductivas.	No para uso en prótesis.

Abreviaturas: PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólico), PMM (Polimetilmetacrilato), EEB (encefalopatía espongiforme bovina) (Modificado de Haerdi-Landerer y col., 2010)

6. EL SISTEMA DE LIBERACIÓN IDEAL

¶ Debe producir altos niveles de antibiótico en el sitio de infección y niveles seguros de la droga en la circulación sistémica, por debajo de los niveles tóxicos.

¶ Se debe conocer la curva de elución del antibiótico respecto a los factores que la influencian y el sistema de liberación local más adecuado para el ambiente en que el material va ser colocado.

¶ Estos materiales deben ser fácilmente implantables, removibles o intercambiables, cómodos para el paciente y baratos.

El sistema ideal de liberación local de antibiótico proveerá una más eficiente liberación de altos niveles de antibiótico al sitio de infección, minimizando el riesgo de toxicidad sistémica asociada con los métodos tradicionales (Hanssen, 2005).

7. SELECCIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Para seleccionar el antibiótico apropiado, es fundamental comprender la microbiología de las infecciones de hueso y tejidos blandos.

El hueso normal, es altamente resistente a las infecciones, aunque las mismas, pueden desarrollarse como resultado de un trauma, gran cantidad de inoculo, presencia de material extraño o por vía hematógena. Por otro lado, las infecciones en fracturas que han sido quirúrgicamente reparadas, se deben a una herida abierta en la piel antes de la cirugía, la contaminación del sitio quirúrgico durante la cirugía o por la incisión quirúrgica, la cual es una fuente de contaminación para los sitios de fractura, de especial importancia en los equinos, debido a que presentan muy poco tejido blando cubriendo los huesos y articulaciones a distal de los miembros (Auer, 2006).

Independientemente del avance en las cirugías, la fabricación de prótesis y de las condiciones asépticas logradas en los quirófanos, las infecciones asociadas a traumas mayores o cirugías, son todavía inevitables.

De formarse un biofilm, este difícilmente es penetrable por el antibiótico de ser administrado en forma sistémica, resultando a menudo en una recaída de la infección. Concentraciones muy altas de antibióticos son necesarias para erradicarlas, las que difícilmente son alcanzadas por las rutas convencionales de depósito sin tener serios efectos secundarios (Fux y col., 2005).

Debido a la variedad de patógenos involucrados en las infecciones musculo esqueléticas, se deben tomar muestras adecuadas para realizar cultivos microbiológicos y test de susceptibilidad. Mientras se esperan los resultados, la selección del antibiótico inicial puede ser tomada en base a las características del caso clínico y estudios retrospectivos (Cruz y col., 2006). En equinos neonatos sépticos, las infecciones por gram negativos como la *E*. *coli*, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*. y *Actinobacillus spp*. son las predominantes (Steel y col., 1999, Meijer y col., 2000). Las heridas traumáticas son usualmente contaminadas e infectadas con *Streptococcus zooepidermicus*, *E. coli, Enterobacter spp*, y otros

oportunistas gram negativos (Meijer y col., 2000, Clark y col., 2004). Las infecciones en articulaciones de origen iatrogénico por inyecciones o incisiones, comúnmente son causadas por *S. aureus y S. aureus* resistente a la meticilina y son una preocupación en las infecciones articulares en equinos (Clark y col., 2004; Weese y col., 2005).

En caninos y felinos, la osteomielitis suele asociarse con infecciones con Staphylococcus, *Streptococcus*, *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* y anaerobios (Clark y col., 2004).

7.1 TIPOS DE ANTIBIÓTICOS

Las cefalosporinas de primera generación, amoxicilina / clavulanato, y clindamicina son antibióticos que pueden utilizarse en la terapia empírica debido a su espectro contra los gram positivos y anaerobios y su capacidad para alcanzar elevadas concentraciones en el hueso. Las quinolonas se recomiendan en caso de que exista infección por gram negativos (Nelson y Couto 2005).

La penicilina, ampicilina y el ceftiofur son antibióticos altamente eficaces contra *S. zooepidermicus* y la mayoría de otras bacterias gram positivas encontradas en infecciones de los equinos (Cruz y col., 2006).

El cefepime es una cefalosporina de cuarta generación con una gran actividad contra gram negativos. Pareciera ser posible su uso intravenoso en potrillos sépticos (Gardner y col., 2001) pero está asociado con efectos adversos gastrointestinales en caballos adultos (Guglick y col., 1998).

Los carbapenemas como el imipenem y meropenem tienen el más amplio espectro antibacterial que cualquier otro grupo de antibióticos. Su amplio espectro de acción es atribuible a su capacidad de penetrar la bacteria, su estabilidad hacia las betalactamasas y su afinidad por las proteínas de los puentes específicos de penicilina que causan la lisis de la bacteria (Bidgood y Papich, 2002). Son los más potentes de los nuevos agentes contra los cocos gram positivos, anaerobios y más del 90% de los organismos gram negativos son susceptibles incluyendo a otros microorganismos resistentes a los β-lactámicos y aminoglucósidos. Los carbapenemas son altamente resistentes a la mayoría de las lactamasas, siendo el meropenem el que tiene mejor actividad frente a *Pseudomona spp*. y Enterobacterias (Bidgood y Papich. 2002). El imipenem es metabolizado por los túbulos renales a un compuesto potencialmente nefrotóxico. Es por este motivo, que esta droga se combina con la cilastatina, la cual inhibe las enzimas de los túbulos renales. El producto combinado evita la toxicidad renal, alcanzando altas concentraciones del metabolito activo en orina. En perros, el meropenem, causa pocos efectos secundarios gastrointestinales y no es nefrotóxico o neurotóxico (Bidgood y Papich, 2002; Orsini y col., 2005). Además, tiene menos efectos adversos y puede ser administrado en forma intravenosa en concentraciones mayores que el imipenem, característica que lo hace útil para la perfusión regional en equinos. Los parámetros farmacocinéticos del imipenem administrado en forma sistémica han sido descritos en caballos (Orsini y col., 2005).

Los aminoglucósidos son bien tolerados cuando son administrados a través de métodos de depósito local, lo que reduce los costos y evita la toxicidad sistémica (Mattson y col., 2004).

La resistencia de las bacterias gram negativas disminuyó la utilización de gentamicina, si bien esta droga sigue siendo eficaz frente a *Staphylococcus* y *Streptococcus*. La amikacina, aunque más efectiva que la gentamicina contra las bacterias gram negativas y *Staphylococcus*, tiene poca actividad frente a *Streptococcus* y no debe utilizarse como agente único para tratar heridas traumáticas (Clark y col., 2004).

Las fluoroquinolonas, como la Enrofloxacina, tienen una excelente actividad frente a *Staphylococcus* y gram negativas, incluyendo a la *Pseudomona*, pero su actividad frente a *Streptococcus* y *Enterococcos* es variable y por el potencial de las fluoroquinolonas en causar daño al cartílago, su uso en forma sistémica no está recomendado en animales en crecimiento, aunque se haya utilizado con éxito. Los sistemas de depósito local son una ventaja para esta desventaja particular en este tipo de antibióticos, ya que su aplicación en forma local no permite que esto suceda. Murray (1984) utilizó este antibiótico con éxito, sin observar daño al cartílago.

Hay muchos antibióticos disponibles para su uso con transportadores, sin embargo, para Rushton (1997), según el criterio mencionado anteriormente y por los hallazgos bacteriológicos en el hueso y tejidos blandos infectados, los antibióticos más apropiados para un sistema de depósito local son los aminoglucósidos, algunos agentes beta-lactámicos y las quinolonas. Una terapia combinada de antibióticos es útil para reducir la toxicidad de los agentes individuales, prevenir la aparición de resistencia y combatir infecciones mixtas involucradas en la osteomielitis crónica (Mader y col., 1993).

Consideraciones para la selección del antimicrobiano para un sistema de depósito local (Popham y col., 1991).

- Debe ser estable a temperatura corporal y soluble en agua para asegurar la difusión desde el transportador.
- Ser de amplio espectro. Activo contra la mayoría de las bacterias patógenas más comunes involucradas en las infecciones de hueso y tejidos blandos, debiendo estar su elección basada en test de sensibilidad microbiológico.
- Ser liberado en concentraciones que excedan la CIM para los patógenos que concierne.
- No penetrar a la circulación general.
- Tener una baja tasa de hipersensibilidad.
- Presentar una baja tasa de resistencia primaria.
- No producir una infección sobre agregada.
- Ser estable con el transportador (Haerdi-Landerer y col., 2010).

¶ Ser termoestable, debido a que la polimerización es exotérmica, para las drogas que van a ser usadas en perlas de PMM (Popham y col., 1991).

¶ Deben estar protegidos de la degradación prematura por el transportador (Haerdi-Landerer y col., 2010).

Más allá del tipo de antibiótico a seleccionar, se debe tener en cuenta que las CIM para los microorganismos asociados al proceso infeccioso, deben ser alcanzadas y mantenidas por un período de tiempo para lograr una terapia satisfactoria.

Algunas de las CIM de diferentes antibióticos para diferentes bacterias son expuestas en las siguientes tablas.

Tabla 3. Enterobacteriaceae

Antibiótico	**Min CIM**	**Max CIM**	**CIM $_{50}$**	**CIM $_{90}$**	**% Susceptible**
Cefuroxime	0.190	512.000	12.000	176.000	42.9
Ceftazidime	0.023	512.000	0.190	0.750	98.7
Gentamicina	0.008	48.000	0.500	1.000	98.7
Amikacina	0.094	8.000	1.500	3.000	100.0
Ciprofloxacina	0.003	32.000	0.032	0.125	98.7
Meropenem	0.008	0.380	0.047	0.094	100.0

¶ Datos en millogramos por litro, *n* = 77. Modificado de Sueke y col., (2010)

Tabla 4. *P. aeruginosa.*

Antibiótico	**Min CIM**	**Max CIM**	**CIM $_{50}$**	**CIM $_{90}$**	**% Susceptible**
Ceftazidime	0.125	256.000	1.000	2.000	99.3
Gentamicina	0.125	256.000	1.000	2.000	96.4
Amikacina	0.125	512.000	2.000	4.000	96.4
Ciprofloxacina	0.016	6.000	0.094	0.500	98.6
Meropenem	0.012	16.000	0.094	0.250	99.3

¶ Datos en miligramos por litro, *n* = 140.
Modificado de Sueke y col., (2010)

Tabla 5. *Streptococcus**.

Antibiótico	Min CIM	Max CIM	CIM $_{50}$	CIM $_{90}$	% Susceptible
Penicilina	0.008	1.500	0.032	0.214	77.6
Cefuroxime	0.008	512.000	0.047	0.500	98.5
Ceftazidime	0.047	19.000	0.250	4.000	ND
Vancomicina	0.250	1.500	0.750	1.000	100.0
Ciprofloxacina	0.250	4.000	1.000	3.000	86.6
Meropenem	0.002	0.380	0.016	0.054	100.0

¶ Datos en miligramos por litro. *n* = 67.
¶ ND = dato no disponible.
¶ * Incluye a 42 *Streptococcus α hemolítico*, 18 *S. pneumoniae*, y 7 *Streptococcus β-hemolíticos.*

Modificado de Sueke y col., (2010).

Tabla 6. *Staphylococcus* coagulasa negativa.

Antibiótico	Min CIM	Max CIM	CIM $_{50}$	CIM $_{90}$	% Susceptible
Penicilina	0.008	256.000	0.190	1.500	29.8
Cefuroxime	0.125	6.000	0.380	2.000	ND
Ceftazidime	1.500	512.000	6.000	19.200	ND
Vancomicina	0.380	3.000	2.000	2.000	100.0
Gentamicina	0.023	48.000	0.064	3.500	89.4
Amikacina	0.250	8.000	1.000	2.400	100.0
Ciprofloxacina	0.094	8.000	0.190	0.3800	95.7
Meropenem	0.023	0.380	0.064	0.302	ND

¶ Datos en miligramos por litro, *n* = 47.
¶ ND = dato no disponible.

Modificado de Sueke y col., (2010).

Tabla 7*. S. aureus.*

Antibiótico	Min CIM	Max CIM	CIM $_{50}$	CIM $_{90}$	% Susceptible
Penicilina	0.016	48.000	0.750	1.500	22.3
Cefuroxime	0.094	512.000	0.750	1.500	ND
Ceftazidime	0.094	512.000	8.000	22.400	ND
Vancomicina	0.500	3.000	1.500	1.850	100.0
Gentamicina	0.016	512.000	0.380	1.000	95.7
Amikacina	0.500	8.000	3.000	4.000	100.0

Antibiótico	Min CIM	Max CIM	CIM_{50}	CIM_{90}	% Susceptible
Ciprofloxacina	0.094	64.000	0.380	3.000	84.0
Meropenem	0.012	3.000	0.032	0.080	ND

¶ Datos en miligramos por litro, *n* = 94.
¶ ND = dato no disponible.

Modificado de Sueke y col., (2010)

Algunas de las CIM se muestran a continuación para la Tobramicina.

Tabla 8.

Bacteria	Rango de CIM (g/mL)
E. coli	0.25 - 1
P. aeruginosa	0.12 - 1
S. aureus	0.12 - 1
S. epidermidis	4 - 8

Modificado de: National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1993).

7.2 ACTIVIDAD DEL ANTIBIÓTICO

La actividad del antibiótico puede ser dependiente de la concentración, como es el caso de la gentamicina, la amikacina y el metronidazol, o tiempo dependiente, como las cefalosporinas, carbapenemas, tetraciclinas, macrólidos y las penicilinas (McKellar y col., 2004; Ariano y col., 2005), es decir, que estas últimas, son efectivas dependiendo del tiempo en que el agente antimicrobiano esté en contacto con los microorganismos y al aumentar la concentración en plasma, aumentaría su efectividad.

En las formulaciones de liberación lenta, una gran cantidad de antibiótico es liberado al principio, lo que favorece los antibióticos que actúan dependiendo de la concentración porque eliminan un gran número de bacterias inmediatamente después de instaurada la terapia. Luego, estos antibióticos son liberados en menores cantidades y de forma constante, lo que favorecería los antibióticos tiempo dependientes.

Los antibióticos concentración dependiente deben tener un pico en el sitio de infección entre 10 a 12 veces la CIM. En contraste, la eficacia de los antibióticos tiempo dependientes se condiciona por el tiempo en que el pico de concentración es mayor a la CIM, esto debe ser entre el 50% - 100% del intervalo de dosis dependiendo del agente antibacteriano y el patógeno involucrado (Booth 2010). Es decir, para aumentar la eficacia, habría que aumentar la frecuencia de administración del antibiótico (Cruz y col., 2016).

La liberación de antibióticos dependerá de varios factores como la tasa de disolución de la droga en su matriz, permitiéndole su penetración a través de los poros del transportador. Para agentes altamente solubles, como por ejemplo los agentes β-lactámicos, la cantidad de droga liberada depende del área de superficie del transportador y de la concentración inicial de la droga en el sistema preparado. Para agentes relativamente insolubles como las quinolonas, la tasa de liberación de la droga depende de la porosidad de la matriz y de la disolución de la droga en la matriz (Allababidi y Shah, 1998). La liberación insuficiente de antibiótico sobre la base de tiempo y concentración podrían conducir al desarrollo de cepas resistentes y el crecimiento de microorganismos en la superficie de los transportadores (Soundrapandian y col., 2009).

TABLA 9. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE ALGUNOS ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN FORMULACIONES DE LIBERACIÓN LENTA

ANTIBIÓTICO	APLICACIÓN Y COMENTARIO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Gentamicina	Bactericida. Unión a subunidad 30S ribosomal. Actividad concentración dependiente.	Amplia experiencia clínica. Estable al calor. Estable en medios acuosos. Amplio espectro de acción, particularmente contra bacterias *Gram* negativas.	Nefrotóxico, ototóxico. No tiene actividad contra bacterias anaeróbicas.
Amikacina	Similar a la gentamicina con menos cepas resistentes.	Liberación lenta con PPMM.	No tiene actividad contra bacterias anaeróbicas.
Cefalosporinas	Bactericida. Inhibe la síntesis de pared celular. Actúa contra bacterias *Gram* negativas. Actividad tiempo dependiente.	Buen espectro de actividad incluyendo *Gram* positivos y gérmenes anaeróbicos. Buena compatibilidad de tejidos.	Inestable en medios acuosos.
Quinolonas (Ciprofloxacina, Enrofloxacina)	Bactericida. Inhibe de la ADN-girasa y topoisomerasa IV bacterianas.	Actividad frente a *S. aureus* resistente a la meticilina cuando son utilizados en forma local.	Condrotóxicos.
Eritromicina	Bacteriostático. Unión a subunidades 50s ribosomal.	Buena actividad contra *S. aureus* en piel y tejido blando.	El sitio de acción del anillo de la lactona es inestable en medios acuosos.
Vancomicina	Bactericida. Inhibe la síntesis de pared celular.	Actividad contra S. *aureus* meticilina resistentes. Pocos problemas de resistencia.	Nefrotóxico. Ototóxico. Espectro de acción solamente contra bacterias *Gram* positivas.

Abreviatura: PPMM: Perlas de polimetilmetacrilato. Modificado de (Haerdi-Landerer y col., 2010)

7.3 SULFATO DE GENTAMICINA

El sulfato de gentamicina es el antibiótico que cumple con la mayoría de los requisitos para ser utilizada como droga para depósito local (Ruszczak, 2003). Varias de sus características se mencionaron en la tabla 3, sin embargo existen otras características que refuerzan su uso.

Debido a que la gentamicina tiene una naturaleza polar, la tasa de resorción oral y la penetración a los tejidos son pobres y son en gran parte excluidos de la mayoría de las células y en consecuencia, las concentraciones en los tejidos son más bajas a las que correspondería la concentración plasmática (Lorentzen y col.,1996). Altas concentraciones tisulares son encontradas en la corteza renal, la endolinfa y perilinfa del oído interno, y es a esta acumulación particular, que se le atribuye la nefrotoxicidad y ototoxicidad al antibiótico (Aram y col., 1999).

Los aminoglucósidos, actúan contra bacterias gram negativas aeróbicas, su acción es concentración dependiente y presentan un efecto post antibiótico (EPA). Esta actividad concentración dependiente, describe el principio bactericida que aumenta a medida que la concentración aumenta, mientras que el EPA, refleja la supresión del crecimiento bacteriano luego de que la concentración del antibiótico cae por debajo de la CIM. El EPA puede ser específico para una bacteria así como específico de una droga, siendo para los aminoglucósidos corto para la mayoría de los organismos gram positivos (<2hs) y más largo para los gram negativos (2-7hs) (Ruszczak, 2003).

Los niveles terapéuticos son de 4 a 12 mg/l (4-12µg/ml), tomando como límite superior 10-12 mg/l (10-12µg/ml) y límite inferior 2 mg/l ($t_{1/2\ plasma}$ Ê2h).

La gentamicina es activa frente a una gran variedad de microorganismos, dentro de los que se encuentran la *E. coli, Klebsiella, Serratia, Enterobacter* y *Citrobacter*. En general, la *P. aeruginosa* es sensible a la gentamicina, aunque existe una gran variabilidad en su susceptibilidad (Katsung, 2000).

Focos aislados son difíciles de tratar en forma sistémica con éste antibiótico debido a las bajas concentraciones que se alcanzan en el tejido con baja perfusión, considerando que su acción depende de su concentración, y las limitaciones en los niveles plasmáticos por la toxicidad renal, coclear y vestibular.

8. SISTEMAS NO BIODEGRADABLES.

8.1 CEMENTO OSEO IMPREGNADO EN ANTIBIÓTICO (Polimetilmetacrilato o PMM)

Buchholz y Engelbrecht (1970), propusieron la liberación de antibióticos al sitio de infección a través de la elución del fármaco desde el PMM impregnado con antibiótico situado en un lugar adyacente al mismo, pero fueron Buchholz y col., (1984), quienes utilizaron por primera vez a este material impregnado en antibiótico como agente profiláctico contra infecciones profundas de hueso en cirugías ortopédicas en pacientes humanos. Desde entonces el PMM impregnado en antibiótico fue considerado un método efectivo en proveer localmente altas

8.1.3 MECANISMO DE LIBERACIÓN DE LA DROGA

El mecanismo de liberación de la droga del cemento de PMM es controversial. Algunos investigadores sugirieron que la droga difunde por la matriz del cemento (Shurman y col., 1978), mientras que otros creen que se disuelve de la superficie a través de agujeros o poros en el cemento (Marks y col., 1976) y cuando existen depósitos de antibiótico en estrecha proximidad, el agua es capaz de crear caminos de elución lo que permite la liberación más eficiente del mismo, a partir de los dominios internos (Joseph y col., 2003).

Bayston y Milner (1982), sugirieron que la elución ocurría como consecuencia de la difusión del antibiótico de un área con mayor concentración (dentro de la perla) a un área de menor concentración de antibiótico (medio que rodea la perla). Basados en esta teoría, especulaban que *in-vivo* los antibióticos podían ser liberados en tasas menores, pero por periodos más largos comparados a las condiciones *in-vitro*, las que podían tener más fluido alrededor de las perlas.

Por otro lado, Baker y Greenham (1988), brindaron evidencia de que la elución del antibiótico no ocurría a través de la difusión. En este estudio, se crearon cámaras de difusión que consistían en discos planos de PMM, sin antibiótico, con tubos de difusión. El compartimiento interno de la cámara de difusión fue cargado con gentamicina y azul de metileno. El compartimiento externo contenía un medio de cultivo de tejidos, fue muestreado mensualmente por 9 meses, siendo analizadas las muestras para la gentamicina y el azul de metileno. Para recoger muestras de gentamicina o de azul de metileno del medio de cultivo (cámara exterior), las sustancias deberían haber difundido desde la cámara interior. Ni la gentamicina o el azul de metileno difundieron a través de los discos en ningún momento del estudio. Como parte del mismo estudio, el escaneo por microscopia electrónica confirmó lalo

del peso del PMM), no tiene efecto en la fuerza mecánica del implante producido. Sin embargo, la adición de más de 2,25 gramos de antibiótico a 20 gramos de polvo de PMM (>11.25% del peso) reduce negativamente la fuerza mecánica (Murray, 1984).

Si no son prescindibles las características mecánicas del PMM, las proporciones pueden llevarse hasta 5:1 (20% de antibiótico) (Cierny y col., 2003). Proporciones menores a estas no lograron completar la polimerización y tampoco el endurecimiento del cemento (Cierny y col., 2003).

8.1.6.2 ANTIBIÓTICO LÍQUIDO VS POLVO

El uso de un antibiótico en forma líquida no fue necesariamente asociado a una pérdida de eficacia. Sin embargo, se ha reportado que el uso de gentamicina en forma líquida impacta en forma negativa en las características mecánicas del cemento, más que la forma en polvo, disminuyendo su elasticidad (Diefenbeck y col., 2006). Marks y col., (1976), mostraron que las fuerzas de tensión y de compresión del PMM, eran alteradas en forma negativa al combinarse con soluciones acuosas de gentamicina, mientras que si se combinaba con la forma en polvo, esto no sucedía.

Ethell y col., (2000) midieron la tasa de elución de la gentamicina y la amikacina utilizadas en forma de polvo y liquida de PPMM, no encontrando diferencias significativas entra una y otra forma para la gentamicina. Sin embargo, para la amikacina, la elución se vio afectada de manera que la forma en polvo tuvo una liberación más rápida de las perlas que la forma líquida.

8.1.6.3 MÚLTIPLES ANTIBIÓTICOS

A las perlas, también se le pueden adicionar no solo uno, sino más antibióticos, los que deben cumplir con los requisitos para su uso en este tipo de transportadores. Los estudios que investigaron el cemento mezclado con más de un antibiótico encontraron que tenían un tiempo de elución menor que cuando el antibiótico era utilizado como un único agente (Ethell y col., 2000; Philips y col., 2007). Sin embargo, para la combinación de metronidazol-gentamicina en la formulación de las perlas de PMM, la elución aumentó comparados a cuando eran preparadas con los antibióticos por separado (Ramos y col., 2003). En contraste, cuando eran mezcladas en la preparación la amikacina con la cefazolina, estas no mantenían la CIM necesaria para eliminar la infección de una herida (Phillips y col., 2000).

En cuanto al metronidazol, se observó que retrasaba en 12 horas el fraguado del cemento y la elución del metronidazol era dosis dependiente (Ramos y col., 2003).

Murray (1984), utilizó con éxito una mezcla de eritromicina y colistina en la preparación de PPMM. Los antibióticos fueron liberados rápidamente con concentraciones bactericidas, sin tener efecto sobre la fuerza mecánica ni sobre sus características para la manipulación.

A pesar de la o las combinaciones de antibióticos que puedan ser utilizadas, existe la posibilidad de tener que enfrentar, además de una de infección, la situación que los patógenos sean formadores de biofilm.

Muchos de los patógenos involucrados en las infecciones de hueso y tejidos blandos, producen un biofilm que limita la actividad del antibiótico unido al PMM (Gracia y col., 1998). El biofilm, conocido como una delgada capa extracelular de glycocalix es producida por cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Estas cepas tienen la capacidad de adherirse a materiales extraños como son las PPMM (Bayston y Rogers, 1990). Esta adherencia puede provocar la recurrencia de infección y el desarrollo de resistencia, habiéndose demostrado que pequeñas variantes en colonias de *Staphylococcus aureus* resistentes a la gentamicina fueron aisladas de heridas de pacientes con infecciones de hueso y tejidos blandos que habían sido tratados con PPMM impregnados en este antibiótico (vonEif y col., 1997). Además, Kendall y col., (1996) mostraron en un estudio *in-vitro*, que microorganismos habían sobrevivido en la superficie de las perlas.

Debido al potencial conocido del PMM impregnado en antibiótico para el desarrollo de resistencia bacteriana, Tsourvakas, (2012) no recomienda el uso rutinario del mismo como medida profiláctica, debiendo utilizase para profilaxis solamente cuando hay indicaciones claras, como un procedimiento primario de alto riesgo.

8.1.7 USO CLÍNICO

El PMM se ha utilizado en humanos desde hace tiempo con resultados positivos como lo muestran Engesaeter y col. (2003) en un estudio retrospectivo a partir del registro noruego de artroplastia, analizando la información de 22170 reemplazos totales de cadera realizados entre 1987 y 2001. Los pacientes que recibieron como profilaxis solamente antibioticoterapia sistémica tuvieron una tasa de infección 1.8 veces superior a los que recibieron antibioticoterapia sistémica combinada con cemento óseo impregnado con gentamicina. Otro estudio retrospectivo, de 92675 artroplastias de cadera listadas en el Registro Común de Suecia, tuvo similares conclusiones con el uso de cemento óseo impregnado en antibiótico (Malchau y col., 1993).

Lo que se pretende mostrar en estos estudios (Engesaeter y col., 2003; Malchau y col., 1993), gracias a la gran cantidad de casos registrados, son valores más acertados y aproximados, ya que en medicina veterinaria hacen falta muchos más registros para poder obtener resultados con este grado de validez.

El uso del PMM, también fue utilizado en animales desde ya hace varios años, obteniendo buenos resultados en el tratamiento de infecciones musculo esqueléticas y de tejidos blandos (Brown y Bennett. 1988; Butson y col., 1996; Trostle y col., 1996; Tobias y col., 1996; Holcombe 1997; Booth y col., 2001; Hartley y Sanderson , 2003).

Las PPMM impregnadas en gentamicina fueron utilizadas con éxito en el tratamiento de infecciones sinoviales refractarias en 11 equinos y 9 bovinos. 6 de 11 caballos (54,5%) volvieron a las actividades por completo y todo el ganado bovino retornó a la

normalidad. Las PPMM mostraron una liberación de 400 a 600 µg de gentamicina por perla por día. La tasa de elución luego disminuía exponencialmente a aproximadamente 75 µg por perla por día luego de 14 días y a 10 µg por día luego de 80 días (Buston y col., 1996).

En un estudio retrospectivo en equinos con fracturas abiertas o infectadas (10 fracturas de huesos largos, 2 conminutas de falange, 5 lesiones articulares y 2 articulaciones con infección crónica), que fueron refractarias a las estrategias del tratamiento standard, se utilizaron PPMM para el depósito local de antibiótico. En este estudio, la infección se resolvió y la unión de los huesos ocurrió en 15 de 19 equinos (78,9%). Los antibióticos utilizados fueron la gentamicina, cefazolina, amikacina y tobramicina. Los autores concluyeron que el uso de las PPMM se deben considerar en el tratamiento de fracturas abiertas y para las infecciones agudas o cronicas de hueso y articulaciones en equinos (Holocombe, 1997).

En perros, se encontró que las PPMM de 7mm, implantadas en la articulación de la rodilla, liberaban la máxima concentración de antibiótico entre 2 a 4 horas luego de la cirugía, manteniéndose los niveles en el tejido por encima de la CIM por un período de 117 días (Brown y Bennett. 1988).

Hartley y Sanderson (2003), utilizaron PPMM impregnadas en antibiótico para el tratamiento de una osteomielitis mandibular crónica refractaria al tratamiento con antibioticoterapia sistémica en un Benett´s Wallaby (Macroplus rufogriseus rufogriseus). El tratamiento satisfactorio se logró con la implantación de 8 perlas de PMM de 2 y 3 mm impregnadas con gentamicina y clindamicina. Su pequeño diámetro permitió aumentar el área de superficie del implante y el cierre de la herida.

8.1.8 ESTERILIZACIÓN

Las PPMM de pueden esterilizar en autoclave (Orsini y col. 2008) o con gas de óxido de etileno. La posibilidad de disminuir la efectividad de los antibióticos al autoclavar los implantes, hacen al óxido de etileno el método preferido para esterilizarlos (Goodrich, 2006).

En caso de utilizar gas para esterilizar, se recomienda airear los implantes por 24 horas a temperatura ambiente antes de utilizarlos (Goodrich, 2006).

En nuestro país encontramos el vipiflash de laboratorios vipi. Este producto viene para mezclar en su forma líquida y en polvo.

8.1.9 COMO PREPARAR PERLAS DE POLIMETILMETACRILATO (Orsini y col., 2008)

1. Esterilizar:

   a. Bowl.

   b. Mezcladora.

   c. Si se desea se puede esterilizar también un hilo de sutura monofilamento no absorbible o alambre de acero.

2. Antibióticos.

a. Los antibióticos en polvo se recomienda utilizarlos en proporciones de 1:5 a 1:20 partes de antibiótico y polimetilmetacrilato.

3. Preparar un área de trabajo aséptica y utilizar técnicas asépticas durante la preparación.

a. Como alternativa, las perlas pueden ser esterilizadas en autoclave luego de su preparación o con gas de óxido de etileno (Goodrich, 2006).

b. Se recomienda realizar el mezclado en un lugar ventilado, en caso de no poder realizarse al vacío para evacuar de esta manera los vapores generados.

4. Mezclar en bowl:

a. El polvo del cemento.

b. El antibiótico deseado.

c. El líquido.

5. Darle la forma deseada.

a. Generalmente se hacen perlas de 5 a 7 mm de diámetro.

b. Las perlas se pueden colocar sobre una hebra de sutura para facilitar el retirado luego de su colocación.

6. Dejar que cure.

a. Las perlas no utilizadas pueden ser esterilizadas en autoclave o por gas (Goodrich, 2006).

9. SISTEMAS BIODEGRADABLES

Una alternativa al PMM son los materiales biodegradables. La biodegradación tiene como principal ventaja evitar la remoción del implante una vez que el antibiótico ha sido liberado.

Estos sistemas, proveen altas concentraciones locales de antimicrobiano en el tejido por el tiempo necesario para controlar la infección pudiendo además, ser utilizado en principio para obliterar el espacio muerto y guiar su reparación. A parte, la liberación secundaria del antibiótico, puede ocurrir durante la fase de degradación del transportador, la cual puede aumentar la eficacia antibacteriana en comparación con los transportadores no biodegradables (Tsourvakas, 2012).

Estos materiales fueron clasificados en cuatro categorías (McLaren, 2004):

a) Injertos y sustitutos óseos.

b) Materiales a base de proteínas (polímeros naturales).

c) Polímeros sintéticos.

d) Materiales biodegradables misceláneos.

Dentro de estas cuatro categorías existen varios mecanismos de liberación del antibiótico, determinada por la absorción de la superficie y la tasa de liberación del mismo (Hanssen, 2005).

En las siguientes tablas se muestra la elución *in-vivo* e *in-vitro* de algunos agentes antibacterianos de materiales biodegradables.

TABLA 11. INFORMACIÓN ACUMULADA DE ESTUDIOS *IN-VITRO* CON ANTIBIÓTICOS CARGADOS EN MATERIALES BIODEGRADABLES

Transportador	**Antibiótico**	**Duración de la liberación (días)**
Injerto óseo	Vancomicina	7
	Ciprofloxacina	7
Sulfato de calcio	Gentamicina	14
Esponja de Colágeno	Gentamicina	4
	Vancomicina	2
Tapón de fibrina	Ciprofloxacina	60
Polímeros sintéticos	Clindamicina	38-50
	Tobramicina	36-75
	Vancomicina	38-51
Polilactato	Ciprofloxacina	51-350
	Pefloxacina	56-295
Yeso de Paris	Gentamicina	14
Hidroxiapatita	Gentamicina	90

Modificado de Tsourvakas 2012

TABLA 12. DATOS DE ESTUDIOS *IN-VIVO* DE MATERIALES BIODEGRADABLEBS CARGADOS CON ANTIBIÓTICOS

Transportador	**Antibiótico**	**Modelo animal**	**Duración de la liberación (días)**
Injerto óseo	Vancomicina	Rata (intramuscular)	7
	Ciprofloxacina	(intramuscular)	3
Sulfato de Calcio	Tobramicina	Canino (intramedular)	28
Hidroxiapatita	Gentamicina	Rata (intramedular)	90
Esponja de Colágeno	Gentamicina	Conejo	56
Tapón de fibrina	Ciprofloxacina	Conejo (intramedular)	15
Polímeros sintéticos	Gentamicina	Canino (intramedular)	42
	Ciprofloxacina	Conejo (intramedular)	42

Modificado de Tsourvakas 2012

9.1 INJERTOS ÓSEOS Y SUSTITUTOS DE HUESO

Auer y Stick (2006), describen tres categorías o tipos de injertos:

A) El hueso fresco, que es transferido inmediatamente de un donante al sitio de implante.

B) Los preservados, incluyendo al hueso muerto preparado, como el descalcificado, seco-congelado, irradiado o esterilizado.

C) Los reemplazos de hueso artificial, consistiendo en cerámicas como la hidroxiapatita y el sulfato de calcio.

Los injertos se pueden clasificar según su origen en:

a) Autoinjertos, cuando son tomados del propio huésped.

b) Aloinjerto, cuando el tejido es tomado de un individuo y colocado en otro individuo genéticamente distinto de la misma especie.

c) Xenoinjertos, refiriéndose al tejido transferido de individuos de diferente especie.

Las principales funciones son de soporte, osteoconducción y osteoinducción. La osteoinducción se refiere al estímulo en la formación de hueso nuevo u osteogénesis, mientras que en la osteoconducción la matriz del injerto actúa como guía en que las células mesenquimales crecerán.

Los injertos óseos, tanto los aloinjertos como los autoinjertos, fueron utilizados clínicamente por más de veinte años como vehículos para la liberación de antibiótico de forma local (McLaren, 2004).

La incorporación satisfactoria de los injertos dependen de factores como:

¶ El lugar de injerto en el huésped, que determinará la respuesta de las células osteoprogenitoras y el tejido conectivo perivascular. Cuanto menos comprometido se encuentre el lugar de injerto, mejor será la respuesta al injerto.

¶ La viabilidad del injerto. Cuanto mejor sea ésta, la aceptación será también mejor.

¶ El volumen de hueso a ser injertado. Cuanto mayor el volumen, más tiempo demorará en ser incorporado y remodelado por el huésped.

¶ La actividad de los factores de crecimiento en el lugar de injerto. Estos inducen la formación de tejido conectivo perivascular, facilitando la osteogénesis.

¶ El índice de actividad metabólica. Compuesto por la frecuencia cardiaca, flujo de sangre, tasa metabólica base, frecuencia respiratoria y temperatura corporal, se correlacionan con la capacidad de integrar el injerto, reparar fracturas y responder a los factores de crecimiento locales.

Tabla 13. Cuadro comparativo de los diferentes injertos óseos.

CARACTERÍSTICA	**AUTOINJERTO**	**ALOINJERTO**	**SULFATO DE CALCIO**	**FOSFATO DE CALCIO**
OSTEOCONDUCCION	SI	SI	SI	SI
BIOCOMPATIBILIDAD	SI	SI	SI	SI
DEGRADACION	LENTA	LENTA	COMPLETA	LENTA
HEMOSTACIA	NO	NO	SI	NO
ANGIOGENESIS	DEBIL	NO	FUERTE	NO
BARRERA/MEMBRANA	NO	NO	SI	NO
DISPONIBILIDAD	LIMITADA	ILIMITADA	ILIMITADA	ILIMITADA
TRANSMISION DE ENFERMEDADES	NO	POSIBLE	NO	NO

Modificado de Lopez y Alarcón, 2011.

9.2 SULFATO DE CALCIO

Impregnar agentes antimicrobianos junto con biomateriales, como el sulfato de calcio (SC), fueron propuestos para el tratamiento local de la osteomielitis y para ayudar con el manejo del espacio muerto (Kawanabe y col., 1998; Makinen y col., 2005).

Todos estos implantes mostraron una rápida liberación del antibiótico de forma más o menos controlada (McLaren, 2004). Uno de los beneficios de este tipo de materiales cuando es utilizado en casos de osteomielitis, es que permiten acarrear altas concentraciones de antibiótico al lugar y en simultáneo, participar del proceso de regeneración ósea durante el tiempo de degradación del material. Estos materiales también se escapan al riesgo de transmitir enfermedades patógenas asociadas con el uso de aloinjertos.

Lillo y Peltier (1955), fueron los primeros investigadores en estudiar los efectos de este material para implante en cavidades óseas. Los autores insertaron cilindros de SC, previamente fabricados en defectos quirúrgicamente elaborados en 14 perros. Según los autores, los defectos preparados eran suficientemente grandes para impedir la reparación ósea espontánea. A los 45 y 72 días postoperatorios, fueron realizados los análisis radiográficos y microscópicos, evidenciando una completa reabsorción del material. Los autores concluyeron que hubo reparación ósea completa de los defectos que recibieron el SC a los tres meses postoperatorios. Además, Peltier (2001), inició su uso en forma de comprimidos en cavidades tumorales y realizó estudios experimentales que permitieron comprobar que la implantación de SC en el hueso no produce reacción a cuerpo extraño, actúa como material osteoconductor, y su absorción es completa en el lugar de implantación.

9.2.1 CARACTERÍSTICAS

El SC es una biocerámica que se genera naturalmente (Gitelis y Brebach, 2002), compuesta de sulfato de calcio dihidratado ($CaSO_4.2H_2O$). Sufre casi reabsorción completa *in-vivo*, sin provocar una significativa respuesta inflamatoria (Strocchi y col., 2002). La materia prima de la que se hace es relativamente barata y abundante. Para aumentar sus propiedades de unión, volumen y eficacia de los injertos óseos, se puede combinar con otros materiales como autoinjertos, aloinjertos, fosfatos de calcio y vidrios bioactivos. Además posee propiedades hemostáticas y angiogénicas (Strocchi y col., 2002; Podaropoulos y col., 2009). Es bien tolerado, no inmunogénico y biodegradable.

La Biocompatibilidad es una condición *sine qua non* para materiales implantables y es el resultado de interacciones complejas en la interface huésped-material. La falta de una respuesta del huésped posterior a la implantación, es una característica importante de un material biocompatible (Lopez y Alarcón, 2011). La tasa de resorción es dependiente de la densidad del cristal pudiendo reabsorberse rápido o lento, dependiendo de cómo hayan sido producidos, más allá de esto, la reabsorción del SC es rápida y completa en comparación con otros materiales regenerativos implantables (Peltier y Lillo, 1955; Podaropoulos y col., 2009).

Originalmente el SC fue percibido sólo como relleno de defectos, pero muchos estudios demostraron que es biocompatible, biodegradable, osteoconductivo, seguro y no tóxico (Podaropoulos y col., 2009; Lazary y col., 2007).

De los materiales osteoconductores, el SC es uno de los más utilizados en el entorno clínico para el tratamiento de las osteomielitis (Gitelis & Brebach, 2002).

El término sulfato de calcio se refiere a la sal cristalina que puede presentarse en varios grados de hidratación, o sea, el grado en que el agua está asociada a la estructura cristalina, mientras que el término yeso, se refiere a un mineral natural común que se presenta en la forma dihidratada ($CaSO_4$ $2H_2O$). La forma menos hidratada del sulfato de calcio o hemihidratada ($CaSO_4$ $½H_2O$), se obtiene sometiendo la forma dihidratada a un proceso de calentamiento conocido como calcinación. Este proceso se realiza en autoclave a vapor de presión produciendo la forma hemihidratada, caracterizada por estar formada por cristales de forma prismática y es la principal constituyente del yeso usado para la confección de modelos dentales en prótesis (Lopez y Alarcón, 2011).

El proceso de calcinación realizado al aire libre, a temperatura de 110 a 120°C, produce la forma hemihidratada que contiene cristales de forma irregular conocido como yeso de Paris, utilizado como injerto (Lopez y Alarcón, 2011). Los pellet de yeso de Paris cargado con antibiótico son un auxiliar efectivo en el tratamiento de la cirugía de infecciones de cavidades en hueso. Es bien tolerado y absorbido espontáneamente en un periodo de tiempo desde semanas hasta meses siendo reemplazado por hueso si hay una arquitectura normal (Mackey y col., 1982). Muchos antibióticos pueden ser adheridos al mismo. Cualquier antibiótico hidrosoluble puede ser incorporado en su estructura cristalina, siendo los aminoglucósidos, la vancomicina y el ácido fusídico utilizados de esta manera (Mackey y col., 1982; Dacquet y col., 1992; Gitelis y Brebach, 2002).

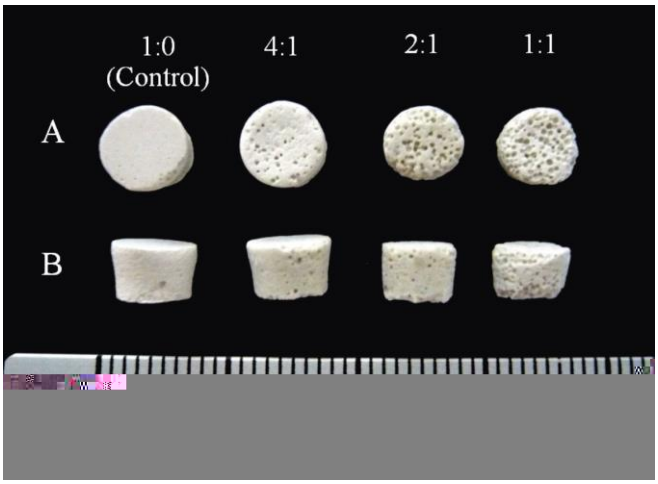
La elución de los antibióticos es diferente en las pruebas *in-vitro* con soluciones buffer que en pruebas *in-vivo (*Nelson y col., 2002). En las tablas 10 y 11 se pueden observar las diferentes eluciones de estudios *in-vivo* e *in-vitro.*

Un estudio *in-vitro* mostró que el 80% de la gentamicina era liberada en las primeras 48 horas manteniendo la liberación por 14 días (Santschi y McGarvey, 2003).

9.2.2 LIBERACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

La porosidad de un material para depósito de droga es un factor importante para alcanzar la liberación de la droga (Thitiyanaporn y col., 2012). Un estudio mostró esta importancia al crear perlas de sulfato de calcio con diferentes porosidades, midiendo la liberación de ceftazidina de las mismas. El antibiótico era mezclado en una proporción de 0,8152 en relación a la porosidad. Las perlas se hicieron mezclando cloruro de sodio y sulfato de calcio en diferentes proporciones, obteniendo así las diferentes porosidades. Cuanto más cloruro de sodio mayor porosidad obtenida. Los resultados mostraron que aumentando la porosidad se

aumentaba la elución de la droga, disminuyendo la duración de la liberación. Además, los poros proveían un andamiaje macroporoso que estimulaba la proliferación osteoblástica.



Modificado de Thitiyanaporn y col. (2012)

Fig. 1. Proporciones de sulfato de calcio y cloruro de sodio respectivamente. (1:0, 4:1, 2:1, 1:1) A: Vista de arriba. B: Vista lateral.

Las características físicas son diferentes en cuanto a la porosidad, características mecánicas, capacidad de absorción de agua y pérdida de masa. La carga compresiva máxima y fuerza compresiva máxima, son mayores cuanto menos porosa sea su estructura, y va disminuyendo conforme la estructura se hace más porosa. Esta característica se debe a la estructura y tamaño de los cristales de sulfato de calcio (Thitiyanaporn y col., 2012). Al igual que con las PPMM, de no ser fundamental la necesidad de las características mecánicas carga y fuerza compresiva, la porosidad ofrece a este material una gran ventaja y características de elución muy útiles para el tratamiento de infecciones.

La porosidad es un factor que afecta la permeabilidad de la sustancia a adicionar al SC, afectando el tiempo de elución de la droga cargada. Aumentando la porosidad, aumenta la permeabilidad para la disolución de la droga, disminuyendo los tiempos de elución. Por lo tanto, cuanto menos porosa sea la estructura, mayor será el tiempo de elución pero menor será la concentración alcanzada (Thitiyanaporn y col., 2012).

Las cantidades liberadas en las primeras 24 horas fueron mayores que las logradas en los siguientes días, atribuyéndole está característica a la liberación del antibiótico de la superficie de las perlas.

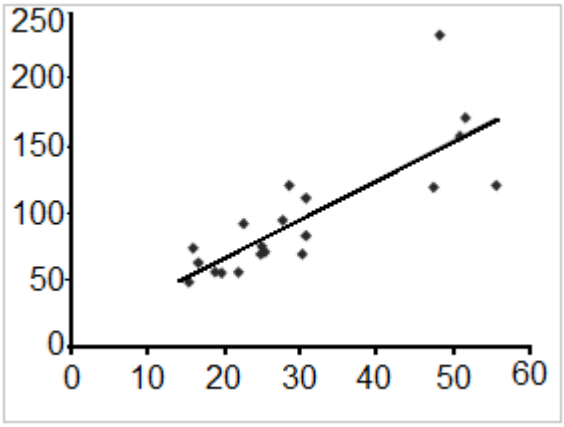


Fig. 2. Liberación total de ceftazidina (mg): peso del sulfato de calcio vs porosidad del sulfato de calcio (%). Modificado de Thitiyanaporn y col., 2012.

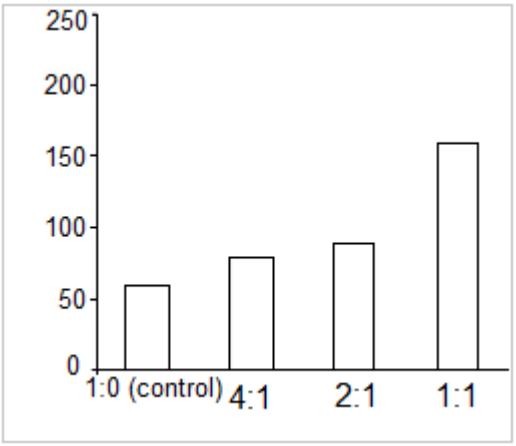


Fig. 3. Liberacion de ceftazidime (mg): peso de las perlas de sulfato de calcio vs sulfato de calcio hemihidratado. Modificado de Thitiyanaporn y col., 2012.

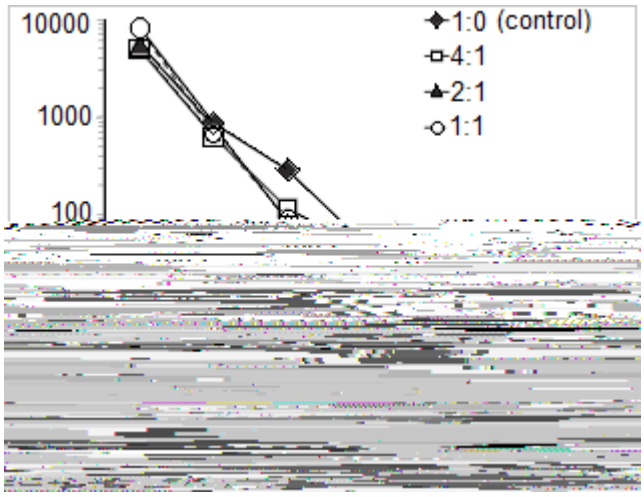


Fig. 4. Log de la concentración de ceftazidime ($\mu g/ml^{-1}$) vs tiempo en días. Modificado de Thitiyanaporn y col., 2012.

C)

C) Radiografía tomada a las 6 semanas. Se observa una completa reabsorción de los pellets y la formación de nuevo hueso en todo el defecto. Modificado de Osteoset® T

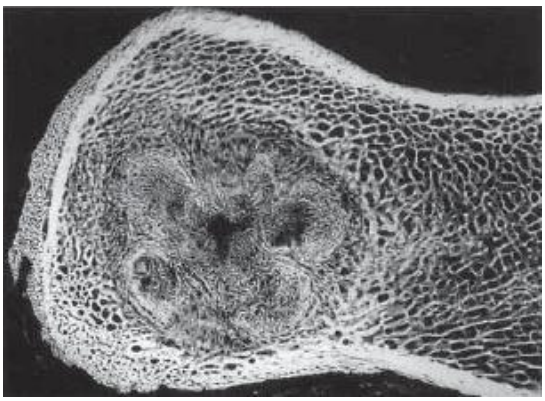


Fig. 6. Formación de nuevo hueso en forma de laminillas concéntricas. Modificado de Osteoset® T.

Como se mencionó, la porosidad del SC es una característica que hace variar la liberación del antibiótico, la tasa de elución, la carga de antibiótico y el tiempo en ser absorbido. Pero, además de la porosidad, existen otras características que también influyen en la liberación del antibiótico y estas son: el tamaño de las perlas y el contenido de las perlas. Esto se muestra en un estudio *in-vivo*, donde se utilizaron perlas de SC de dos tamaños diferentes (3 mm y 4,8 mm) y se les incorporó vancomicina, tobramicina y ambos juntos. Los resultados, dieron mayores tasas de elución de las perlas de mayor tamaño (2,3 mg/día vs 1,3 mg/día). Las perlas de 4,8 mm cargadas con vancomicina, mantuvieron la elución por 20 días comparado a los 10 días para las perlas de 3 mm. Sin embargo, las perlas de menor tamaño alcanzaron concentraciones 3 veces superiores a las logradas por las perlas de mayor tamaño en las primeras 48 horas, cayendo a niveles cercanos a cero al día 4. Cuando se utilizó la combinación de antibióticos, la presencia de tobramicina extendió la elución de la vancomicina hasta el día 40 (Roberts y col., 2014).

En otro estudio, fueron evaluadas la influencia de las formas del SC (cilindros o perlas) y la envoltura con submucosa de intestino delgado de cerdo (SIC), en la cantidad de antibiótico liberado de las mismas y de PPMM, cargadas éstas y el SC con iguales cantidades de gentamicina (50 mg/g o 5%). Se dividieron en 7 grupos: 1- PPMM, 2- cilindros de SC sin cubierta, 3- cilindros de SC con 4 capas de SIC, 4- cilindros de SC con 8 capas de SIC, 5- esferas de SC sin cubierta, 6- esferas de SC con 4 capas de SIC, y 7- esferas de SC con 8 capaz de SIC. La presencia de SIC aumentó el tiempo de elución de ambas formas del SC, siendo las concentraciones alcanzadas en todo momento, mayores a las logradas por las PPMM para cualquiera de las formas del SC. Además, cualquiera de las formas del SC liberó más gentamicina que las PPMM. Las concentraciones para cualquier grupo de SC y PPMM se mantuvieron por encima de 1µg/ml en todo el período de estudio (42 días). Según los autores, envolver con SIC al SC, minimiza el efecto de la porosidad y en conclusión, disminuye la elución del antibiótico aumentando la cantidad liberada del mismo de las esferas y cilindros, manteniendo concentraciones por encima de la CIM para la mayoría de los organismos (Seddighi y col., 2007).

9.2.3 PROPIEDADES DEL SULFATO DE CALCIO

9.2.3.1 PROPIEDADES REGENERATIVAS

El SC utilizado como sustituto óseo, es absorbido por disolución entre seis a ocho semanas, dependiendo del volumen y del sitio de implantación. A pesar de que no se han descrito en detalle los posibles mecanismos con los que el SC promueve la regeneración y reparación ósea, existen explicaciones y observaciones de diferentes autores que consideradas en conjunto, pueden explicar su acción (Lopez y Alarcon, 2011).
Strocchi y col., (2002), crearon defectos óseos en la tibia de conejos, que fueron llenados con gránulos de SC. La densidad microvascular se incrementó en los defectos tratados con SC, lo que sugiere un efecto positivo sobre la angiogénesis, necesaria para promover la regeneración ósea. Además, donde se implantó el SC, se observó un aumento de las concentraciones de las proteínas morfogénicas óseas BMP-2, BMP-7, factor de crecimiento transformante-b (TGF-b) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), todos los cuales desempeñan un papel en la regeneración del tejido conjuntivo (Walsh y col., 2003), dándole al SC un papel más activo en proceso de osteogénesis.

El SC cuando es degradado, produce una disminución local en el pH, llevando a una desmineralización de las paredes del defecto con liberación de factores de crecimiento óseo. Estudios indican que hay una mayor expresión de proteína morfogénica ósea BMP-2, BMP-7, el TGF-beta y PDGF-BB en defectos óseos cuando sulfato de calcio se utiliza como injerto de hueso. Todos estos factores de crecimiento estimulan la formación y el desarrollo de hueso nuevo (Lazary y col., 2007; Podaropoulos y col., 2009)

Aunque los iones inorgánicos suficientes para la reparación de los defectos puedan ser proporcionados por la reabsorción osteoclástica del hueso en los bordes de los

defectos, esto puede no ocurrir cuando el defecto es grande y la pérdida de hueso es extensa. En estos casos, el injerto de SC podría acelerar la cicatrización permitiendo la presencia de osteoblastos funcionales y la producción suficiente de matriz orgánica (Lopez y Alarcon, 2011).

Una vez implantado el SC, éste es disuelto en iones de calcio y sulfato. Los iones de calcio se combinan con los iones fosfato a partir de los fluidos del cuerpo para formar fosfato de calcio, formando una red osteoconductiva de apatita biológica que estimula el crecimiento óseo en el defecto. Un estudio de espectroscopia infrarroja mostró que el nuevo material depositado es principalmente hidroxiapatita carbonatada, que es similar a la apatita presente de forma natural en el hueso (Coetzee 1980)**.**

Coetzee (1980), afirmó que para cada molécula de SC absorbida, una molécula de hidroxiapatita era depositada en el área local, proveyendo el SC iones inorgánicos que estimulan el crecimiento óseo, siendo ésta la teoría más palpable para explicar la característica osteoconductiva.

Además, el SC para promover la regeneración ósea guiada, fue evaluado por Pecora y Col., (1997)**.** Los autores emplearon defectos óseos quirúrgicos bicorticales en el ángulo de la mandíbula de ratas. En las cavidades de prueba se colocaron discos de sulfato de calcio pre endurecidos como barreras para cubrir los defectos, permaneciendo las cavidades control descubiertas. Los periodos de análisis fueron de 3, 9, 18 y 22 semanas postoperatorias. La evaluación microscópica demostró que en 3 semanas postoperatorias, todas las cavidades cubiertas con la barrera de SC se mostraron total o parcialmente reparadas por tejido óseo. En los periodos tardíos, la mayor parte de las cavidades experimentales se encontraba rellena de hueso. El grupo control, sin embargo, mostró ausencia de formación ósea en 3 y 9 semanas postoperatorias y reparación ósea parcial en 18 y 22 semanas postoperatorias. Los autores concluyeron que el SC fue efectivo como barrera, impidiendo el crecimiento de tejido conjuntivo para el interior de las cavidades, posibilitando la neoformación ósea.

9.2.4 SULFATO DE CALCIO COMO TRANSPORTADOR DE ANTIBIÓTICOS.

Las propiedades del sulfato de calcio como transportador de antibiótico para el uso en infecciones de hueso y otros tejidos fueron estudiadas por varios autores, encontrando que este método era eficiente en el tratamiento de las infecciones músculo esqueléticas. (Lillo y Peltier, 1955; Nelson y col., 2002; Turner y col., 2005)

Varios antibióticos fueron utilizados en este tipo de transportador, pero la tobramicina es el antibiótico más utilizado para este tipo particular de material siendo estudiada por varios autores (Nelson y col., 2002; Turner y col., 2005; Antoci y col., 2007).

Nelson y col., (2002), utilizaron pellets de SC en conejos, para la administración de antibióticos en una osteomielitis inducida con *Staphylococcus aureus.* El grupo tratado con pellets de SC y 10% de tobramicina tuvo un 84,6% (11/13) de éxito en la erradicación de la infección en comparación con el 41,6% (5/12) de éxito en los

animales a los que solamente se les había realizado el desbridamiento. Además, para comparar la efectividad de los pellets de SC, otro grupo fue tratado con pellets placebo y tobramicina administrada intramuscular, con un éxito de 35,7% (5/14) en la erradicación de la infección. Los animales tratados solamente con pellets placebo tuvieron un éxito de 23% (3/13). El grupo tratado con pellets con 10% de tobramicina, alcanzo una concentración en suero de 5,8 µg/ml luego de 3 horas de implantado el pellet, siendo indetectables a las 24 horas. El grupo con pellets placebo y tobramicina intramuscular, alcanzo concentraciones en suero de 7,82 µg/ml luego de una hora post implantación, promediando para todo el período de tratamiento 4,18 µg/ml. Las concentraciones logradas con los pellets de SC en el exudado de la herida, fueron de 11,9 mg/ml, disminuyendo a 2,5 µg/ml en el día 7. En el estudio, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio sérico para ninguno de los grupos. Los autores concluyeron que los pellets de sulfato de calcio con tobramicina son transportadores biodegradables efectivos para el tratamiento local de infecciones musculo esqueléticas, observándose además, que en los grupos tratados con pellet, hubo un incremento en la formación de hueso en el sitio de la lesión sobre el grupo control.

Turner y col., (2005), examinaron la seguridad de los pellets de sulfato de calcio con 10% de tobramicina en un modelo canino con dosis equivalentes a las máximas prescriptas en humanos (10mg/kg) y mayores (1.8 veces la dosis máxima) a las prescriptas en humanos. Para los caninos, la conversión da como resultado 20mg/kg y 36 mg/kg respectivamente. Las concentraciones locales del antibiótico permanecieron terapéuticas por 14 días pero, fueron sub-terapéuticas a los 28 días. Los niveles sistémicos del antibiótico alcanzaron su pico de concentración a la hora luego del implante y sus valores fueron de 30.3 mcg/ml y 46.7 mcg/ml y fueron indetectables a las 24 horas. Localmente, a la hora de colocado el implante, se alcanzaron concentraciones de 1099 µg/ml y 5527 µg/ml respectivamente. Para el día 14, las concentraciones eran de 2,6 µg/ml y 4,5 µg/ml. No hubo incremento en el calcio sérico y el examen de riñones, pulmones, hígado y hueso esponjoso no reveló efectos adversos por el uso de tobramicina o sulfato de calcio.

Otro estudio realizado por Turner y col., (1998), utilizó pellets impregnados con 2% y 4% de su peso con tobramicina en humeros de perros. Los niveles sistémicos tuvieron un pico a la hora siendo de 1,8µg/ml y 3,6µg/ml para las concentraciones de 2% y 4% respectivamente y fueron indetectables a las 24 horas. Los niveles en el tejido alcanzaron una media de 1964µg/ml (2%) y 3297µg/ml (4%) a la hora. Para el día 14, los niveles tisulares eran de 2 µg/ml (2%) y 4 µg/ml (4%) y fueron mayor que 0,1 µg/ml por hasta 28 días.

Fig. 7. Radiografías seriadas del defecto bilateral en el humero de un canino, muestra la reabsorción progresiva de los pellets de sulfato de calcio y su reemplazo con nuevo hueso. (A) Radiografía post implante. (B) 7 días luego del implante. (C) 14 días luego del implante. (D) 28 días post implante. Se observa la reabsorción de los pellets y los defectos medulares rellenos con hueso nuevo.

Modificado de Turner y col., (2005).

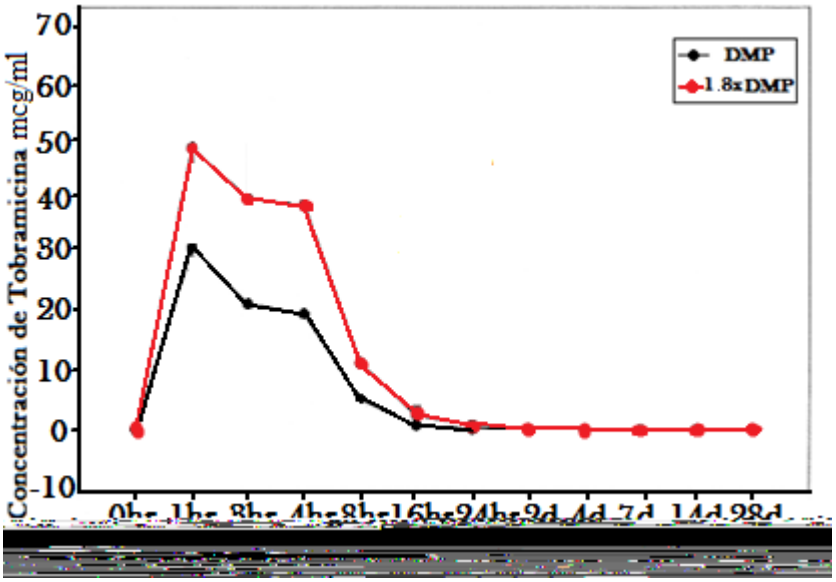


Fig. 8. Niveles séricos de tobramicina. hr = horas; d = días; 0 hr = inmediatamente luego del implante; DMP = 20 mg/kg; 1.8 × DMP = 36 mg/kg. (DMP= dosis máxima prescrita). Modificado de Turner y col., (2005).

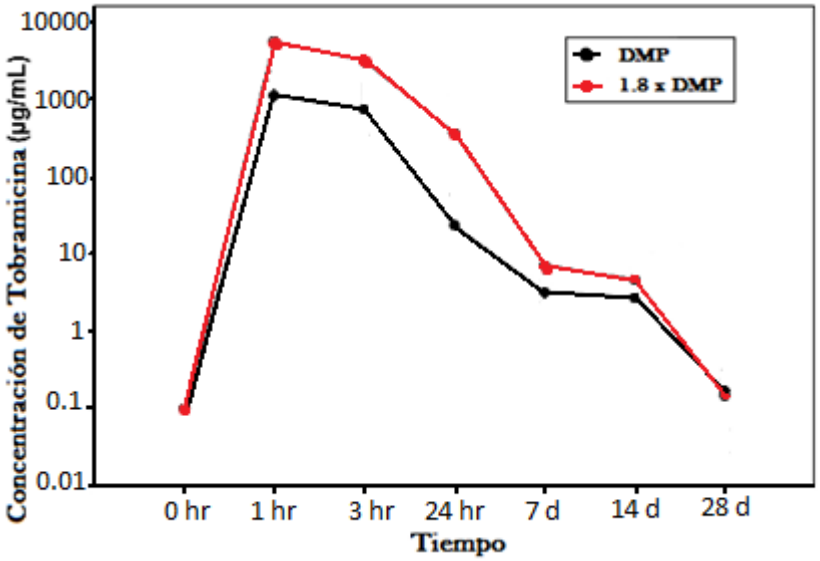


Fig. 9. Concentración local de tobramicina. hr = horas; d = días. 0 hr = inmediatamente luego del implante; DMP = 20 mg/kg; 1.8 × DMP = 36 mg/kg. (DMP= dosis máxima prescrita). Modificado de Turner y col., (2005).

El SC también fue utilizado en un estudio *in-vivo* por Thomas y col., (2005), en el que se creó un defecto óseo en la metáfisis de la tibia de cabras y se contaminó con 5x10 UFC (unidades formadoras de colonias) de *Staphylococcus aureus.* Se separaron en dos grupos; uno negativo, separado en dos; uno sin tratamiento y al otro se le implantaron injertos óseos sintéticos. Al segundo grupo, el positivo, también se dividió en dos; uno recibió cemento con tobramicina y el otro implantes de SC con tobramicina. Luego de 3 semanas se tomaron muestras microbiológicas óseas. Las muestras fueron positivas en 11 de 12 animales del grupo sin tratamiento, y en todos los animales con los injertos óseos sintéticos. En los grupos tratados con antibiótico, no se encontraron bacterias. Los autores concluyen que el SC es efectivo en prevenir la infección en un sitio contaminado, y que este material es útil para reducir el número de cirugías y el tiempo de recuperación, gracias a las propiedades de ser absorbible y osteoconductor.

9.2.5 PREPARACIÓN DE IMPLANTES DE SULFATO DE CALCIO CON ANTIBIÓTICO (Gitelis & Brebach, 2002)

Para el preparado de las perlas de sulfato de calcio con antibiótico hay dos kits uno de fraguado rápido y otro de fraguado standard. Ambos contienen 25 gramos de sulfato de calcio en polvo, pero el de fraguado rápido, además de tener 7,8ml de diluyente, tiene un acelerador que lo hace endurecer más rápido.

Teniendo presente, que la vancomicina acelera el curado de la mezcla, la misma se debería usar con el kit de fraguado standard, mientras que la tobramicina retarda el curado, debiendo utilizarse con el kit de fraguado rápido.

Para el preparado, se mezcla 1 gramo de vancomicina o 1,2 gramos de tobramicina en polvo con el diluyente. Con estas proporciones, se obtienen en las perlas concentraciones de 3,64% y 4,25% respectivamente.

Una vez hecha la mezcla, se coloca la misma en el polvo de sulfato de calcio y se deja hidratar por 30 segundos para luego mezclar bien con la ayuda de una espátula.

Fig. 10. Llenado del molde inferior de silicona con la mezcla de sulfato de calcio y antibiótico. De esta manera se obtienen 30 perlas de 7mm de diámetro por molde.

Fig. 11. Colocación de la parte superior del molde aplicando un poco de presión sobre el mismo.

Fig. 12. Retiro de las perlas del molde. Se espera a que cure la mezcla, proceso que demora 30 minutos.

Fig. 13. Perlas de sulfato de calcio.

Estos kits no están disponibles en Uruguay. Lo que encontramos a disposición es el polvo de sulfato de calcio como yeso de Paris, en presentaciones de 1 Kilo. A este se le adiciona la cantidad de antibiótico en polvo deseado y luego se hace la mezcla con agua, o se mezcla con antibiótico líquido suplantando el agua, hasta obtener la consistencia deseada.

9.3 FOSFATO DE CALCIO / HIDROXIAPATITA

El fosfato de calcio o hidroxiapatita, también es otro material absorbible que ha sido estudiado para el uso como transportador de antibióticos en forma local (Ethell y col., 2000; Gbureck y col., 2002; Joosten y col., 2004; Schnieders y col., 2006)

El cemento de hidroxiapatita implantado entre el hueso y el subcutáneo es absorbido y tiene propiedades osteoconductoras en el hueso (Costantino y col., 1991). Es fabricado con agua la que puede ser reemplazada con una droga antimicrobiana en estado líquido, eliminando la preocupación de implantar liquido en vez de polvo al cemento (Cruz y col., 2006). El fosfato de calcio puede ser mezclado con varios antibióticos, sin embargo se puede observar un debilitamiento de su estructura luego de la incorporación de los antibióticos (Gbureck y col., 2002; Joosten y col., 2004), debido a una interacción entre la droga y la reacción de fraguado luego de la absorción de las moléculas de la droga (Takechi y col., 1998; Gbureck y col., 2002).

Este material fue utilizado con éxito en el tratamiento de infecciones. Joosten y col. (2004), comprobaron el beneficio del uso de hidroxiapatita con gentamicina en el tratamiento de la osteomielitis inducida con *S. aureus,* al verificar que luego de 7 días de implantada en la médula de los animales, no existían rastros de infección. En este estudio, se utilizó una mezcla de hidroxiapatita y gentamicina en proporciones de 32 mg de gentamicina por gramo de hidroxiapatita (3,2% de antibiótico).

No todos los antibióticos parecen ser adecuados para su uso con este sistema. Así lo muestra un estudio *in-vitro*, donde la gentamicina, amikacina y el ceftiofur fueron los antibióticos utilizados, mostrando que la amikacina y la gentamicina presentaban buenos perfiles de liberación, en comparación con el ceftiofur, que no mantuvo las mismas características de elución luego de 7 días (Ethell y col., 2000).

Shirlliff y col., (2002), probaron varios métodos para erradicar una infección en conejos causada experimentalmente por *Staphylococcus aureus*. En el estudio se logró causar una osteomielitis localizada a proximal de la tibia. La hidroxiapatita cargada con antibiótico se formuló cargando 4 gramos de vancomicina a 40 gramos de polvo de hidroxiapatita (10% de antibiótico).
Los animales infectados fueron separados en 8 grupos, los que fueron sacrificados a las 6 semanas luego de la infección. El grupo 1(n=26) compuesto por animales infectados, se dejó sin tratamiento alguno. Al grupo 2 (n=12) se les realizó desbridamiento a las 2 semanas luego de la infección. Al grupo 3 (n=8) se les realizó desbridamiento y vancomicina subcutánea por 4 semanas a dosis de 30 mg/kg cada 12 horas administradas 2 semanas post infección. Al grupo 4 (n=11) se les administró vancomicina subcutánea a 30 mg/kg cada 12 horas por 4 semanas luego de 2 semanas de la infección. Al grupos 5 (n=10) se le implantó hidroxiapatita sin antibiótico en el espacio muerto creado por desbridamiento luego de 2 semanas de la infección. Al grupo 6 (n=8) se le implantó hidroxiapatita sin antibiótico, pero se le administró vancomicina subcutánea a dosis de 30 mg/kg cada 12 horas por 28 días luego de la cirugía de desbridamiento. El grupo 7 (n=12) recibió perlas de hidroxiapatita impregnada en vancomicina de diámetro menor a 6 mm implantadas en el espacio muerto luego de la cirugía de desbridamiento. Al grupo 8 (n=11) se les colocó perlas de polimetilmetacrilato de 6 mm de diámetro impregnadas con vancomicina colocadas en el espacio muerto luego de la cirugía de desbridamiento.
Se requirió un periodo de 4 semanas de tratamiento para cada grupo, a excepción del grupo 1. Al final del periodo de tratamiento se lograron en todos los aislamientos concentraciones inhibitorias mínimas igual o menores a 0,39 µg/ml.
La hidroxiapatita mostró una menor tasa de infección luego del tratamiento comparado con las otras modalidades de tratamiento, a excepción de las perlas de polimetilmetacrilato y el grupo 3 (vancomicina subcutánea solamente), con los que obtuvo resultados similares. En los grupos 5 y 6 se observó que las tasas de infección eran similares a los grupos no tratados. El grupo 7 y 8, tuvieron los menores porcentajes de infección, 18,2% y 30% respectivamente.
Las ventajas del uso de la hidroxiapatita, se reflejan en que no es necesaria una segunda cirugía para retirar los implantes, por ser absorbible, en contraste con las PPMM y, el menor tamaño utilizado de las perlas de hidroxiapatita. Estas perlas pudieron incrementar el área de superficie, aumentando la biodisponibilidad para la absorción del calcio de hidroxiapatita y la difusión del antibiótico.

Korkusuz y col., (1993), realizan un estudio induciendo una osteomielitis por *S. aureus* sensibles a la meticilina en tibia de ratas, donde introducen en la médula una aguja de acero inoxidable a modo de implante metálico, colocando a las 7 semanas de la inoculación bacteriana un implante de hidroxiapatita con gentamicina. Los resultados muestran una respuesta terapéutica eficaz, tanto desde el punto de vista radiológico, histopatológico e infeccioso, sin necesidad de retirar el implante metálico, si lo comparan con las otras terapias empleadas en el estudio: gentamicina intraperitoneal, desbridamiento quirúrgico y desbridamiento en combinación con PMM con gentamicina. Además, la combinación gentamicina-hidroxiapatita produjo concentraciones 20 veces más altas en el hueso que la gentamicina intraperitoneal y 2,5 veces más elevada que el PMM con gentamicina, a parte de una liberación más prolongada.

Para mejorar los perfiles de liberación, este transportador puede ser acoplado o mezclado en diferentes maneras, según el resultado que se desee. De esta manera, Schnieders y col., (2006) reportaron que la micro encapsulación de la gentamicina en micro esferas biodegradables de polilactida-co-glicolida (un polímero sintético biodegradable), antes de la mezcla del cemento puede prevenir la interacción negativa entre el antibiótico y el cemento, ofreciendo un mejor control sobre la liberación de la droga. El fosfato de calcio mostró ser capaz de cargar con un 30% de su peso en droga sin comprometer las propiedades mecánicas, demostrando un bajo nivel inicial de liberación y una liberación sostenida de gentamicina sobre un período de 100 días. Además, Sasaki e Ishii (1999) estudiaron el uso de implantes compuestos por un bloque de fosfato cálcico que lleva en su interior otro bloque constituido por L- polilactida (L-PLA), fosfato cálcico y gentamicina. Los autores justifican la presencia exterior de fosfato cálcico como un material con mejores propiedades osteoinductoras que el PLA y sus copolímeros. Las concentraciones de gentamicina alcanzadas *in-vitro* e *in-vivo* resultaron eficaces para prevenir el desarrollo de osteomielitis e inducir la formación de hueso en un modelo experimental desarrollado en conejos.

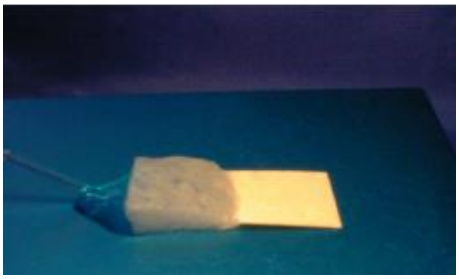
9.4 HUESO MOLIDO/INJERTOS DE HUESO

El hueso molido es hueso cortical molido hasta ser transformado en polvo.

Los antibióticos pueden ser adicionados al polvo de hueso o el injerto puede sumergirse en una solución cargada de antibiótico siendo este absorbido directamente a la superficie del hueso (McLaren, 2004).

Antibióticos como la netilmicina, vancomicina, clindamicina y rifampicina también fueron estudiados para ser utilizados en hueso molido como transportador en pruebas *in-vitro* e

A)



B)

C)

Fig. 14. Diferentes presentaciones del colágeno. A) Matriz de colágeno desarrollada para inmovilizar droga. Preparada por compresión térmica a 0.3mm. Se observa un empapado espontáneo de una solución con droga, aumentando luego de 3 segundos entre 5 y 8 cm. B) Tubos de colágeno. C) estructura en base a colágeno conteniendo una parte altamente absorbente y otra levemente absorbente (Ruszczak y col., 2000a**;** Ruszczak y col., 2000b).

La liberación de la droga *in-vivo* se da por ruptura enzimática natural de la matriz de colágeno (Radu y col., 2002), por la acción de una serie de enzimas proteolíticas presentes en las células inflamatorias como los granulocitos y macrófagos (Chavpil, 1979; citado por Khan y col., 2011), y por difusión de la misma, implantada o inyectada como tal, o polimerizada luego de la inyección intra-tisular (Stemberg y col., 1997), dependiendo su liberación, de la porosidad de su matriz y el tratamiento químico (Rao, 1995; Ruszczak y col., 2000a) o físico que reciba (Ruszczak y col., 2000a).

De esta manera comienza un proceso de degradación, que se inicia al momento del implante, pero varía entre individuos. La tasa en la cual el colágeno es absorbido in-vivo, depende del grado de enlaces que presente y del sitio de implante. Los enlaces del colágeno con glicosaminoglicanos (GAGs), hacen al colágeno más resistente a la degradación por las colagenasas que aquellos colágenos libres de GAGs, por lo

tanto, la tasa de degradación disminuye a medida que aumenta en contenido en GAGs (Yannas, 1988; citado por Khan y col., 2011).

Otra manera de disminuir la velocidad de absorción sin perder su biocompatibilidad, es creando enlaces con glutaraldehido en diferentes concentraciones (0.01%, 0.05% y 3%) (Khan y col., 2011).

9.5.1.1 COLÁGENO COMO TRANSPORTADOR DE ANTIBIÓTICO

Para su uso como depósito local de antibiótico, se buscan ciertas características, como mantener la concentración local lo más alta posible, no siendo toxica y sin alcanzar efectos sistémicos (Ruszczak y col., 2003). Esto, se puede lograr por la incorporación física y química de la droga dentro de la matriz de colágeno en el proceso de manufacturado, logrando la inmovilización de la droga a través de enlaces a los grupos carboxilos o aminos libres entre la molécula del colágeno y la droga.

Chvapil (1979), citado por Ruszczak y col. (2003), mostró el beneficio del uso de la esponja de colágeno al inyectar una solución de tetraciclina subcutánea, alcanzando ésta, una concentración máxima en suero luego de 3 horas, que lentamente descendía en las próximas 20 horas. Cuando la misma cantidad de solución de tetraciclina fue incorporada por absorción en una esponja de colágeno e insertada en una cavidad natural, la liberación de la droga fue detectada por un período de 14 días, resultando en una concentración relativamente constante.

Según Wachol-Drewek y col., (1996), si es necesario un implante profiláctico contra la infección de una herida por un período de 24 a 48 hs, las esponjas de colágeno con antibiótico son el material a utilizar. Sin embargo, cuando el tratamiento en un área infectada debería asegurar una concentración de antibiótico por 5 a 10 días, ni el colágeno inmerso en solución antibiótica o las esponjas de colágeno cargadas con gentamicina son aplicables.

Esto cuestionaría el uso del colágeno para el tratamiento de las infecciones ya establecidas, aunque otros estudios mostraron que su uso para controlar y erradicar las infeccione no solamente era posible, sino que hasta comparable con los resultados que se obtenían con el uso de PMM. Así lo muestra un estudio realizado por Ipsen y col., (1991), donde se colocaron 10 esponjas de colágeno en pacientes humanos con osteomielitis crónica, realizándoles un seguimiento por un año. En ese período de control, no se observó la recurrencia de la infección. Además, se observó que la liberación de la gentamicina fue más completa y rápida en comparación a las PPMM y las concentraciones de antibiótico alcanzadas en los exudados de la herida, eran mucho mayores comparadas a las logradas con las PPMM. Otro estudio que comparaba el uso de las esponjas de colágeno y el uso del PMM en el tratamiento de una osteomielitis, apoyaba lo anteriormente mencionado. En este estudio, se mostró que los resultados clínicamente no diferían entre el uso de uno u otro transportador, teniendo resultados del 80% y 90% de efectividad en la erradicación de la infección, para el colágeno y el PMM respectivamente. Las diferencias se encontraban en las concentraciones en el exudado alcanzadas a las 48 horas por la esponja de colágeno, las cuales eran mucho mayores que las alcanzadas por el

PMM. En suero, las concentraciones logradas por la esponja, si bien eran detectables, estaban muy por debajo de los niveles tóxicos para el antibiótico, mientras que para el PMM, las concentraciones séricas fueron indetectables. (Letsch y col., 1993).

El uso de la esponja de colágeno para el tratamiento de las osteomielitis, se recomienda cuando los defectos son chicos y la infección se pueda erradicar con un solo procedimiento quirúrgico, mientras que para defectos óseos grandes, el uso de PPMM es más indicado (Letsch y col., 1993).

Algunos estudios *in-vitro,* mostraron que la liberación de antibióticos desde la esponja era muy rápida como para ser utilizada en la clínica, comparable a la administración de gentamicina en solución salina (Sorensen y col., 1990). Sin embargo, estudios *in-vivo* apoyan esta modalidad terapéutica combinada con la terapia sistémica y el desbridamiento quirúrgico. Se ha demostrado en ratas con heridas superficiales, la liberación constante de gentamicina o amikacina por 3 días, prácticamente logrando la supresión de una infección experimental con Pseudomonas (Grzybowski y col., 1997).

Por otro lado, un estudio en conejos (Mehta y col., 1996), mostró que la concentración de gentamicina liberada de los implantes de colágeno implantados en tejido muscular (dosis de 3 mg/kg), luego de 4 horas de la implantación, era de 3800 µg/ml. Los niveles locales, cayeron a 6,90 +/- 5,22 µg/ml a las 24 horas y luego siguieron disminuyendo hasta el día 28 en que las concentraciones eran de 2,70 +/- 1,75 µg/ml. Los niveles séricos alcanzaron un promedio en el pico de 4.04 +/- 1.75 µg/ml a las 5 horas luego de la implantación, cayeron luego de las 24 horas y para el día 28 fueron menores a 0.41 +/- 0.20 µg/ml. Probando de esta manera, que las esponjas de colágeno con gentamicina, son transportadores degradables efectivos, aportando localmente concentraciones por encima de la CIM y niveles séricos por debajo de los asociados con toxicidad por 28 días luego de su implantación.

9.5.1.2 CARACTERÍSTICAS DE ELUCIÓN

La liberación de la droga, se debería caracterizar por una rápida liberación en la fase inicial de implantación, seguido de una concentración alta y constante por un periodo de tiempo definido (Wachol-Drewek y col., 1996) y una fase final en la cual la droga disminuya sus niveles rápidamente como se muestra en la figura 17.

Varios estudios mostraron que la liberación de las esponjas ocurre en las primeras horas y su descenso también ocurre muy rápido, dentro de 24 a 48 horas, cuando los implantes son utilizados en articulaciones (Ivester y col., 2006; Hayes y col., 2013), notando que se producía una marcada respuesta inflamatoria que persistía al menos por 5 días luego de la implantación subcutánea, intramuscular (Takechi y col. 1998; Gbureck y col., 2002) e intra-articular (Hayes y col., 2014)

Hayes y col., (2013) investigando la farmacocinética de la esponja de colágeno implantada en la articulación de la rodilla en caninos, utilizando gentamicina a dosis de 6 mg/kg, identificó que el pico de concentración intra sinovial de 2397 µg/ml, declinaba a concentraciones por debajo de la CIM luego de 23 horas post-implantación. La evaluación de la esponja de colágeno implantada, sugiere un rápido

descenso de la concentración de la gentamicina por debajo de la CIM, con la persistencia de inflamación asociada al colágeno, por varias semanas. Además, Ivester y col., (2006) investigando la liberación de antibiótico luego de implantar una esponja con gentamicina en la articulación tarsocrural de un equino con 0,26mg/kg, identificaron un pico en la concentración del fluido sinovial de 169 µg/ml, disminuyendo la concentración de gentamicina a niveles por debajo de la CIM luego de 48hs de la implantación de la esponja.

Dependiendo del contenido de colágeno, el tipo de manufactura y la combinación aplicada de las matrices, se pueden obtener diferentes características de liberación (Ruszczak y col., 2000b; Khan y col., 2011). Por ejemplo, variando la presión de compresión a igual temperatura y tiempo de compresión, se logran diferentes perfiles de liberación como se muestra en la figura 15.

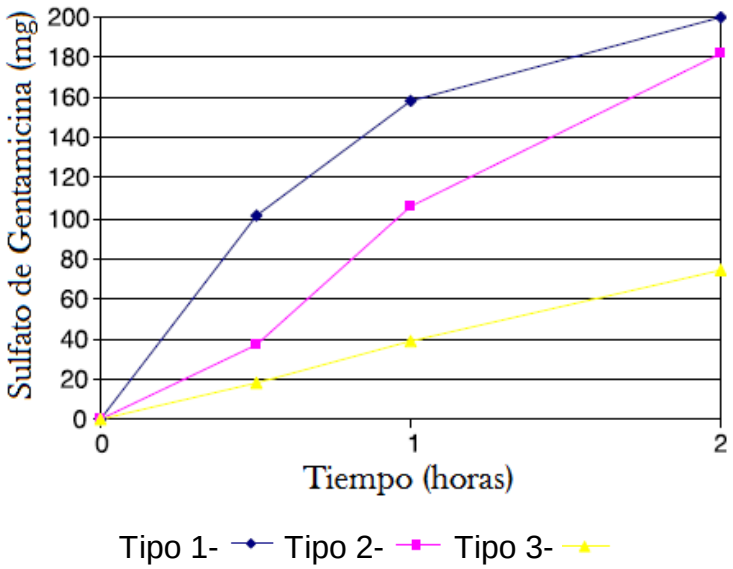


Fig. 15. Cinética de liberación *in-vitro* obtenida de 3 diferentes tipos de colágeno con gentamicina (conteniendo cada una dosis de 200 mg) manufacturadas con parámetros diferentes de presión. Tipo 1- 10.0 Kg/cm^2, Tipo 2- 2.5 Kg/cm^2, Tipo 3- (4x50) 2.5 Kg/cm^2: cuatro esponjas de colágeno con gentamicina (50 mg c/u) (Ruszczak y col., 2000b).

Los restrictores de difusión (barreras o diseños multicapas), sin cambiar los parámetros biológicos del colágeno como transportador, son un gran avance desde que se logró evitar las modificaciones químicas del colágeno o la droga. La tecnología permite crear matrices de colágeno presentando diferente permeabilidad, porosidad, tiempos de absorción de fluidos, humectación y característica de liberación de droga (Antiszko, 1996; Ruszczak y col., 2000 b). (Fig. 14).

Es importante destacar que el uso de la compresión térmica a altas temperaturas y altas presiones no afecta negativamente la naturaleza del colágeno y sus principales funciones biológicas (capacidad de acoplamiento de las plaquetas, crecimiento celular *in-vitro*). El perfil de liberación de la droga es modificado significativamente pudiéndose alcanzar un perfil de liberación casi lineal (Fig. 16). Esta tecnología se

ha aplicado para el desarrollo de matrices basadas en colágeno obteniéndose cinéticas de liberación específicas. Otra posibilidad, es preparar membranas de colágeno, las que al absorber fluidos, las mismas se expandan obteniendo una forma tridimensional similar a una esponja (Ruszczak y col., 2000a**).** A estas matrices se les puede incorporar droga, ya que pueden ser pre-fabricadas, cargadas y fabricadas en condiciones de esterilidad.

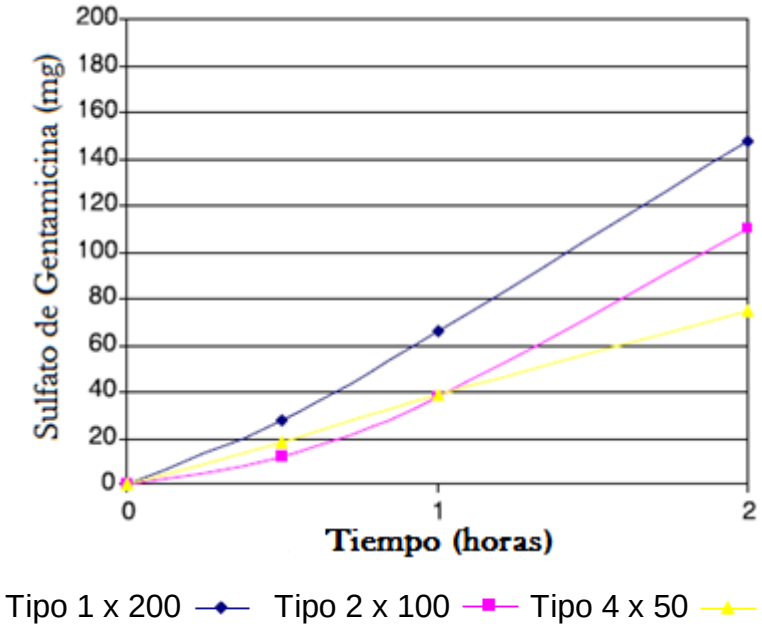
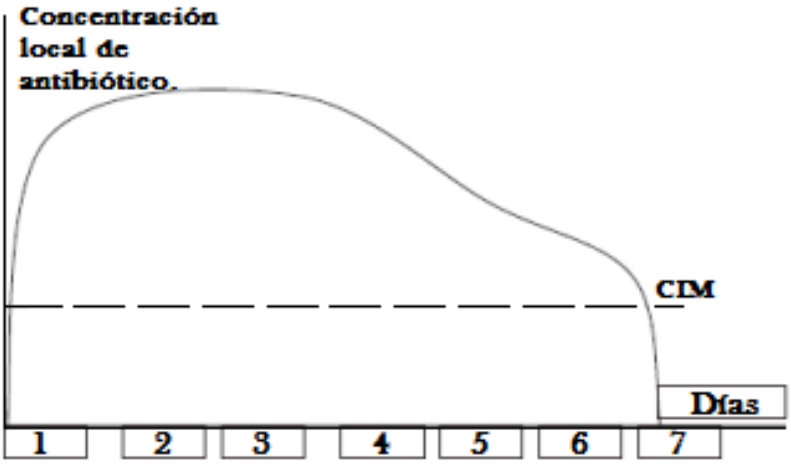


Fig. 16. Cinética de liberación *in-vivo* obtenida de 3 diferentes productos de colágeno con gentamicina (conteniendo una dosis de 200 mg cada una) fabricados por compresión térmica (igual presión, tiempo y temperatura) utilizando una barrera adicional (barrera de liberación) hecho de colágeno plano. Tipo 1 x 200 – esponja de colágeno cubierta por una barrera; Tipo 2 x 100 – 2 esponjas de colágeno con gentamicina (100 mg c/u) cubiertas por una barrera de difusión; Tipo 4 x 50 – cuatro esponjas de colágeno con gentamicina (50 mg c/u) cubiertas por una barrera de difusión. (Ruszczak y col., 2000 b.)



Modificado de Ruszczak y col., 2003

Fig. 17. Modelo propuesto para un perfil de liberación de antibiótico óptimo *in-vivo* (“tipo minivan”) basado en una liberación rápida inicial, asegurando altos niveles locales, siendo constante por un periodo de tiempo aproximado de 7 días, con una fase final de rápido descenso de la dosis.

9.5.1.3 ESPONJAS DE COLÁGENO

Las esponjas de colágeno utilizadas para el depósito local de antibióticos fueron diseñados para garantizar una cinética específica y prevenir el potencial desarrollo de resistencia. El carácter único de la matriz de colágeno tiene ciertas ventajas, logrando proveer una liberación del antibiótico rápida y prolongada.

- Presenta una liberación inicial rápida de la droga, inmediatamente luego de la implantación en el tejido.
- En forma secundaria, la droga adjunta a los poros es liberada.
- Luego, se libera la droga dentro de la estructura de colágeno.
- Cumple con la función de barrera “natural” manteniendo distancia entre la droga incorporada a la esponja y el ambiente alrededor, por ser una estructura tridimensional.
- Provee una red para que las células penetren y formen nuevo tejido.
- Su absorción es entre 4 a 10 semanas.

El diseño de la esponja y la incorporación de la droga por liofilización, permite una distribución uniforme de la droga dentro de la matriz de la esponja y asegura la aplicación de una dosis por centímetro cuadrado en la superficie a tratar (Fig. 18).

Fig. 18. Esponjas de colágenos impregnadas en antibiótico. Imagen cortesía del Dr. Carlos Rodriguez.

Las esponjas pueden ser esterilizadas con óxido de etileno, radiación gamma, radiación por haz de electrones y calor seco (Ruszczak y col., 2003; Khan y col., 2011). La irradiación es el método más frecuente de esterilización, ya que no parece afectar la estabilidad estructural. Estos métodos, utilizan dosis de aproximadamente 2.5 Megarads (2.500.000 rads) generalmente del cobalto-60. Sin embargo, con el óxido de etileno, las propiedades físicas y biológicas son afectadas debido a una reacción entre el óxido de etileno y el colágeno. De forma similar, el autoclave no se debe utilizar para esterilizar el colágeno, porque las proteínas hidratadas son lábiles a la desnaturalización térmica. Sin embargo, si el colágeno es cuidadosamente secado previo a ser calentado, su estabilidad aumenta y puede ser sometido a temperaturas de esterilización (Khan y col. 2011).

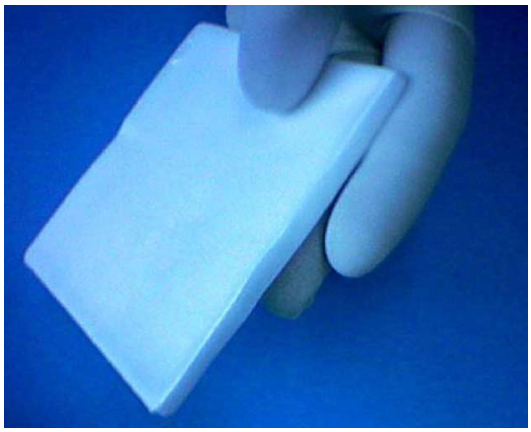


Fig. 19. Esponja de colágeno (200 mg de sulfato de gentamicina y 280 mg de colágeno fibrilar altamente purificado). Modificado de Ruszczak y col., (2003).

Las esponjas de colágeno son seguras, así lo muestra información recolectada de la farmacocinética de cerca de 1500 pacientes humanos, con infecciones relacionadas a tejido blando o hueso. Se mostró que la implantación quirúrgica de 1 a 5 esponjas, lo que corresponde a una dosis de 200 a 1000 mg de sulfato de gentamicina (dependiendo del tamaño de la herida, pero siempre manteniendo la misma cantidad de droga por centímetro cuadrado del área de la herida) genera muy altas concentraciones del antibiótico (170 - 9000 µg/ml) en el sitio de implantación, dependiendo del aporte vascular y la localización anatómica. Estos niveles de antibiótico son alcanzados dentro de las 24 horas luego de la implantación de la esponja y están muy por encima de los niveles establecidos para la CIM para los organismos sensibles a la gentamicina. Además, los niveles sistémicos de la gentamicina permanecieron por debajo de los niveles de toxicidad establecidos de 10-12 µg/ml para los valores pico y un poco por debajo de 2 µg/ml luego de las 24 horas para todos los pacientes evaluados (Ruszczak y col., 2003).

Un ejemplo de la liberación *in-vivo* e *in-vitro* se muestra en la figura 20.

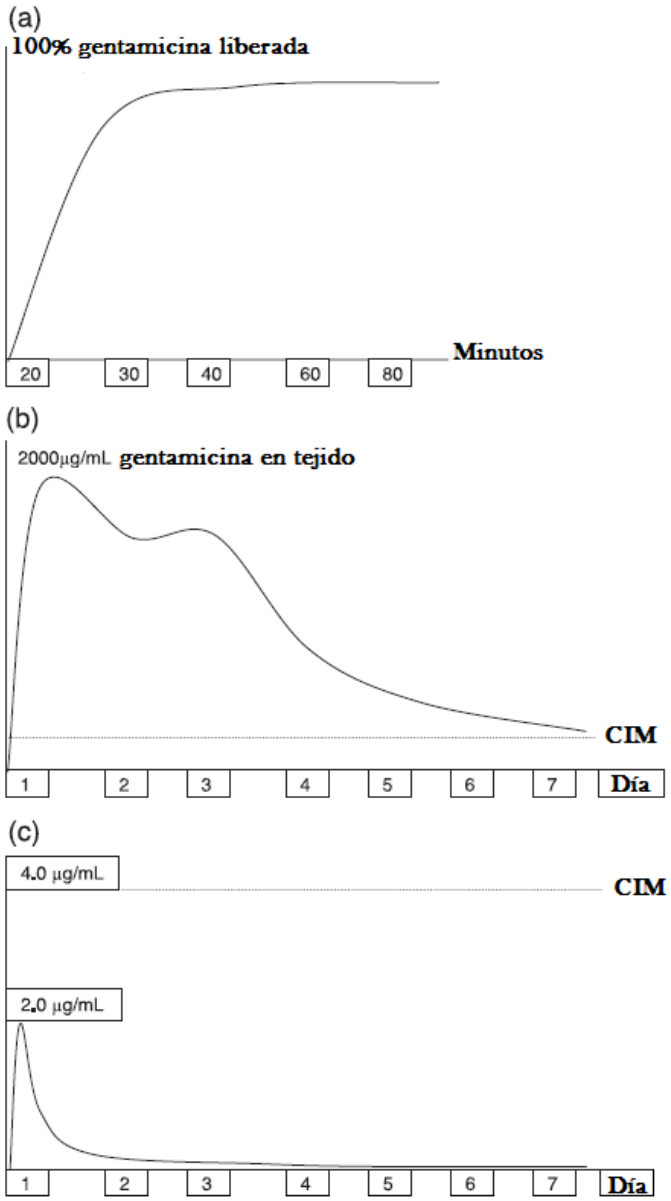


Fig. 20. Comportamiento de una esponja de colágeno *in-vitro* e *in-vivo*. a) Liberación *in-vitro* de la droga de una esponja de colágeno con gentamicina (200 mg gentamicina y 280 mg de colágeno). b) Concentración local de gentamicina en tejido blando luego de la implantación de 3 unidades de 200 mg de sulfato de gentamicina (dosis total 600 mg) y c) Concentración sérica luego de la implantación de 3 unidades de 200 mg de sulfato de gentamicina (dosis total 600 mg) en heridas abdominales posquirúrgicas. Modificado de Ruszczak y col., 2003.

Estas cinéticas de liberación no pueden ser alcanzadas utilizando la inyección local de la droga, o con la aplicación de antibiótico en polvo o perlas de polímeros cargados con droga. A pesar de las altas concentraciones luego de la administración *in-vivo* de las esponjas de colágeno con gentamicina, los niveles en suero no son significativos o terapéuticos (fig. 20 c), (Ruszczak y col., 2003).

La eficacia de la esponja de colágeno con gentamicina en la prevención y tratamiento de infecciones de tejido blando, es apoyada por la información de 661

pacientes humanos que recibieron tratamiento con la esponja de colágeno, primariamente por cirugías intra abdominales, infecciones de heridas posquirúrgicas o algún evento traumático. Aproximadamente el 40 % de los procedimientos quirúrgicos fueron limpio-contaminados o contaminados. En la mayoría de los casos se utilizaron de 1 a 3 esponjas (200 mg de gentamicina por esponja, correspondiendo de 200 a 600 mg de sulfato de gentamicina, 2 mg/cm^2 de esponja). Los resultados fueron a favor de los pacientes donde se usaron las esponjas (95,6%) comparado con aquellos que curaron por primera intención o sin evidencia de infecciones posquirúrgicas (72,5%) (Ruszczak y col., 2003).

Para cargar las esponjas de colágeno con antibiótico, estas pueden ser inmersas en una solución con antibiótico como es descrita por Wachol-Drewek y col., (1996) y Baar y col., (2001).

En un estudio realizado por Wachol-Drewek y col., (1996) comparando 5 antibióticos (sulfato de gentamicina, cefotaxime, ácido fusídico, clindamicina y vancomicina) incluidos en una esponja de colágeno preparada por inmersión, demostró que la droga era liberada completamente en 3 a 4 días si eran probados en un test de disolución adaptado. Solo en el caso del sulfato de gentamicina, la disolución continuaba hasta el día 7 impidiendo el crecimiento bacteriano sin importar el tipo de preparación utilizada (inmersa en una solución de antibiótico o esponja liofilizada).

Este tipo de liberación de la gentamicina no se puede atribuir solamente a la interacción iónica entre los grupos aminos de la gentamicina y los grupos carboxilos del colágeno, ya que ocurre la misma interacción entre la clindamicina y el cefotaxime, desempeñando estas drogas, un perfil de liberación en solamente 24 horas (Wachol-Drewek y col., 1996).

Existen varias maneras de aumentar el perfil de liberación en estos sistemas de depósito local utilizando colágeno.

- Aumentando el contenido de colágeno (hasta un 30%) para hacer la matriz más densa, disminuyendo su permeabilidad (Fujioka y col., 1995).
- Reticulando la matriz para hacerla menos permeable y más duradera (Minabe y col. 1989; Lesiak-Cyganowska y Sladowski. 2001; Angele y col., 2003)
- Cambiando la molécula de la droga haciéndola menos soluble en agua (Gericke y col. 1990)
- Utilizar materiales que restrinjan de difusión para prolongar la distancia de difusión o para crear una barrera de difusión (Ruszczak y col., 2000 a).
- Combinarlo con otros polímeros reabsorbibles (Stemberg y col., 1990).

Sripriya y col., (2004) sugirieron mejorar el perfil de liberación de estos sistemas utilizando colágeno succinilatado, el que crea enlaces iónicos con antibiótico con propiedades catiónicas, como la ciprofloxacina, para de esta manera restringir la difusión de la droga. Esto afirma que la liberación de la ciprofloxacina se corresponde con la naturaleza de la herida, en relación a la cantidad de exudado que se libera y es absorbido por la esponja.

También, Prabu y col., (2006) se enfocaron en alcanzar una liberación más sostenida del agente antimicrobiano y describió un vendaje hecho de colágeno y poli-caprolactona cargada con gentamicina y amikacina.

La esponja de colágeno puede ser combinada además, con antibióticos encapsulados en liposomas, aumentando el tiempo de liberación (Trafny y col., 1996).

9.5.1.4 MEMBRANAS Y HOJAS DE COLÁGENO

Las membranas y las hojas de colágeno, se fabrican a partir de las esponjas de colágeno, las que son sometidas a prensas con determinada presión, temperatura y tiempo, obteniéndose las membranas y hojas, cada una con sus diferentes propiedades y características. Dependiendo del contenido en colágeno de la esponja, la presión y temperatura que se aplique en la prensa, se obtendrá el espesor de la hoja o membrana. Las membranas de colágeno tienen un espesor de 0,1 mm y son formadas a partir de esponjas con 5% de colágeno. Por otro lado, las hojas de colágeno tienen un espesor de 0,6 mm y son formadas a partir de esponjas con 30% de colágeno. (Ruszczak y col., 2000a).

Se mejoraron las propiedades mecánicas como estabilidad, tensión en seco y húmedo, habilidad de ser suturada, flexibilidad, propiedades hemostáticas, humectación, absorción de agua o fluidos corporales, capacidad de ser enrollada húmeda o seca y que pueda ser cortada sin perder sus propiedades (Ruszczak y col., 2000a).

Una vez obtenida la membrana u hoja, estas pueden ser esterilizadas por vapor de óxido de etileno, radiación gamma u otro método compatible para este material.

9.5.1.4.1 MEMBRANAS DE COLÁGENO

Comparando la esponja de colágeno con las membranas, estas últimas tienen un mejor manejo y pueden ser enrolladas o torneadas sin romperse, el tiempo de “hinchado” se reduce, la absorción de fluidos se aumenta, el producto húmedo permanece flexible, con mayor elasticidad y excelente fuerza de tensión (Ruszczak y col., 2000a).

Estos materiales pueden ser utilizados en procedimientos quirúrgicos en general, cirugía vascular, ortopédica, ginecología, oftalmología, neurología, neurocirugía y muchos otros procedimientos incluyendo el curado de heridas y quemaduras. También pueden ser utilizados como sustitutos de tejidos o como matrices para el crecimiento celular, especialmente en la ingeniería de tejidos y la creación de órganos artificiales (Ruszczak y col., 2000a).

9.5.1.4.1 HOJAS DE COLÁGENO

Las hojas de colágeno presentan propiedades superiores a las esponjas de colágeno, como por ejemplo, el tiempo de “hinchado” es mucho menor y la capacidad de unión a los fluidos es mayor (Ruszczak y col., 2000a).

Las hojas pueden aumentar 30 veces su peso en un tiempo máximo de 10 segundos y las propiedades hemostáticas son mejoradas en esta presentación. En condiciones húmedas, las hojas son mecánicamente estables presentando una alta fuerza de tensión. La hoja seca o húmeda es muy fácil de manipular, se puede cortar en la forma deseada, siendo más fácil su colocación en las diferentes partes del cuerpo (Ruszczak y col., 2000a).

Al igual que las membranas, las hojas pueden ser utilizadas en una gran variedad de procedimientos quirúrgicos, pudiendo ser utilizadas como transportadores de sustancias biológicamente activas como factores de crecimiento, hormonas, drogas y otras, las que pueden ser incorporadas por absorción (Ruszczak y col., 2000a).

9.5.1.5 USO CLÍNICO EN VETERINARIA

En medicina veterinaria, el uso del colágeno como transportador de antibióticos fue utilizado con éxito en el tratamiento de infecciones musculo esqueléticas en varias especies.

Se ha descrito en perros, el tratamiento de una artritis séptica causada por *S. aureus* meticilina resistentes (Owen y col., 2004), utilizando una esponja de colágeno con 2 mg de gentamicina implantada en la articulación. Además, en este estudio, la terapia post implantación fue complementada con la administración de gentamicina y clindamicina por vía endovenosa por 5 días en dosis de 5 y 10 mg/kg respectivamente, obteniendo cultivos bacterianos negativos a las 4 semanas post implantación, sin evidenciar recurrencia de infección a los 12 meses. En otro estudio *in-vivo* (Delfosse y col., 2011), se evaluaron los niveles séricos luego de la implantación de esponjas de colágeno en el fémur de 4 beagles. En este estudio, los autores implantaron una esponja de colágeno de origen bovino (2,5 mg/cm^2 de colágeno) con gentamicina (2 mg/cm^2), concluyendo que los niveles alcanzados estaban muy por debajo de los niveles asociados a toxicidad, pudiendo utilizar la esponja de colágeno en pacientes con problemas renales, sin correr riesgos de intoxicación con el antibiótico.

Fig. 21. Esponja de colágeno impregnada en gentamicina implantada en tejido óseo. Cortesía del Dr. Carlos Rodriguez.

Summerhays (2000) describe 8 casos de artritis séptica en equinos tratados con esponjas de colágeno impregnadas con gentamicina. A todos se les realizó un lavaje por artroscopía y desbridamiento seguidos por la inserción de la esponja en la articulación. 6 caballos volvieron a la normalidad dentro de 6 meses. En un caso, el procedimiento se tuvo que repetir y se le tuvo que administrar antibiótico en forma sistémica. Este estudio muestra un resultado de un 75% de éxito (6/8 equinos tratados) en el tratamiento de la artritis séptica.

En la Universidad de Berne, se probaron esponjas de colágeno impregnadas en antibiótico para el tratamiento de artritis séptica crónica en las articulaciones tarsocrural, radiocarpal, metacarpo falangeana e interfalangeana distal en ganado bovino (Hirsbrunner y Steiner, 1998; Steiner, 1998; Steiner y col., 1999; Zulauf y col., 2001). El acceso a la articulación interfalangeana fue a través de la pared del casco en la cara abaxial. Estos 4 estudios incluyen un total de 21 casos y la mayoría presentaban una historia de tratamientos insatisfactorios conservativos o quirúrgicos. La edad de los animales se encontraba entre 1 mes a 7 años. El diagnostico incluía el recuento celular del líquido sinovial, contenido en proteínas y análisis bacteriológico. En todos los casos, el recuento de células nucleadas fue mayor a 50 x 10^6/ml y el total de proteínas fue mayor o igual a 40 g/L, también, el standard bacteriológico fue negativo en 6 de 14 casos. La terapia incluía el desbridamiento quirúrgico y el lavaje articular, necesitando realizar una sinovectomía parcial y curetage del cartílago articular. Antes del cierre primario de los orificios para la artroscopía, se introdujeron dentro de la articulación esponjas de colágeno impregnadas en sulfato de gentamicina (50 mg cada 100kg de peso vivo).En la mayoría de los casos se les administro por vía sistémica antiinflamatorios y antibióticos por hasta 3 semanas. En dos casos, la intervención quirúrgica se repitió luego de 10 días, a causa de la persistencia de claudicación y tumefacción de la articulación. 20 animales fueron dados de alta entre 2 a 5 semanas luego de iniciado el tratamiento y un animal fue sacrificado el día 10 luego de la cirugía debido a los

cambios destructivos irreversibles que presentaba la articulación. El seguimiento a largo plazo, vía telefónica, sugirió que 18 animales estaban pastando y presentaban gestaciones y fertilidad normal, uno fue sacrificado por la laminitis recurrente y uno fue sacrificado por problemas de fertilidad. A pesar de todo, la tasa de éxito de este estudio fue de un 86%.

9.5.2 HIALURONATO

Cribb y col., (2005), investigaron el uso de hialuronato como transportador de amikacina en el tratamiento de infecciones en cavidades sinoviales. Por ser reabsorbible e inocuo al ambiente articular, puede constituir un transportador óptimo para las infecciones sinoviales, aportando una rápida elución de la amikacina desde el implante, manteniendo niveles por encima de la CIM por un período de aproximadamente 24 horas. Además, las infecciones fueron eliminadas dentro de las 24 horas posteriores a la implantación del transportador, liberándose rápidamente la amikacina, haciendo impracticable a este sistema como parte del tratamiento a largo plazo en la liberación de antibióticos.

9.5.3 FIBRINA

Los selladores de fibrina son materiales hemostáticos tópicos derivados de la coagulación de las proteínas del plasma que han sido utilizadas cada vez más en los procedimientos quirúrgicos (Jackson, 2001). Los selladores de fibrina tienen un gran potencial para la entrega de antibióticos, quimioterapia, factores de crecimiento en sitios quirúrgicos (Jackson, 2001) y células osteoprogenitoras, como en un estudio realizado por McDuffee (2012), en el cual éstas eran depositadas en el cuarto metatarsiano de un equino utilizando fibrina como vehículo de depósito local.

Los selladores son biocompatibles y degradados por fibrinólisis en días o semanas dependiendo del sitio. La compatibilidad de estos materiales en las heridas quirúrgicas, hace que los selladores de fibrina sean buenos candidatos para utilizarse como transportadores de liberación controlada de antibióticos en forma local. Los antibióticos con una baja solubilidad en agua, como las tetraciclinas, son particularmente aplicadas en este sistema (Woolverton y col., 2001), presumiblemente porque el precipitado de la droga se disuelve y difunde lentamente desde la fibrina. Antibióticos más solubles como la gentamicina y la ciprofloxacina demostraron liberarse de la fibrina, *in-vitro*, en 5-7 días la gentamicina (Kram y col., 1991) y más de 60 días la ciprofloxacina (Tsourvakas y col., 1995), habiendo sido liberado en los primeros dos días el 66%.

En un modelo animal, el máximo nivel de ciprofloxacina en hueso y tejidos blandos luego del implante en el canal medular de la tibia de un conejo, fue obtenido al segundo día luego de la implantación y la droga fue indetectable luego de 10 días (Tsourvakas y col., 1995).

Zilch y Lambiris (1986) midieron las concentraciones de cefotaxime en sangre y en el drenaje de las heridas de 46 pacientes humanos con osteomielitis que fueron tratados con una mezcla de coagulo de fibrina y cefotaxime inyectados en la cavidad

del hueso. Estos autores reportaron niveles séricos que fueron bajos dentro de las 12 horas luego de haber colocado el coagulo de fibrina, pero el fluido del drenaje de la herida mantuvo altas concentraciones por más de 3 días.

9.5.4 CHITOSÁN

Además se han utilizado materiales estructurales análogos al colágeno, como el chitosan. Este material ofrece una buena protección a la herida y se ha descubierto que estimula la curación de la misma, sin crear un tejido de granulación excesivo y la formación de una cicatriz exuberante (Chung y col. 1994), teniendo actividad contra un amplio espectro de bacterias (Muzzarelli y col., 1990).

El chitosan cargado con vancomicina y amikacina, fue estudiado por Scott y col., (2010) en un ensayo *in-vitro*. Los antibióticos fueron cargados a la matriz, a través de la técnica de inmersión en una solución con los antibióticos por 60 segundos. Los autores encontraron que las cantidades liberadas eran suficientes como para prevenir una infección musculo esquelética.

9.6 POLÍMEROS SINTÉTICOS BIODEGRADABLES

Los polímeros sintéticos biodegradables fueron utilizados en procedimientos quirúrgicos desde 1950 como material de sutura. Desde entonces se han generado implantes a base de polímeros sintéticos más fuertes y más confiables para ser considerados como transportadores (El-Husseini y col., 2011).

Los más investigados para la regeneración ósea son los polialfahidroxiesteres y la polidioxanona. El primer grupo comprende el ácido poli L-láctico (L-PLA), el ácido poli DL láctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), y sus copolímeros, el poli L-láctico-coglicólico (L-PLGA) y el poli DL láctico-coglicólico (PLGA) (Boyan y col., 1998).

9.6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El PGA y el PLA, fueron seleccionados para actuar como transportadores debido a que sufren una degradación gradual en forma controlada, se disuelven a PH fisiológico y su remoción tampoco es necesaria. Además, la cinética de liberación del antibiótico puede ser modificada por la selección de copolímeros a través de la variación de la composición monométrica, cristalinidad del polímero y peso molecular, así como también por la alteración de la geometría del implante (Makinen y col., 2005).

En términos de efectividad, en comparación con el PMM, muy utilizado para el tratamiento de infecciones musculo esqueléticas, se observó que los resultados no diferían demasiado entre las PPMM y los sistemas de liberación sintéticos (PLGA) (Garvin y col., 1994), aunque las combinaciones con los polímeros biodegradables mostraron una mayor liberación sostenida de la droga, comparada con las PPMM. Además, las concentraciones de antibiótico para las PPMM cayeron por debajo de la CIM al día 12 comparado con las perlas de PLA, las que mantuvieron

concentraciones terapéuticas por 68 días en un estudio realizado por Mader y col., (1997). Una desventaja para las PPMM es que forman una barrera para la formación de nuevo hueso, donde las microesferas de PLGA permiten el crecimiento óseo a medida que se degradan (Ambrose y col., 2004).

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

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

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

Rutledge y col., (2003), valoran la implantación de varillas de policaprolactona (PCL) con tobramicina en el fémur de conejos con osteomielitis por *S. aureus*. A las 4 semanas de tratamiento, el recuento bacteriano fue menor en los grupos tratados con implantes de PCL-tobramicina o PMM-tobramicina que en los grupos no tratados (implantes placebo o sólo irrigación), no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre los implantes con antibióticos. Los estudios histológicos permitieron además concluir que los implantes de PCL no producían toxicidad sistémica.

El potencial osteogénico de los polímeros ha sido ampliamente demostrado. García-Novalvos y col., (1996), realizan un estudio de la respuesta ósea a biomateriales constituidos por diferentes proporciones de los ácidos láctico y glicólico, después de su implantación en ratas, mediante técnicas cromatográficas y morfológicas, pudiendo apreciar la continua degradación y la respuesta ósea frente al implante, así como los procesos de absorción de los compuestos y su sustitución por tejido óseo.

Castillo y col., (2003), estudiando el efecto de L-PLA y DL-PLA de 30 y 60 kD (Kilo Dalton) comprueban, en el relleno de un defecto óseo en el cóndilo femoral de un

conejo, que los gránulos de DL-PLA de 30 kD inducen una mayor neoformación ósea, produciéndose una mayor absorción del polímero.

8.6.2 PROPORCIONES DE LOS POLÍMEROS

Los polímeros sintéticos pueden crearse en diferentes proporciones y con diferentes pesos moleculares, obteniéndose con las diferentes combinaciones, diferentes perfiles de liberación de droga. Los polímeros pueden ser formados por PLA y PGA (PLGA) en diferentes proporciones (Garvin y col., 1994; Mader y col., 1997), incluso se puede fabricar un polímero con proporciones de PLGA y PLA (Schmidt y col., 1995).

El peso de los polímeros y las proporciones en que éstos se fabriquen, van a incidir en las características de elución de la droga cargadas como lo muestra un estudio *in-vitro* realizado por Mader y col., (1997), en el que se estudiaron las características de elución de diferentes antibióticos (clindamicina, vancomicina y tobramicina) de PPMM, PLA de 2000 kd de peso molecular, PLGA (PLA/PGA) en combinaciones de 90:10, 80:20 y 70:30, y la combinación del PLGA 70:30 con PLA. El PLGA en su combinación 90:10 mostró la mejor liberación para la clindamicina y la tobramicina con concentraciones que se mantuvieron por encima de la CIM por 48 días y 68 días respectivamente. Las perlas de PLGA se disolvieron entre 37 y 180 días dependiendo del antibiótico y la combinación utilizada.

A pesar de que las características de los copolimeros en proporción 90:10 tenían resultados más favorables que las otras proporciones, Garvin y col., (1994) mostraron que los implantes de copolimeros (50:50) cargados con gentamicina, fueron significativamente más exitosos que el uso de la terapia parenteral en osteomielitis experimentales en modelos caninos, demostrando que la proporción utilizada es efectiva contra este tipo de infecciones.

9.6.3 DIFERENTES PESOS

Kanellakopoulou y col., (1999), estudiaron un sistema para el depósito de fluoroquinolonas. El mismo consistía en la preparación de implantes de L-PLA de 2 kD y DL-PLA de 26 kD y 100 kD con ciprofloxacina o perfloxacina mezclando polímero y antibiótico a alta temperatura y posterior enfriamiento, estudiando la cesión de estos antibióticos *in-vitro* así como la degradación de los polímeros. Los autores señalan que las concentraciones alcanzadas son superiores a las mínimas inhibitorias para los microorganismos más frecuentemente causantes de infecciones óseas; si bien indican que los implantes de DL-PLA, de mayor peso molecular, pueden ser más convenientes para ensayarlos *in-vivo*, ya que tanto la liberación como la degradación de los polímeros es más lenta, cabe esperar que ambos procesos sean más rápidos *in-vivo*. Sin embargo, el pico de liberación se produce a tiempos más cortos *in-vitro* con el polímero de mayor peso molecular.

Posteriormente Kanellakopoulou y col., (2000), prueban la eficacia de los implantes de L-PLA de menor peso molecular (2 kD) con perfloxacina frente a *Staphylococcus aureus* metilcilina resistentes en conejos. La evaluación de la eficacia del sistema se

lleva a cabo valorando la reducción del número de colonias de bacterias a lo largo del tiempo, observándose una disminución muy importante después de 33 días y no produciéndose ninguna recidiva. Esto para los autores, supone que es eficaz para erradicar la infección.

9.6.4 DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

Estudios indican que este material es altamente compatible con una gran variedad de antibióticos como por ejemplo la gentamicina, polimixina-B, ciprofloxacina, vancomicina y tobramicina (Nie y col., 1995; Calhoun y Mader, 1997; Mader y col., 1997), lográndose *in-vivo* la liberación de concentraciones terapéuticas por un periodo de tiempo definido, pudiendo minimizar la liberación de concentraciones sub-óptimas (Makinen y col., 2005).

Wei y col., (1991), implantaron modelos de varillas hechas de la mezcla de un oligomero de ácido láctico y dideoxykanamicina-B, en modelos de conejo. Mostraron que la CIM del antibiótico para el organismo causal común de la osteomielitis fue excedida por seis semanas en la corteza, hueso esponjoso y médula ósea. Además, la mayor parte del implante fue absorbido y la médula ósea había retornado casi al estado normal a las nueve semanas de la implantación.

La eficacia de las microcápsulas en la osteomielitis también fue demostrada *in-vivo* por Garvin y col., (1994), erradicando la infección en el 100% del grupo tratado con implantes de PLGA (50:50) cargados con 100 mg de gentamicina.

Uno de los grupos de antibióticos más estudiados para el tratamiento de osteomielitis incorporados en matrices de polímeros biodegradables son las quinolonas. Lew y Waldvogel (1995), afirman que las quinolonas son los antimicrobianos de elección en el tratamiento de la osteomielitis crónica, por su favorable penetración en lugares infectados pobremente vascularizados y en el hueso. Además, actúan como bactericidas sobre todos los posibles patógenos de la osteomielitis crónica, incluyendo los *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Otras ventajas son su disponibilidad en preparaciones orales y parenterales y tienen escasas reacciones adversas.

Overbeck y col., (1995), utilizan en un estudio *in-vivo* implantes de PGA con ciprofloxacina, comprobandose la difusión del antibiótico a lo largo del fémur de conejos. Los resultados indican que los niveles iniciales son muy elevados, lo que significa una liberación importante de antibiótico, seguida de una liberación más lenta, que permite mantener niveles del antibiótico por encima de la CIM para el *S. aureus* durante la primera semana a lo largo de la zona que se encuentra a 30 mm del implante. Los autores concluyen que los niveles de antibiótico pueden ser suficientes para erradicar una infección.

Posteriormente Ramchandani y Robinson (1998), encuentran que se mantienen concentraciones superiores a las mínimas inhibitorias durante un periodo de seis semanas a lo largo de 70 mm en fémur de conejos con implantes elaborados por compresión de microesferas de PLGA con ciprofloxacina.

La tobramicina y cefazolina, fueron estudiadas por Ambrose y col., (2004) comparando diferentes formas de tratamiento utilizando conejos con osteomielitis causada por *Staphylococcus aureus.* En el estudio, separaron al azar animales en 5 grupos de tratamientos, seguidos de un desbridamiento quirúrgico: 1- el grupo control, 2- grupo con micro esferas de tobramicina (50:50 PLA/PGA o PLGA), 3- grupo con microesferas de tobramicina y cefazolin parenteral, 4- grupo con perlas de PMMA con tobramicina más cefazolina parenteral y 5- grupo con cefazolina parenteral solamente. Luego de 4 semanas de tratamiento, solamente el grupo con micro esferas de tobramicina más cefazolina parenteral presentaba una disminución en los conejos positivos a *S. aureus* comparados al grupo control (25% vs 75%, P<.01). Adicionalmente, luego de 4 semanas de tratamiento, todas menos dos de las microesferas con tobramicina mantenían la concentración por encima de la CIM comparado con las PPMM con tobramicina, las cuales ninguna mantenía esas concentraciones.

Además de los ácidos poli lácticos, poli glicólicos y sus combinaciones, hay otros materiales que también son utilizados para el depósito de sustancias. Por ejemplo, el poli carbonato de trimetileno, el cual puede ser preferido a los ácidos lácticos y glicólicos, porque no produce productos de degradación ácidos, si bien ciertos autores le asignan importancia a la disminución del PH beneficiando el control de gérmenes (Varghese y col., 1986), la capacidad de promover la epitelización (Eisinger y col., 1979) y la estimulación de síntesis local de colágeno (Hutchinson y Furr, 1985), disminuyendo el tiempo de cicatrización de las heridas (Stashak, 1994). Además, el policarbonato de trimetileno logra cinéticas de liberación de orden cero la que puede no estimular el desarrollo de resistencia bacteriana debido a la ausencia de una cola de liberación baja y sostenida (Kluin y col., 2013).

10. DISCUSIÓN

Con el uso de los transportadores, altas concentraciones de antibiótico son alcanzadas, pudiendo las mismas eliminar bacterias no susceptibles a la terapia sistémica (Tsourvakas, 2012; Hayes y col., 2013). Esto sería una solución a no utilizar antibióticos en forma sistémica si se utilizan implantes para el tratamiento de una infección local, ahorrando en mano de obra, tiempo y dinero, evitando posibles efectos tóxicos de los antibióticos. Sin embargo, Owen (2004), plantea el uso de la terapia sistémica en conjunto con el uso de implantes, en este caso esponjas de colágeno, para el tratamiento de una infección causada por S. aureus meticilino resistentes. A pesar de esto, muchos autores utilizaron solamente los implantes con antibiótico obteniendo resultados positivos (Brown y Bennett. 1988; Butson y col., 1996; Trostle y col., 1996; Tobias y col., 1996; Holcombe 1997; Booth y col., 2001; Hartley y Sanderson, 2003).

La toxicidad de los antibióticos es un factor nocivo para los tejidos que hay que tener en cuenta a la hora de elegir y realizar un tratamiento, debido a que podemos contribuir a la destrucción y muerte celular. Para la tobramicina, Antoci y col., (2007) realizó un estudio donde mostraba los niveles de concentración de antibiótico que producían cambios en la proliferación celular. Las mismas concentraciones fueron alcanzadas en otro estudio llevado a cabo por Turner y col., (2005), demostrando que no solo no se producía una disminución en la proliferación celular, sino que la alta concentración de antibiótico tampoco alteraba su capacidad osteogénica y la tasa de absorción tampoco era influenciada por la concentración de antibiótico.

Los niveles alcanzados con el 2% de tobramicina en el estudio de Turner y col., (1998), también fueron mayores a los niveles citotóxicos propuestos por Antoci y col., (2007), sin embargo los resultados del estudio fueron positivos, sin evidenciar problemas con la proliferación celular. Por otro lado, Nelson y col., (2002), logran 11900 µg/ml en exudados de la herida utilizando pellets de sulfato de calcio (SC) sin evidenciar signos de toxicidad en sus resultados.

El polimetilmetacrilato (PMM) demostró su eficacia al ser utilizado como transportador de antibióticos en el tratamiento de las infecciones musculo esqueléticas, a pesar de su desventaja de tener que recurrir a una segunda intervención para ser retirado del sitio de implante. El mecanismo por el cual se libera la droga es controversial. Shurman y col., (1978) plantean que la liberación de la droga de la matriz es por difusión, al igual que Bayston y Milner (1988), que plantean que el mecanismo de liberación es a través de la difusión pasiva, de donde hay más concentración a donde hay menos. Sin embargo, Marks y col., (1976), mencionaban que la liberación se daba por el fenómeno de disolución a través de los poros o agujeros de la matriz. Esta teoría de los años 70, fue justificada por Baker y Greenham (1988), en un estudio donde se probó que la liberación no era gracias al fenómeno de difusión, sino que el antibiótico se liberaba por disolución a través de poros o agujeros y roturas de la matriz.

Esto, también fue probado por la adición de antibiótico al cemento de PMM, ya que cuanto más antibiótico se mezcle con el cemento, mayor será su porosidad, más áspera su superficie y más canales habrá en la superficie de la perla, aumentando la liberación del antibiótico (Calhoun y Mader, 1989).

Según Streppa y col., (2001), la liberación del antibiótico del PMM nunca va a ser del 100%, porque el antibiótico está suspendido dentro de la matriz no absorbible, siendo solamente liberado hasta el 25% del antibiótico (Rushtone, 1997). Esto ocurre en las perlas de 7mm de diámetro, ya que Walenkamp, (1989), mostró que se podía liberar hasta el 93% del antibiótico en las perlas si éstas tenían un tamaño menor.

Varios autores coinciden en que la porosidad de la matriz del cemento aumenta la elución del antibiótico a medida que aumenta la porosidad de su matriz (Godel y col., 1986; Flick y col., 1987; Baker y Greenham, 1988; Henry y col., 1991). Esto fue demostrado en un estudio por Kuechle y col., (1991). Como se mencionó anteriormente, la adición de antibiótico al cemento aumenta la porosidad de la matriz, y cuanto más antibiótico, más porosa será su matriz y mayor será la elución del antibiótico (Marks y col., 1976; Calhoun y Mader, 1989; Tobías y col., 1996; Ethell y col., 2000).

Cuando aumentan la cantidad de antibiótico en los implantes, además de aumentar la porosidad de la matriz, están en otras palabras, utilizando diferentes proporciones de antibiótico y cemento para formular las perlas. Esto trae como consecuencia, y dependiendo de las proporciones utilizadas, un aumento en la elución del antibiótico sin pérdida de las propiedades mecánicas, o con pérdida de las propiedades mecánicas. Para mantener las propiedades mecánicas del cemento, las proporciones de antibiótico no deben superar el 10% (Lautenschlager y col., 1976; Ethell y col., 2000), aunque para Calhoun y Mader, (1989) y Tobías y col., (1996), no deben superar el 5%. Por otro lado, de no importar mantener las propiedades mecánicas del cemento, se pueden utilizar hasta un 20% de antibiótico, pero no se debe pasar de esa proporción ya que eso afectaría el fraguado del cemento Cierny y col., (2003).
Las propiedades mecánicas del cemento, además de poder ser modificadas con la proporción de antibiótico utilizada en la formulación de las perlas, también podría ser alterada al utilizar el antibiótico en forma de polvo o líquido. Según Diefenbeck y col., (2006) y Marks y col., (1976), la forma líquida de la gentamicina, impacta en forma negativa en las características mecánicas más que la forma en polvo del antibiótico, aunque ninguna de las dos formas impacta negativamente en la efectividad del tratamiento. Además, para las formas en polvo y líquida del antibiótico, las tasas de elución no presentaban diferencias significativas. A pesar de esto, la amikacina en forma de polvo fue liberada más rápido que la preparación con su forma líquida Ethell y col., (2000).

La adición de más de un antibiótico a las perlas, disminuye el tiempo de elución de los antibióticos según Ethell y col., (2000) y Phillips y col., (2007). En contraste, la combinación metronidazol-gentamicina aumentó la elución en comparación con las preparaciones con los antibióticos en forma individual (Ramos y col., 2003). Phillips y col., (2003), argumentan que no todos los antibióticos son aptos para ser utilizados en forma combinada en preparaciones con el cemento, como es el caso de la amikacina y la cefazolina.

La efectividad en los tratamientos de diferentes infecciones es buena para este transportador. Buston y col., (1996), muestran como el 54,5% de pacientes equinos

tratados por infecciones sinoviales refractarias volvieron a la normalidad (N=11) y el 100% de los bovinos tratados también lo hicieron (N=9). Además, Holocombe, (1997), recomienda el uso de las perlas de polimetilmetacrilato (PPMM) para las infecciones musculo esqueléticas tras haber obtenido un 78,9% de éxito en el tratamiento de este tipo de infecciones. Otros autores que también obtuvieron resultados exitosos en el tratamiento de este tipo de patologías para casos individuales fueron Brown y Bennett (1988) y Hartley y Sanderson (2003).

Otra desventaja es la posibilidad de generar resistencia bacteriana, ya que la liberación del antibiótico en su etapa final, se caracteriza por una cola de liberación de bajas concentraciones predisponiendo a la aparición de resistencia (Tsourvakas, 2012). La capacidad de adherirse las bacterias a la superficie de las perlas y formar un biofilm, fue demostrada por Kendall y col., (1996), predisponiendo la recurrencia de la infección y la resistencia bacteriana (vonEif y col., 1997).

El sulfato de calcio (SC) es un material biodegradable que se ha utilizado con éxito en el tratamiento de infecciones musculo esqueléticas al ser utilizado como transportador de antibióticos (Lillo y Peltier, 1955; Nelson y col., 2002; Turner y col., 2005). Las características que resaltan a este material como transportador de antibióticos, son su capacidad de absorberse totalmente, aunque para Strochi y col., (2002), la absorción es casi completa y no completa como lo afirman Lillo y Pelltier (1955) y Podaropoulos y col., (2009).

Otra característica, son sus propiedades regenerativas sobre el tejido óseo. Las mismas son la osteoconducción y la osteoinducción, estudiadas por varios autores (Coetzee 1980; Pecora y Col., 1997**;** Strocchi y col., 2002; Walsh y col., 2003; Thomas y col., 2005; Lazary y col., 2007; Podaropoulos y col., 2009).

Su eficacia en el tratamiento de osteomielitis fue demostrada por varios autores. Nelson y col., (2002), utilizando un 10% de tobramicina, obtuvieron un 84,6% de

Esto quedaría opacado tras el estudio mencionado de Mehta y col., (1996) y Grzybowski y col., (1997) en que ambos utilizaron como terapéutica la esponja de colágeno obteniendo éxito en la terapia contra la infección. A pesar de estos estudios, que exponen al uso de la esponja como un tratamiento efectivo que logra concentraciones por varios días, los estudios de Ivester y col., (2006) y Hayes y col., (2013) muestran como el implante de colágeno en una cavidad articular logra grandes concentracioes e u ri-cipiudio

logró concentraciones terapéuticas por 45 y 68 días dependiendo del antibiótico utilizado. Y Calhoun y Mader (1997), usando implantes de PLA-PLGA, logran concentraciones mayores a la CIM por 4 semanas, logrando reducir la carga bacteriana en 100 veces por gramo de tejido, en el grupo tratado en su estudio.

El peso molecular del polímero es el otro factor que influye en la elución del antibiótico (Kanellakopoulou y col., 1999). El autor muestra como diferentes pesos presentan diferentes perfiles de liberación. Sin embargo, el autor menciona al polímero de mayor peso molecular (100 Kd en su estudio) como el más adecuado, aunque en el año 2000, el mismo autor señala que polímeros de menor peso ya son efectivos para erradicar una infección.

Varios antibióticos fueron utilizados para formar parte de este sistema de depósito, aunque para Lew y Waldvogel (1995), los mejores antibióticos son las quinolonas, siendo estos antibióticos utilizados también por Overbeck y col., (1995) y Ramchandani y Robinson (1998), pero en términos de efectividad, muchos antibióticos pertenecientes a otras familias son tan efectivos como las quinolonas al ser utilizados en transportadores. Así lo muestran para la gentamicina, tobramicina y dideoxikanamicina-b (aminoglucósidos) Garvin y col., (1994), Ambrose y col., (2004) y Wei y col., (1991) respectivamente, y para la cefazolina (cefalosporina) Ambrose y col., (2004), a modo de ejemplo.

11. CONCLUSIONES

- De necesitar fuerza mecánica, en su uso con prótesis, el polimetilmetacrilato es el material a utilizar.

-

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams K, Couch L, Cierny G, Calhoun J, Mader JT. (1992). In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylates beads. *Clin Orthop Rel Res,* 278: 244-252.

2. Adams OR. (1998). Enfermedades Quirúrgicas de los miembros del caballo. Montevideo, Hemisferio Sur, 465 p.

3. Allababidi S, Shah JC, (1998). Kinetics and mechanism of release from glyceryl monostearate-based implants: evaluation of release in a gel stimulating in vivo implantation. *J Pharm Sci,* 87 (6): 738-744.

4. Ambrose CG, Clyburn TA, Louden K, Joseph J, Wright J, Gulati P, Gogola GR, Mikos AG. (2004). Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. *Clin Orthop Rel Res.* 421: 293-299.

5. Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R, Mueller R. (2004). Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials,* 25 (14): 2831-2841.

6. Antiszko M, Grzybowski J, Tederko A, Braczko R. (1996). Highabsorbing collagen membranes as carriers for antibacterial drugs, *Polim. Med.* 26 (3–4): 21– 27.

7. Antoci V Jr, Adams CS, Parvizi J, Ducheyne P, Shapiro IM, Hickok NJ. (2007). Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. *Clin Orthop Relat Res* 461: 81-87.

8. Anusavice, K. (1998). Phillips: Ciencia de los materiales dentales. 10a ed. México McGraw-Hill Interamericana. 746 p.

9. Aran JM, Erre JP, Lima da Costa D, Debbarh I, Dulon D. (1999). Acute and chronic effects of aminoglycosides on cochlear hair cells, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 884: 60– 68.

10. Ariano RE, Nyhlen A, Donnely JP. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of meropenem in febrile neutropenic patients with bacteriemia. *Ann Pharmacother* 39 (1): 32-38.

11. Auer JA, Stick JA. (2006). Equine Surgery. 3a Ed. St Louis, Mo. Saunders Elsevier. 1390 p.

12. Baar S, Schoerner C, Roellinghoff M, Radespiel-Troeger M, Huemmer HP, Carbon RT. (2001). Collagen patches impregnated with antimicrobial agents have high local antimicrobial efficacy and achieve effective tissue gluing. *Infection* 29 (1): 27–31.

13. Baker AS, Greenham LW. (1988). Release of gentamicin from acrylic bone cement: elution and diffusion studies. *J Bone Joint Surg [Am]* 70 (10) : 1551-1557.

14. Baxter M. (2012). Adams & Stashak, Lameness in horses. 6a ed. Colorado, Wiley, 1242 p.

15. Bayston R, Milner RDG. (1982). The sustained release of antimicrobial drugs from bone cement. *J Bone Joint Surg [Br]* 64 (4): 460-464.

16. Bayston R, Rodgers J. (1990). Production of extra-cellular slime by Staphylococcus epidermis during stationary phase of growth: its association with adherence to implantable devices. *Journal Clinical Pathology,* 43 (10): 866-870.

17. Bidgood T, Papich MG. (2002) Plasma pharmacokinetics and tissue fluid concentrations of meropenem after intravenous and subcutaneous administration in dogs. *Am J Vet Res.* 63(12): 1622-1628.

18. Blengio Pinto JR, Orisaya Samperio, Perez-Tamayo AM, tr (2006). Goodman & Gilman's. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a ed. México McGraw- Hill. 2017p.

19. Booth DM. (2010). Interpreting culture and susceptibility data in critical care: perks and pitfalls. J *Vet Emerg Crit Care*, 20 (1): 110-131.

20. Booth TM, Butson RJ, Clegg PD, Schramme MC, Smith RK. (2001). Treatment of sepsis in the small tarsal joint of 11 horses with gentamicina impregnated polymethyl methacrylate beads. Vet *Rec* 148 (12): 276-280.

21. Boyan B.D, Nasatzky E, Séller TA, Schwartz Z. (1998). Sustitutos del injerto óseo. *Current Opinión Orthop*. 3 (4): 17-23.

22. Brown A, Bennett D. (1988). Gentamycin impregnated polymethyl methacrylate beads for the treatment of septic arthritis. *Vet Rec* 123 (24): 625-626.

23. Brown DC, Conzemius MG, Shofer F, Swann H. (1997) Epidemiologic evaluation of postoperative wound infections in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc,* 210 (9): 1302-1306.

24. Buchholz HW, Engelbrecht H. (1970). Uber die depotwirkung einiger antibiotica bei vermischung mit dem kunstharz Palacos. *Chirurg,* 41 (11): 511-515.

25. Buchholz HW, Elson RA, Heinert K. (1984). Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. *Clin Orthop Rel Res,* 190: 96-108.

26. Bunetel L, Sequi A, Cormier M, Langlais F. (1990). Comparative study of gentamicina release from normal and low viscosity acrylic bone cement. *Clin Pharm,* 19 (4) :333-340.

27. Burke A. (2000). Antibiotic Resistance. *Med Clin of North Am* 84 (6) : 1407-1429.

28. Burke JF. (1961). The effective period of preventive antibiotic action in experimental incisions and dermal lesions. *Surgery,* 50: 161-168.

29. Buston RJ, Schramme MC, Garfick J, Davies JV. (1996). Treatment of intrasynovial infection with gentamicina impregnated polymethyl methacrylate beads. *Vet Rec*. 138 (19): 460-464.

30. Campton-Johnston Sk, Wilson J. (2001). Infected wound management: advanced technologies, moisture-retentive dressings, and die-hard methods, *Crit Care Nurs Q* 24(2): 64–77.

31. Calhoun JH, Mader JT. (1989). Antibiotic beads in the management of surgical infections. *Am J Surg,* 157(4): 443-449.

32. Calhoun JH, Mader JT. (1997). Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop Rel Res,* 341: 206-214.

33. Castillo, SDoso S, Fernandez Retana P. (2003). Evaluación del potencial osteogénico de los polímeros bioreabsorbibles derivados del ácido lactico utilizados como sustitutivos óseos. Estudio experimental en Conejos. *Rev Orthop Traumatol* 47:428-433.

34. Chang WK, Srinivasa S, MacCormick AD, Hill AG. (2013). Gentamicin-collagen implants to reduce surgical site infection: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Ann Surg.* 258(1):59-65.

35. Chiu FY, Chen CM, Lin CF, Lo WH. (2002). Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective randomized study of three hundred and forty knees. *J Bone Joint surg,* 84-A(5): 759-762.

36. Chung LY, Schmidt RJ, PF, Sagar BF, Andrews AM, Turner TD. (1994). Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture. *J Biomed Mater Res.* 28(4): 463-469.

37. Cierny G, Mader JT, Penninck JJ (2003). A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Contemp Orthop* 414: 7-24.

38. Cierny G, Mader JT. (1987). Approach to adult osteomyelitis. *Orthop Rev,* 16 (4): 259-270.

39. Cierny G. (1999). Infected tibial nonunions (1989-1995). The evolution of change. *Clin Orthop Rel Res,* 360: 97-105.

40. Clark C, Greenwood S, Dowling PM. (2004) A review of bacterial isolates of equine origin (1998-2003) and implications for antimicrobial therapy. *J Vet Pharm Ther,* 27: 385-387.

41. Clark C, Woodbury M, Dowbling P, Ross S, Boison JO. (2004). A preliminary investigation of the disposition of tilmicosin residues in elk tissues and serum. *J vet Pharm Therap.* 27: 385–387.

42. Coetzee AS. (1980). Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate. *Arch Otolaryngol*, 106(7): 405-409.

43. Constantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA Sr. (1991). Hydroxyapatite cement. 1. Basic chemistry and hystologic properties. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117(4): 379-84.

44. Coraça-Huber DC, Putzer D, Fille M, Hausdorfer J, Nogler M, Kühn KD. (2013). Gentamicin palmitate as a new antibiotic formulation for mixing with bone tissue and local release. *Cell Tissue Bank*. 15(1): 139-44.

45. Crib NC, Boure LP, Weese JS y col. (2005). Development of amikacina imprgnated hyaluronan implants for the treatment of septic arthritis in horses. *Vet Surg* 34: E5.

46. Cruz AM, Rubio-Martinez L, Dowling T. (2006). New antimicrobials, systemic distribution, and local methods of antimicrobial delivery in horses. *Vet Clin Eq.* 22(2): 297-322.

47. Dacquet V, Varlet A, Tandogan RN, Tahon MM, Fournier L, Jehl F, Monteil H, Bascoulergue G. (1992). Antibiotic-impregnated plaster of Paris beads. Trials with teicoplanin. *Clin Orthop Relat Res,* 282: 241-249.

48. Delfosse V, El Warrak A, Clerfond P, Lussier B. (2011). Clinical investigation of local implantation of gentamicin-impregnated collagen sponges in dogs. *Can Vet J.* Vol. 52(6):627–630.

49. Dellinger, E.P. (2007). Prophylactic antibiotics: administration and timing before operation are more important than administration after operation. *Clin. Infect. Dis.* 44:928-930.

50. Diefenbeck M, Muckley T, Hofmann G.(2006). Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury,* 37: 95-104.

51. DiPisa JA, Sih GS, Berman AT. (1976). The temperature problem at the bone–acrylic cement interface of the total hip replacement, *Clin Orthop Relat Res,* 12: 95–98.

52. Dombrowski ET, Dunn AW. (1965). Treatment of osteomyelitis by debridement and closed wound irrigation-suction. *Clin Orthop Rel Res,* 43: 215-231.

53. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Zannier A, Curvale G, Raoult D. (1993). Oral Rifampin plus ofloxacin for treatment of Staphylococcus-infected orthopedic implants. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1214-1218.

54. Edin ML, Miclau T, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE. (1996). Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res*, 333: 245–251.

55. Eisinger M, Lee JS, Hefton JM, Darzynkiewicz Z, Chiao JW, de Harven E. (1979). Human epidermal cell cultures: growth and differentiation in the absence of differentiation in the absence of dermal components or medium supplements. *Proc Natl Acad Sci*. 76(10): 5340-5244.

56. El-Husseini M, Patel S, MacFarlane RJ, Haddad FS. (2011). Biodegradable antibiotic delivery systems. *J Bone Joint Surg,* 93-B(2): 151-157.

57. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. (2003). Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand,* 74(6): 644-651.

58. Esposito S. (1999). Is single-dose antibiotic prophylaxis sufficient for any surgical procedure? *J Chemother,* 11(6): 556-564.

59. Ethell MT, Bennett RA, Brown MP, Merritt K, Davidson JS, Tran T. (2000). In vitro elution of gentamicin, amikacin and ceftiofur from polymethylmethacrylate and hydroxyapatite cement. *Vet Surg,* 29(5): 375-382.

60. Fernández HA, Monge V, Garcinuño MA. (2001). Surgical antibiotic prophylaxis: effect in post operative infections. *Eur J Epidemiol*, 17(4): 369-374.

61. Flick AB, Herbert JC, Goodell J, Kristiansen T. (1987). Non-commercial application of AIPMMA beads. Technical note. *Clin Orthop Rel Res*, 223: 282-286.

62. Fujioka K, Takada Y, Sato S, Miyata T. (1995). Novel delivery system for proteins using collagen as a carrier material: the minipellet, *J Control Rel,* 33: 307– 315.

63. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. (2005). Survival strategies of infections biofilm. *Trends Microbiol,* 13(1): 34-40.

64. Garcia EJ, Sieg RN, Abdelgawad AA. (2013). Local application of free antibiotic powder in the treatment of osteomyelitis in a rat model. *Orthop.* 36(8): 986-989.

65. García Novalvos A, Clavel-Sainz M, Meseguer J, Tabardo A, Santoja F. (1996). Poliésteres (PLA/PGA) biodegradables en cirugía ortopédica: estudio de su degradación y sustitución por tejido óseo. *Rev Ortop Traum*, 40:500- 510.

66. Gardner SY, Papich MG. (2001). Comparison of cefepime pharmacokinetics in neonatal foals and adult dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 24: 187-192.

67. Gbureck U, Probst J, Thull R. (2002). Surface properties of calcium phosphate particles for self setting bone cements, *Biomol Eng*, 19 (2–6):51–55.

68. Garvin KL, Miyono JA, Robinson D, Giger D, Novak J, Radio S. (1994). Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *Journ Bone Joint Surg,* 76-A(10):1500-1506.

69. Gericke R, Wahlig H, Dingeldein E, (1990). Flavanone derivatives. US Patent 4937257 A.

70. Gitelis S, y Brebach GT. (2002). The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *J Orthop Surg (Hong-Kong),* 10(1):53-60.

71. Gogia JS, Meehan JP, Di Cesare PE, Jamali AA. (2009). Local Antibiotic Therapy in Osteomyelitis. *Semin Plast Surg,* 23(2): 100-107.

72. Goodell JA, Flick AB, Hebert JC, Howe JG. (1986). Preparation and release characteristics of tobramycin-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Am J Hosp Pharm*, 43(6):1454-1461.

73. Goodrich LR. (2006). Osteomyelitis in horses. *Vet Clin Equine*, 22: 389-417

74. Gracia E, Lacteriga A, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Amorena B. (1998). Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. *J Surg Res,* 79(2): 146-153.

75. Grzybowski J, Kołodziej W, Trafny EA, Struzyna J. (1997). A new anti-infective collagen dressing containing antibiotics. *J Biomed Mater Res.* 36(2): 163-166.

76. Guglick MA, MacAllister CG, Clarke CR, Pollet R, Hague C, Clarke JM. (1998). Pharmacokinetics of cefepime and comparison with those of ceftiofur in horses. *Am J Vet Res*. 59(4):458-463.

77. Gursel I, Korkusuz F, Turesin F, Alaeddinoglu NG, Hasirci V. (2001). In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release system for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials,* 22(1):73-80.

78. Haerdi-Landerer MC, Habermacher J, Wenger B, Suter MM, Steiner A. (2010). Slow release antibiotics for treatment of septic arthritis in large animals. *Vet J*, 184:14–20.

79. Hanssen AD. (2004). Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard-in opposition. *J of Arthrop,* 19(4): 759-762.

80. Hanssen AD. (2005). Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection. *Clin Orthop Rel Res,* 437: 91-96.

81. Hanssen AD, Osmon DR, Patel R. (2005). Local antibiotic delivery systems: what are and where are we going? *Clin Orthop Rel Res,* 437: 111-114.

82. Hartley MP, Sanderson S. (2003). Use of antibiotic impregnated polymethylmethacrylate beads for the treatment of chronic mandibular osteomyelitis

in a Bennett's wallaby (Macropus rufogriseus rufogriseus). *Aust Vet J.* 81(12): 742-744.

83. Hayes G, Moens N,Gibson T. (2013). A review of local antibiotic implants and applications to veterinary orthopaedic surgery. *Vet Comp Orthop Traumatol,* 26: 251–259.

84. Hayes GM, Gibson TW, Moens NM, Monteiro B, Johnson RJ. (2014). Intra-articular pharmacokinetics of a gentamicin impregnated collagen sponge in the canine stifle: an experimental study. *Vet Surg,* 43(2):166-173.

85. Henry SL, Seligson D, Mangino P, Popham GJ. (1991). Antibiotic-impregnated beads. Part I: bead implantation versus systemic therapy. *Orthop Rev,* 20(3): 242-247.

86. Henry SL, Hood GA, Seligson D. (1993). Long term implantation of gentamicin polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clin Orthop Rel Res,* 295: 47-53.

87. Henry SL, Galloway KP. (1995). Local antibiotic therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacol,* 29(1):36-45.

88. Hirsbrunner G, Steiner A. (1998). Treatment of infectious arthritis of the radiocarpal joint of cattle with gentamicin-impregnated collagen sponges. *Vet Rec*, 142(15): 399–402.

89. Holcombe SJ, Schneider RK, Bramlage LR, Embertson RM. (1997). Use of antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate in horses with open or infected fractures or joints: 19 cases (1987-1995). *J Am Vet Med Assoc,* 211(7): 889-893.

90. Hutchinson FG, Furr BJ. (1985). Biodegradable polymers for the sustained release of peptides. *Biochem Soc Trans,* 13(2): 520-523.

91. Ipsen T, Jorgensen PS, Damholt V, Torholm C. (1991). Gentamicin-collagen sponge for local applications. 10 cases of chronic osteomyelitis followed for 1 year. *Acta Orthop Scand,* 62(6): 592-594.

92. Ivester KM, Adams SB, Moore GE, Van Sickle DC, Lescun TB. (2006). Gentamicin concentrations in synovial fluid obtained from the tarsocrural joints of horses after implantation of gentamicin-impregnated collagen sponges. *Am J Vet Res*. 67(9):1519-1526.

93. Jackson MR. (2001). Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am Jour Surg,* 182(2): 1-7.

94. Jacob E, Cierny G, Zorn K, McNeill F, Fallon MT. (1997). Delayed local treatment of rabbit tibial fractures with biodegradable cefazolina microspheres. *Clin. Orthop*. 336: 78-285.

95. Jenny G. (1988). Local antibiotic therapy using gentamicin-PMMA chains in post-traumatic bone infections. Sort and long-term results. *Reconst Surg Traumat,* 157(4): 36-46.

96. Jones SA, Bowler PG, Walker M, Parsons D. (2004). Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. *Wound Rep Reg*, 12(3): 288-294.

97. Josafsson G, Gudmudsson G, Kolmert L, Wijkstrom S. (1990). Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A five-year survey of 1688 hips. *Clin Orthop Rel Res,* 253: 173-178.

98. Joosten U, Joist A, Frebel T, Brandt B, Diederichs S, von Eiff C. (2004). Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 25(18): 4287-4295.

99. Joseph TN, Chen AL, Di Cesare PE. (2003). Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg,* 11(1): 38–47.

100. Kanellakopoulou K, Kolia M, Anastassiadis A, Korakis T, Giamarellos-Bourboulis EJ, Andreopoulos A, Dounis E, Giamarellou H. (1999). Lactic acid polymers as biodegradable carriers of fluoroquinolones: an in vitro study. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(3): 714-716.

101. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. (2000). Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs,* 59(6): 1223-1232.

102. Katzung BG. (2000).Farmacología básica y clínica, 8a ed. New York, McGraw-Hill, p. 784–792.

103. Kawanabe K, Okada Y, Matsusue Y, Iida H, Nakamura T. (1998). Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic. *J Bone Joint Surg Br.* 80(3): 527-530.

104. Kendall RW, Duncan CP, Smith JA, Nqui-Yen JH. (1996). Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason of caution. *Clin Orthop Rel Res,* 329: 273-280.

105. Khan R, Khan MH, Bey A. (2011). Use of collagen as an implantable material in the reconstructive procedures - *Biol Med,* 3 (4): 25-32.

106. Klemm K. (2001). The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections. *Clin Microb Inf,* 7(1): 28-31

107. Kluin OS, van der Mei HC, Busscher HJ, Neut D. (2013). Biodegradable vs non-biodegradable antibiotic delivery devices in the treatment of osteomyelitis. *Expert Opin Drug Deliv.* 10(3): 341-351.

108. Koch C.G, Li L, Hixson E, Tang A, Gordon S, Longworth D, Phillips S, Blackstone E. Henderson JM. (2013) Is it time to refine? An exploration and simulation of optimal antibiotic timing in general surgery. *J Am Coll Surg,* 217: 628-635.

109. Korkusuz F, Uchida A, Shinto Y, Araki N, Inoue K, Ono K. (1993). Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-clacium hidroxiapatite ceramic composites. *J Bone Joint Surg*, 75-B(1): 111-114.

110. Kram HB, Bansal M, Timberlake O, Shoemaker WC. (1991). Antibacterial effects of fibrin glue-antibiotic mixtures. *J Surg Res,* 50(2): 175-178.

111. Kuechle DK, Landon GC, Musher DM, Noble PC. (1991). Elution of vancomycin, daptomycin, and amikacin from acrylic bone cement. *Clin Orthop Rel Res,* 264: 302-308.

112. Lautenschlager EP, Marshall GW, Marks KE, Schwartz J, Nelson CL. (1976). Mechanical strength of acrylic bone cements impregnated with antibiotics. *J Biomed Mater Res*, 10(6):8 37-845.

113. Lazary A, Balla B, Kosa JP, Bacsi K, Nagy Z, Takacs I,Varga PP, Speer G, Lakatos P. (2007). Effect of gypsum on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells. *Biomaterials*, 28(3): 393-399.

114. Lazzarini L, Mader TT, Calhoun JH. (2004). Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg,* 86-A(10): 230.

115. Lesiak-Cyganowska E, Sladowski D. (2001). Komender, Modification of collagen film by certain chemical agents, *Arch Immunol Ther Exp,* 49(3): 247– 251.

116. Letsch R, Rosenthal E, Joka T. (1993). Local antibiotic administration in osteomyelitis treatment: a comparative study with two different carrier substances. *Aktuelle Traumatol.* 23(7) 324-329.

117. Levin PD. (1975). The effectiveness of various antibiotics in methyl methacrylate. *J Bone Joint Surg Br,* 57(2): 234-237.

118. Lew DP, Waldvogel FA. (1995). Quinolones and osteomyelitis; state of the art. *Drugs* Vol, 49(2): 101-111.

119. Lew DP, Waldvogel FA. (2004). Osteomyelitis. Lancet, 364: 369-379.

120. Li XD, Hu YY. (2001). The treatment of osteomyelitis with gentamicin-reconstituted bone xenograft-composite. *J Bone Joint Surg,* 83-B(7): 1063-1068.

121. Li XZ, Nikaido H. (2004). Efflux mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64(2): 159-204.

122. Lillo R, Peltier LF. (1956). The substitution of plaster of Paris rods for portions of the diaphysis of the radius in dogs. *Surg Forum,* 6: 556-558.

123. López J, Alarcón M. (2011). Calcium sulfate: properties and clinical applications. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral,* 4(3): 138-143.

124. Lorentzen H, Kallehave F, Kolmos HJ, Knigge U, Bu¨-Low J, Gottrup F. (1996). Gentamicin concentrations in human subcutaneous tissue, *Antimicrob Agents Chemother.* 40(8): 1785–1789.

125. Lugo J. (2006). Septic arthritis, tenosynovitis, and infections of the hoof structures. *Vet Clin North Am Eq Pract,* 22: 363-388.

126. Mackey D, Varlet A, Debeaumant D. (1982). Antibiotic loaded plaster of Paris pallet: an in vitro study of a possible treatment of osteomyelitis. *Clin Orthop Rel Res,* 167: 263-268.

127. Mader JT, Landon GC, Calhoun J. (1993). Antimicrobial treatment of osteomyelitis. *Clin Orthop Rel Res,* 295: 87-95.

128. Mader JT, Calhoun J, Cobos J. (1997). In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(2): 415-418.

129. Makinen TJ, Veiranto M, Lankinen P, Moritz N, Jalava J, Tormala P, Aro HT. (2005). In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler. *J Antimicrob Chemother*. 56(6): 1063-1068.

130. Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L. (1993). Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow up of 92675 operations performed 1978-1990. *Acta Orthop Scand,* 64(5): 497-506.

131. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. (1999). The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for prevention of surgical site infection, 20(4): 247-278.

132. Marks KE, Nelson CL, Lautenschlager EP. (1976). Antibiotic-impregnated acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg,* 58(3): 358-364.

133. Mattson S, Bouré L, Pearce S, Hurtig M, Burger J, Black W. (2004). Intraosseous gentamicin perfusion of the distal metacarpus in standing horses. *Vet Surg*. 33(2) 180-186.

134. McDuffee LA, Pack L, Lores M, Wright GM, Esparza-Gonzalez B, Masaoud E. (2012). Osteoprogenitor cell therapy in an equine fracture model. *Vet Surg.* 41(7): 773-783.

135. McLaren AC. (2004). Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections. *Clin Orthop Rel Res,* 42: 101-106.

136. Mc Ilwraith CW, Trotter GW. (1997). Joint Disease in the Horse. Philadelfia, Saunders, 505 p.

137. Mc Kellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG. (2004). Pharmacokinetic / pharmacodinamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J Vet Pharm Ther,* 27(6): 503-514.

138. Meijer MC, van Weeren PR, Rijkenhuizen AB. (2000). Clinical experiences of treating septic arthritis in the equine by repeated join lavage: a series of 39 cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 47(6): 351-365.

139. Mehta S, Humphrey JS, Schenkman DI, Seaber AV, Vail TP. (1996). Gentamicin distribution from a collagen carrier. *J Orthop Res*. 14(5): 749-54.

140. Meyer JD, Falk RF, Kelly RM, Shively JE, Withrow SJ, Dernell WS, Kroll DJ, Randolph TW, Manning MC. (1998). Preparation and in vitro characterization of gentamycin-impregnated biodegradable beads suitable for treatment of osteomyelitis. *J Pharm Sci.* 87(9): 1149-1154.

141. Minabe M, Uematsu A, Nishijima K, Tomomatsu E, Tamura T, Hori T, Umemoto T, Hino T. (1989). Application of a local drug delivery system to periodontal therapy: I. Development of collagen preparations with immobilized tetracycline. *J Periodontol.* 60(2): 113-117.

142. Murray WR. (1984). Use of antibiotics containing bone cement. *Clin Orthop*, 190: 89-95.

143. Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE. (1990). Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(10): 2019-2023.

144. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1993). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically -3rd ed. Approved Standard NCCLS Document M7-A3, NCCLS, Villanova, PA.13:(25).

145. Nelson CL, McLaren SG, Skinner RA, Smeltzer MS, Thomas JR, Olsen KM. (2002). The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets. *J Orthop Res.* 20(4): 643-647.

146. Nelson RW, Couto CG. (2005). Medicina interna de animales pequeños. 3a ed. Intermedica. BSAS. 2: 1453 p.

147. Nelson CL. (2004). The current status of material used for depot delivery of drugs. *Clin Orthop Rel Res*, 427: 72-78.

148. Nelson CL, Griffin FM, Harrison B material used for depot delivery of drugs. *Clinical Orthopaedics Related Research,* Vol. 4H, y Cooper RE. (1992). In vitro elution

characteristics of commercially and noncommercially prepared antibiotic PMMA beads. *Clin Orthop Rel Res,* 284: 303-309.

149. Neut D, van der Belt H, Stokroos L, van Hom JR, van der Mei HC, y Busscher HJ. (2001). Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimic Chemother,* 47(6): 885-891.

150. Nie L, Nicolau DP, Nightingale CH, Browner BD, Quintiliani R. (1995). In vitro elution of ofloxacin from a bioabsorbable polymer. *Acta Orthop Scand,* 66(4): 365-368.

151. Organ CH. (1971). The utilization of massive doses of antimicrobial agents with isolation perfusion in the treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Rel Res,* 76: 185-193.

152. Orsini JA, Moate PJ, Engiles J, Norman T, Poppenga R, Benson CE, Boston RC. (2004). Cefotaxime kinetics in plasma and synovial fluid following intravenous administration in horses. *J Vet Pharmacol Ther*, 27(5): 293-298.

153. Orsini JA, Moate PJ, Boston RC, Norman T, Engiles J, Benson CE, Poppenga R. (2005). Pharmacokinetics of imipenem-cilastatin following intravenous administration in healthy adult horses. *J Vet Pharmacol Ther*. 28(4): 355-361.

154. Orsini JA, Divers T. (2008). Equine Emergencies: Treatment and Procedures. 3a ed. Philadelphia, Saunders Elsevier. 838 p.

155. Overbeck JP, Winckler ST, Meffert R, Törmälä P, Spiegel HU, Brug E. (1995). Penetration of ciprofloxacin into bone: a new bioabsorbable implant. *J Invest Surg.* 8(3): 155-162.

156. Osteoset® T. Medicated Bone Graft Substitute. Technical Monograph. Wright. http://www.ossano.no/Produkter/Bensubstitut/Osteoset/651-1097%20R5.06%20OSTEOSET%20T%20Tech%20Monograph.pdf (Pág. Vista el 6/8/2014).

157. Owen MR, Moores AP, Coe RJ. (2004). Management of MRSA septic arthritis in a dog using a gentamicin-impregnated collagen sponge. *J Small Anim Pract.* 45(12): 609-612.

158. Pecora G, Andreana S, Margarone III JE, Covani U, Sottosanti JS. (1997). Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 84(4): 424-429.

159.