

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y Microbiología
Programa de Doctorado en Microbiología

**Efecto de las modificaciones obtenidas
mediante anodizado de aleaciones de titanio
en la adherencia bacteriana y la
osteointegración para la prevención local de
las infecciones de prótesis articular**

Tesis doctoral presentada por:
John Jairo Aguilera Correa

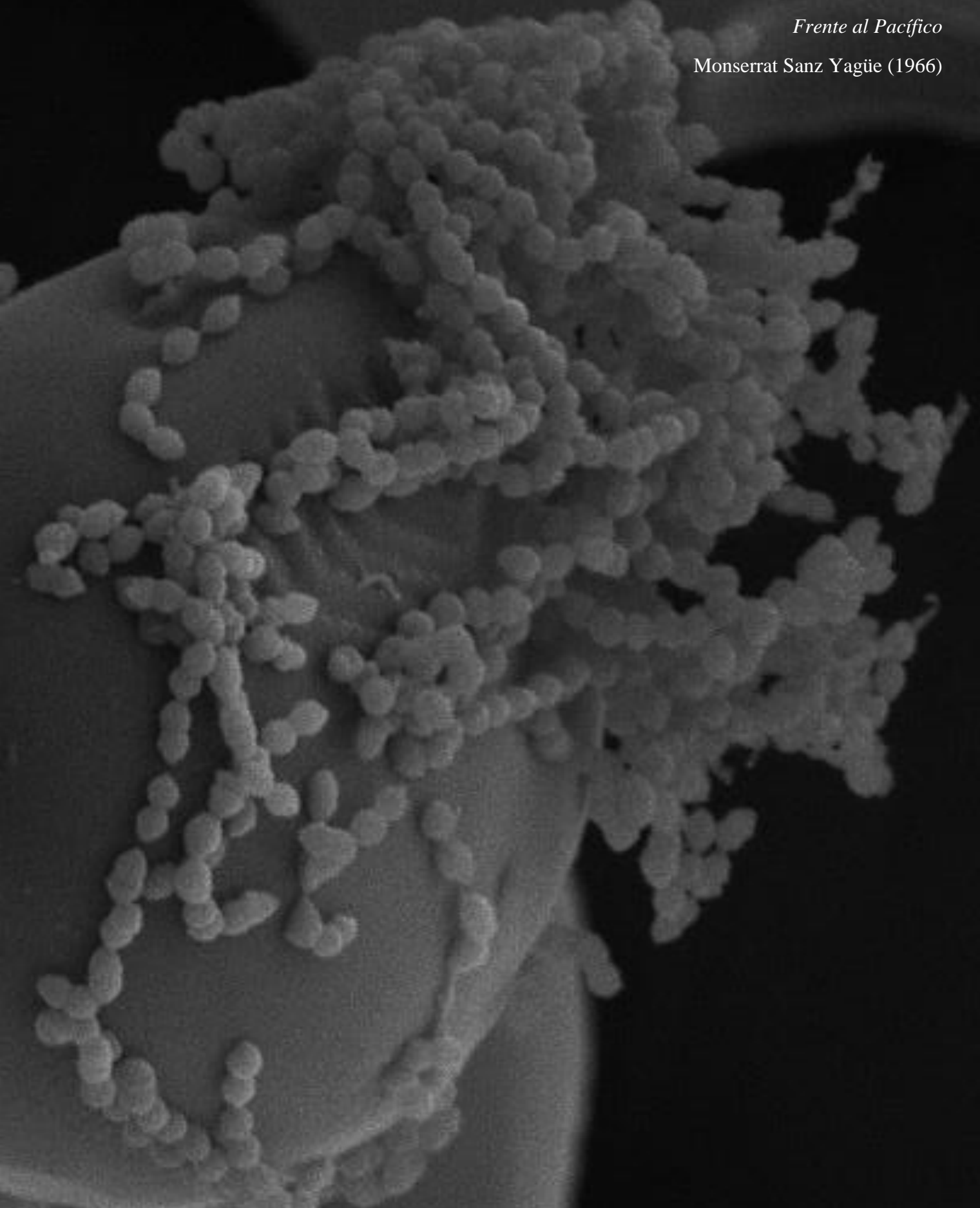
Director de la tesis:
Jaime Esteban Moreno

Madrid, 2018

“Al término de la guerra, no teníamos arroz para comer”, le aclaró. “Entendimos que solo trabajando juntos e intensamente seríamos capaces de vencer al hambre y a la miseria. Así que nos convertimos nosotros mismos en arroz cocido: cuanto más pegados unos granos a otros, más fuertes nos hacíamos”.

Frente al Pacífico

Monserrat Sanz Yagüe (1966)



Biofilm de *Streptococcus oralis* ATCC 9811 sobre Cerasorb® a 10.000 aumentos. Micrografía realizada en colaboración con el Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial de la Universidad Carlos III de Madrid (2016).

Agradecimientos

A Jaime Esteban Moreno, jefe asociado e investigador del departamento de Microbiología clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, por la toda confianza depositada durante estos años; y por ofrecerme la oportunidad de investigar, hipotetizar y aprender sin coartación, permitiéndome crecer como investigador bajo su atenta dirección y compañía.

A Ana Conde del Campo, María Ángeles Arena Vara y Juan José de Damborenea González, investigadores de grupo de Corrosión y Protección de Materiales Metálicos del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por cada una de las (numerosas) muestras; por creer en mis ocurrentes ideas; por poner a mi alcance las tecnologías más avanzadas para demostrarlas y por contribuir en mi aprendizaje sobre todo lo que sé hoy sobre los biomateriales metálicos.

A Antonio Luis Doadrio Villarejo, profesor del departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por realizar la carga antibiótica en los materiales y todos los análisis de cromatografía líquida de alta eficacia requeridos y citados en este trabajo.

A Arancha Mediero Muñoz, investigadora de la Unidad de Reumatología y Patología ósea del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, por realizar todos los estudios celulares *in vitro* citados en este trabajo.

A Ignacio Mahillo Fernández, jefe del Servicio de Epidemiología y Bioestadística del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, por atender amablemente a cada una de mis dudas respecto al abordaje estadístico de mis resultados y por realizar aquellos que escaparon a mi capacidad.

A Álvaro Auñión Rubio, médico interno residente del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, por haber realizado cada una de las intervenciones quirúrgicas necesarias para este trabajo.

A Macarena Boiza Sánchez, médica interna residente del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, por realizar todos los estudios anatomopatológicos necesarios para este trabajo.

A las farmacéuticas internas residentes del Servicio de Microbiología clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, en especial a Marta García Coca, Alicia Macías Valcayo y Llanos Salar Vidal, y a David Romera García, investigador predoctoral de la Fundación Conchita Rábago del servicio, por la camaradería, todas las risas y los buenos momentos que han alegrado, aligerado y mejorado día a día mi trabajo en el laboratorio.

A todo el Servicio de Microbiología clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz en general, a Ignacio Gadea Gironés, jefe del servicio; a Ricardo Fernández Roblas, jefe asociado del servicio; a Concepción Pérez-Jorge Peremarch, facultativa adjunta del servicio; y a todos los técnicos especialistas, por compartir esos conocimientos que solo la experiencia da y por su buena y desinteresada disposición a la hora de ayudarme en todo lo posible.

A todo el Servicio de Experimentación animal y Cirugía experimental del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, a Carlos Castilla Reparaz, a Carlos Carnero Guerrero, a Juana de la Cruz García-Silvestre, a Irene Cuevas López y a Diego Eguibar Blázquez; por el trato ameno y todos los conocimientos transmitidos que han sentado la sólida y creciente base que poseo sobre experimentación animal.

A Isabelle Schalk, investigadora del departamento de Metales y microorganismos: Biología, Química y aplicaciones de la Universidad de Estrasburgo (Francia), por haberme proporcionado las cepas mutantes de *P. aeruginosa* ATCC 15692 utilizadas en este trabajo.

A mi familia y amigos, por el respaldo brindado en cada momento a lo largo de estos años.

A todos y cada uno de ellos: muchas gracias. Sin su colaboración, este trabajo no hubiera sido posible.

Este trabajo ha sido íntegramente financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, dentro del Programa estatal de Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación orientado a los Retos de la Sociedad (MAT2013-48224-C2-1-R y MAT2013-48224-C2-2-R), proyecto beneficiario de una ayuda para la formación del personal investigador (FPI) (BES-2014-069007), concedida y aprovechada por el doctorando.

Comunicaciones a congresos y publicaciones originales relacionadas con la tesis

Comunicaciones a congresos

- Aguilera-Correa, JJ;** Doadrio, AL; Conde, A; Arenas MA; De-Damborenea JJ; Marín, M; Vallet-Regí, Esteban, J. 2015. *Antibiotic release from fluoride-TiO₂ nanostructured anodic layers on Ti6Al4V alloy*. XXIIIth Annual Meeting of European Orthopaedic Reseach Society (Bristol, Reino Unido) (Póster).
- Doadrio, AL; Conde, A; Arenas MA; De-Damborenea JJ; Marín, M; Esteban, J; **Aguilera-Correa, JJ;** Vallet-Regí, M. 2016. *Desarrollo de superficies multifuncionales de Ti para aplicaciones biomédicas*. XIV Congreso Nacional de Materiales (Gijón, España) (Póster).
- Aguilera-Correa, JJ;** Conde, A; Arenas, MA; De-Damborenea, JJ; Esteban, J. 2016. *Evaluación de la actividad bactericida de la aleación Ti13Nb13Zr*. XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (Málaga, España). (Póster).
- Aguilera-Correa, JJ;** Doadrio, AL; Conde, A; Arenas MA; De-Damborenea JJ; Marín, M; Vallet-Regí, M; Esteban, J. 2016. *Bactericidal effect of fluoride-TiO₂ nanotubular anodic layers on Ti6Al4V loaded with gentamicin and vancomycin*. XXVIth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Ámsterdam, Holanda) (Póster).
- Aguilera-Correa, JJ;** Doadrio, AL; Conde, A; Arenas MA; De-Damborenea JJ; Marín, M; Esteban, Esteban, J. *Evaluation of the interaction between fluorine-phosphorus doped titanium alloy and prosthetic joint infection-related bacteria*. XXIVth Annual Meeting of European Orthopaedic Reseach Society (Múnich, Alemania) (Presentación oral).

Publicaciones

- Aguilera-Correa, JJ;** Conde, A; Arenas, MA; de-Damborenea, JJ; Marin, M; Doadrio, AL; Esteban J. *Bactericidal activity of the Ti-13Nb-13Zr alloy against different species of bacteria related with implant infection*. *Biomed Mater*. 2017 Aug 11;12(4):045022.
- Aguilera-Correa, JJ;** Doadrio, AL; Conde, A; Arenas MA; De-Damborenea JJ; Marín, M; Vallet-Regí, M; Esteban, J. *Antibiotic release from fluorine-doped nanostructured Ti6Al4V as a method to prevent bacterial adherence to the material*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017 (under review).
- Aguilera-Correa, JJ;** Mediero, A; Conde, A; Arenas, MA; de-Damborenea, JJ; Marin, M; Doadrio, AL; Esteban J. *Microbiological and cell evaluation of fluorine-phosphorus doped titanium alloy: a novel antibacterial and osteostimulating biomaterial with potential applications in orthopaedic surgery*. *Biomaterials Science*. 2017 (under review).

Resumen

El fracaso de las prótesis articulares se relaciona principalmente con el aflojamiento aséptico y las infecciones, ambas están asociadas con una alta morbilidad y un costo sustancial para el paciente y la salud pública. El desarrollo de un nuevo biomaterial capaz de estimular el crecimiento óseo al mismo tiempo que previene a nivel local la adherencia y/o la viabilidad bacteriana reduciría notablemente este fracaso.

En este trabajo se evaluó: la liberación y la capacidad bactericida de nanotubos dopados con F de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y vancomicina mediante el método de inmersión, y la compleja interacción entre bacterias de importancia clínica, células y nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V *in vitro*, e *in vivo*, usando un modelo animal de conejo. Además, se evaluó la capacidad bactericida de la aleación Ti-13Nb-13Zr sobre distintas especies de bacterias.

El método de inmersión es un método de carga sencillo de antibiótico en nanoestructuras creadas sobre aleaciones de uso clínico, que añade a las propiedades de las capas nanotubulares dopadas con F fabricadas sobre Ti-6Al-4V una más: la capacidad bactericida debida a los antibióticos incorporados y personalizables en función de cada caso. Los nanotubos dopados con F de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y vancomicina mostraron una liberación máxima a los 120 y los 180 min, respectivamente. La carga de ambos antibióticos sobre estos nanotubos dopados con F pareció ser el tratamiento antibiótico local más adecuado, pues fue capaz de disminuir la viabilidad de grampositivos y gramnegativos simultáneamente, al menos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La interacción entre las bacterias y los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V fue compleja, ya que la adherencia de cuatro especies bacterianas disminuyó (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* y *Stenotrophomonas maltophilia*), mientras que *P. aeruginosa* mostró una adherencia ligeramente superior. El aluminio liberado puede ser quelado por los sideróforos bacterianos y este complejo aluminio:sideróforo únicamente ser retenido por bacterias gramnegativas. La viabilidad de *Staphylococcus sp.* y *S. maltophilia* disminuyó debido al aluminio liberado del interior de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V. *P. aeruginosa* presentó la capacidad de movilizar aluminio a partir de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V. Este material presentó un efecto osteoestimulador sobre las células MC3T3-E1, pues produjo un aumento significativo en la proliferación celular, la mineralización de la matriz y la expresión génica relacionada con la diferenciación celular ósea.

Las capas anódicas de nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V mostraron una osteointegración igual o superior cualitativamente y *P. aeruginosa* mostró una infectividad semejante a la hora de desarrollar una infección sobre ambos materiales *in vivo*. La monitorización de los niveles de aluminio total en la orina de conejos con un implante permitió determinar la presencia o ausencia de infección producida por *P. aeruginosa* en implantes de Ti-6Al-4V, al menos durante los primeros siete días en el caso de la aleación Ti-6Al-4V pulida químicamente y durante los primeros 15 días en el caso de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V.

Cuando los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V se carga con gentamicina y vancomicina, ambos antibióticos alcanzaron una concentración máxima a los 240 min, tiempo superior al alcanzado cuando se cargaron en nanotubos dopados solo con F. Además, la carga de la mezcla de gentamicina y vancomicina no afecta a la capacidad *in vitro* de osteointegración sobre las células MC3T3-E1 que poseen los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V.

La capacidad bactericida frente a bacterias gramnegativas, al menos contra *E. coli* y *P. aeruginosa*, de la aleación Ti-13Nb-13Zr pulida mecánicamente fue debida al efecto bactericida de los radicales hidroxilo resultantes de la ionización ZrO_2 a ZrO_2^- .

Índice

1. Introducción	1
1.1. Infección de prótesis articular	1
1.2. Manifestación clínica	2
1.3. Patogénesis.....	3
1.3.1. Agentes causantes	3
1.3.2. <i>Biofilm</i>	4
1.3.3. Rol del cuerpo extraño	7
1.4. Diagnóstico	9
1.5. Tratamiento de las infecciones de prótesis articular.....	10
1.6. Prevención de las infecciones de prótesis articular	11
1.7. Biomateriales metálicos en pro de la osteointegración y contra la infección.....	12
1.7.1. Biomateriales metálicos pro osteointegración.....	14
1.7.2. Biomateriales metálicos contra las infecciones de prótesis articular	15
2. Hipótesis.....	19
3. Objetivos	21
4. Material y métodos.....	23
Aleación Ti-6Al-4V:	23
4.1. Estudio de la liberación y la capacidad bactericida de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V y cargados con gentamicina, vancomicina y/o la mezcla de ambos antibióticos.....	23
4.2. Evaluación de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V	25
4.3. Evaluación <i>in vitro</i> de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina.....	32
Aleación Ti-13Nb-13Zr.....	33
4.4. Estudio de la posible capacidad bactericida de la aleación Ti-13Nb-13Zr en comparación con la aleación Ti-6Al-4V	33
Análisis estadísticos	34
5. Resultados y discusión	37
Aleación Ti-6Al-4V	37
5.1. Estudio de la liberación y la capacidad bactericida de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V y cargados con gentamicina, vancomicina y/o la mezcla de ambos antibióticos	37

5.2. Evaluación de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V	41
5.3. Evaluación <i>in vitro</i> de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina.....	59
Aleación Ti-13Nb-13Zr.....	61
5.4. Estudio de la posible capacidad bactericida de la aleación Ti-13Nb-13Zr en comparación con la aleación Ti-6Al-4V	61
6. Conclusiones	67
Referencias bibliográficas	69

1. Introducción

1.1. Infección de prótesis articular

Las articulaciones sinoviales naturales, por ejemplo: la cadera, la rodilla, el hombro o el codo, son complejas y delicadas estructuras anatómicas cuyo correcto funcionamiento se debe a la combinación de cartílago articular, tejido conectivo de carga que recubre los huesos que componen la articulación y un fluido sinovial que nutre y es secretado en el área articular [1]. La carga básica funcional de una cadera mientras se anda, por ejemplo, está comprendida entre tres y seis veces el peso corporal de la persona en cuestión, mientras se corre o salta esta carga puede suponer hasta 10 veces el peso corporal [2]. Desafortunadamente, este tipo de articulaciones son propensas a sufrir fracturas y a desarrollar enfermedades inflamatorias y degenerativas como: osteoartrosis, artritis reumatoides, condromalacia y otras que provocan dolor crónico y su mal funcionamiento [1, 3, 4].

La artroplastia es un procedimiento quirúrgico que reemplaza una articulación natural degenerada por un material artificial o prótesis articular. Este tipo de intervención es altamente efectiva y ha mejorado la calidad de vida de muchos pacientes, proporcionándoles alivio del dolor, restaurando la función articular, disminuyendo la morbilidad, y aumentando su independencia [3]. Menos del 10% de los receptores de una prótesis articular desarrolla alguna complicación relacionada con el implante a lo largo de su vida [5]. Las causas de este fracaso incluyen

principalmente el aflojamiento aséptico y la infección de prótesis articular, aunque pueden aparecer otras causas como la dislocación y la fractura ósea y de prótesis.

El aflojamiento aséptico es la causa más común de fracaso en las prótesis articulares y puede alcanzar una incidencia del 8 al 10% [6]. La patogénesis de este aflojamiento incluye procesos inflamatorios y osteolíticos. La respuesta inflamatoria crónica desencadenada por las micropartículas del implante en la interfaz implante-hueso se manifiesta mediante el reclutamiento de una amplia gama de tipos de células que incluyen: macrófagos, fibroblastos, células gigantes, neutrófilos, linfocitos y, principalmente osteoclastos. Esta respuesta celular implica la secreción de citoquinas osteoclastogénicas e inflamatorias que favorecen una actividad osteoclástica exacerbada y osteólisis que conduce inevitablemente a la pérdida de la funcionalidad de la prótesis y su aflojamiento mecánico [7].

La infección de prótesis articular (IPA) es la segunda causa más frecuente, y posiblemente, la más devastadora de todas las complicaciones asociadas a estos implantes debido a la alta morbilidad y los elevados costes personales y sanitarios con los que está relacionada.

En nuestro país no existen datos oficiales de la incidencia real de este tipo de infecciones [8] ni a nivel autonómico, ni a nivel nacional. Sin embargo, se estima que el número de



Figura 1. Radiografía anteroposterior (a) y lateral (b) de prótesis total de rodilla infectada de un varón de 64 años 13 meses después de la artroplastia primaria. La infección debutó con un dolor agudo articular de 24 horas de evolución sin claro antecedente traumático y estaba provocada por un *Staphylococcus lugdunensis* (c).

artroplastias es de unas 30.000 por año, con una incidencia media de infección del 3 o 4%, si se considera la población de pacientes con artritis reumatoide, diabetes, obesidad o sometidos a repetidos recambios, grupo de enfermos de frecuencia creciente [8, 9]. En otros países, esta incidencia es del 1-2% en Estados Unidos [10, 11], y del 0,6-0,72% en los países nórdicos (Dinamarca, Noruega, Finlandia y Suecia) [12]. Afortunadamente la tasa de infección en España ha disminuido desde los años 70, donde rondaba entre el 5 al 10 % [13], pero dado que cada año aumenta este número de intervenciones, aumenta también el número de pacientes susceptibles a desarrollar este tipo de infección [10].

El impacto de las IPA se agrupa en dos niveles: a nivel personal y a nivel económico. A nivel personal, este tipo de infecciones expone a los pacientes que las padecen a medidas terapéuticas que se asocian con una gran comorbilidad: pérdida de independencia y movilidad, e incluso, la amputación de la extremidad infectada o la muerte. A nivel económico, se estima que el coste sanitario con el que se asocia una infección de prótesis articular oscila entre 7.000 y 24.000€ [13, 14], por lo que teniendo en cuenta únicamente el número de prótesis de rodilla y cadera y sus respectivas tasas de infección, este tipo de infecciones podrían suponer al Sistema Nacional de Salud entre 7 y 24 millones de euros al año.

Los factores de riesgo relacionados con el paciente para contraer este tipo de infecciones incluyen: artroplastia de revisión, infección de prótesis previa en la misma articulación, abuso de tabaco, obesidad, malnutrición, inmunodepresión, enfermedad renal crónica, infecciones urinarias recurrentes, artritis reumatoide, psoriasis, neoplasia, inmunosupresión y diabetes [15]. Durante la cirugía y el posoperatorio, otros factores que pueden favorecer la infección son: la realización de artroplastias bilaterales simultáneas, la duración de la cirugía (>2,5h), complicaciones en la cicatrización de la herida (infección superficial, hematomas, cicatrización retardada, necrosis o dehiscencia de la herida quirúrgica), fibrilación auricular, infarto de miocardio, infecciones del tracto urinario, hospitalización prolongada y bacteremias [15]. Además, cada uno de estos factores puede influir en mayor o menor medida en función del tipo de prótesis articular que se implante.

1.2. Manifestación clínica

Las manifestaciones clínicas de las IPA dependen de: la virulencia del microorganismo, el tiempo de inicio de la infección, la respuesta inmune del huésped, la estructura del tejido blando inmediatamente en contacto con la articulación y la articulación involucrada [11] (Figura 1). Los principales síntomas

Clasificación	Características
Según la ruta de infección*	
Perioperatoria	La inoculación del microorganismo en la herida quirúrgica se produce durante la cirugía o inmediatamente después
Hematógena	La inoculación del microorganismo se produce por diseminación a través de la sangre o la linfa desde un foco distante de infección
Contigua	La inoculación del microorganismo se produce desde un foco adyacente de infección (por ej.: traumatismo penetrante, osteomielitis preexistente o lesiones de piel o tejidos blandos).
Según el inicio de los síntomas después de la artroplastia §	
Temprana (≤ 1 mes)	Generalmente suelen ser infecciones perioperatorias producidas por microorganismos altamente virulentos por lo que debutan con signos inflamatorios locales, celulitis y secreción purulenta de la herida quirúrgica.
Crónica tardía (>1 mes)	Son infecciones perioperatorias producidas por organismos menos virulentos con sintomatología larvada, en la prima el dolor de características mecánicas o inflamatorias.
Hematógena aguda	Son infecciones hematógenas causadas por diseminación desde un foco de infección remoto que cursan con dolor, fiebre e inflamación local en prótesis indolentes hasta el momento.
Cultivos intraoperatorios positivos	Más de dos cultivos positivos intraoperatorios en pacientes con sospecha intraoperatoria de aflojamiento aséptico recurrente.

Tabla 1. Clasificación de las infecciones de prótesis articular según la ruta de infección y según el inicio de los síntomas después de la artroplastia. *: [5, 16]. §: [8, 18].

varían dependiendo del tipo de infección, y pueden incluir dolor, hinchazón o edema articular, eritema y fiebre local alrededor de la articulación, fiebre sistémica y/o la presencia de un tracto fistuloso que comunica el exterior directamente con la prótesis [5, 11]. Según la ruta de infección y el momento del inicio de los síntomas en relación con la cirugía primaria, las IPA pueden clasificarse en distintos tipos (Tabla 1).

1.3. Patogénesis

1.3.1. Agentes causantes

Los estafilococos, tanto *Staphylococcus aureus* (30-40%) como distintas especies de estafilococos coagulasa negativos (27-43%), entre los que predomina *S. epidermidis*, son los agentes etiológicos más comunes que se asocian con las IPA. Dentro de los estafilococos, cabe destacar la variante de *S. aureus* de colonia pequeña (*small-colony variant*, SCV) que se caracteriza por su

capacidad de invadir y proliferar intracelularmente en el interior de fibroblastos y osteoblastos y por dar lugar a infecciones recidivantes y más difíciles de tratar [16].

Dentro de las bacterias gramnegativas (3-9%) [5, 11], destacan las enterobacterias y los bacilos gramnegativos no-fermentadores. Dentro de las enterobacterias las especies más frecuentes (en orden descendente), son: *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens* [17]. Dentro de los bacilos gramnegativos no-fermentadores destacan las especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (principalmente *P. aeruginosa*), *Acinetobacter* y *Ralstonia* [18]. Es importante señalar que las IPA causadas por microorganismos gramnegativos ha aumentado de forma significativa desde el año 2003 hasta el 2012, a la par que las producidos por microorganismo

multirresistentes [17]. Así, estas infecciones provocadas por bacilos gramnegativos no-fermentadores pueden alcanzar hasta el 45% de los casos en determinadas cohortes [19].

Otras bacterias grampositivas, como los estreptococos (9-10%) [11], especialmente *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus spp.* (8%), cuyo principal representante es *E. faecalis* en más de 90 % de los casos [18], también son aislados con relativa frecuencia. Dentro de los microorganismos anaerobios estrictos, destaca *Propionibacterium acnes* que puede llegar a representar hasta el 5% de las IPA, especialmente relacionada con las prótesis de hombro [17]. Menos del 1% de este tipo de infecciones están producidas por otros microorganismos, como: *Mycobacterium spp.* (incluyendo el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter spp.*, *Legionella spp.* y *Corynebacterium spp.* Dentro del género *Mycoplasma*, aunque ya se conocía desde hace años la capacidad de causar IPA de *M. pneumoniae* [20] y *M. hominis* [21], recientemente han sido identificadas nuevas especies como causantes de este tipo de infección, tales como *M. salivarium* [22] y *M. capricolum* [23].

Los hongos, tanto levaduras como hongos filamentosos causan estas infecciones de forma poco frecuente, pero recientes estudios apuntan a, que debido a la enorme cantidad de pacientes que se someten a este tipo de intervenciones y que poseen más comorbilidades que obligan a administrar fármacos inmunosupresores y antibióticos de amplio espectro, el aislamiento de este tipo de microorganismos ha aumentado en los últimos años [17]. Dentro de las levaduras, destacan las especies del género *Candida*, principalmente *C. albicans*, aunque también se han registrado casos por *Cryptococcus neoformans* o incluso *Histoplasma capsulatum*. Dentro de los hongos filamentosos, se han reportado casos de infecciones producidas por especies del género *Aspergillus* y diversas especies de zigomicetos [18].

Las infecciones polimicrobianas o las causadas por más de un microorganismo, pueden tener lugar de un 10 a un 35% de los casos [5, 11]. Las especies del género *Enterococcus*, *Staphylococcus* y diversos bacilos gramnegativos, como enterobacterias y *P. aeruginosa* suelen estar asociadas a estas infecciones.

Uno de los mayores desafíos del manejo de las IPA es el caso de los cultivos negativos, ya que pueden suponer del 5 al 41% [18], aunque la verdadera proporción suele concentrarse entre un 7 y un 15% de los casos [11]. Estos pacientes presentan evidencias claras de infección, pero no es posible alcanzar un diagnóstico microbiológico que permita identificar al agente causal. Este tipo de cultivos se suelen asociar a pacientes con tratamientos antimicrobianos prolongados previos a la toma de muestras y con infecciones tempranas [11].

1.3.2. *Biofilm*

Una de las características que comparten todos los microorganismos capaces de producir una IPA es su capacidad de formar *biofilm*. Como excepción, cabe citar el caso de infección tardía hematogena de rodilla provocada por una cepa de *Pasteurella multocida* no-formadora de *biofilm in vitro* con la metodología empleada [24].

Un *biofilm* es un conglomerado de células microbianas de al menos una misma especie que se asocia irreversiblemente o no a una superficie o a una interfase y están embebidas en una matriz de sustancias extracelulares poliméricas producida por ellas mismas [25], donde imperan numerosas y complejas interacciones sociomicrobiológicas [26-28]. Se estima que al menos el 80% de las infecciones crónicas están directamente relacionadas con la capacidad del microorganismo causante de desarrollar un *biofilm* [29].

El desarrollo del *biofilm* es una de las formas de crecimiento más ampliamente distribuidas, exitosas [30] y ancestrales en la Tierra, ya que las primeras evidencias fósiles

microbianas tienen una antigüedad de entre 3.300 y 3.400 millones de años [31]. Por esto, es una característica conservada en los filos más antiguos del árbol filogenético de los dominios procariotas *Archaea* y *Bacteria*: Korarchaeota y Aquificales, respectivamente [31].

Los *biofilms* asociados a superficies pueden formarse en una amplia variedad de las mismas, incluyendo tejidos vivos, dispositivos médicos permanentes, tuberías industriales o de sistemas de agua potable, sistemas acuáticos naturales, etc. [31, 32]. En el ámbito clínico, los *biofilms* bacterianos pueden desarrollarse en superficies naturales como: los dientes, las válvulas cardíacas, los pulmones, el oído medio, los senos nasales y paranasales, el hueso y heridas crónicas; y en superficies inertes de dispositivos médicos como: prótesis articulares, catéteres intravenosos o urinarios, *stents* [33], implantes mamarios, mallas quirúrgicas y tubos de drenaje, entre otros.

La formación del *biofilm* comprende al menos tres etapas diferentes:

- Adherencia. El primer paso consiste en el contacto de los microorganismos con la superficie, un proceso que es por lo menos en parte estocástico, impulsado por el movimiento browniano y las fuerzas gravitatorias, e influenciado por las fuerzas hidrodinámicas circundantes [32, 34]. En una superficie determinada, los microorganismos encuentran fuerzas atrayentes o repelentes que varían dependiendo de los niveles de nutrientes, pH, fuerza iónica y temperatura. Las propiedades del medio, junto con la composición de la superficie celular bacteriana, afectan a la velocidad y la dirección con las que la bacteria se adhiere a la superficie de contacto [32]. Las bacterias gramnegativas móviles tienen una ventaja competitiva, utilizando flagelos y pili para superar las fuerzas hidrodinámicas y repulsivas [34, 35]. El proceso de adherencia se compone

de dos fases consecutivas que incluye una fase inicial, instantánea y reversible en la que el microorganismo en fase planctónica pasa a fase sésil o adherida (adherencia reversible) (Figura 2. 1), y una fase celular, tiempo-dependiente e irreversible (adherencia irreversible) [36], cuya irreversibilidad depende del inicio de la producción de exopolisacáridos, DNA y proteínas que favorecen la adherencia, el crecimiento y la autoorganización de las bacterias [35] (Figura 2.2.). Además, *in vivo*, las proteínas de la matriz cubren rápidamente la superficie de dispositivos médicos, facilitando la adherencia específica mediada por los componentes de superficie microbianos que reconocen moléculas de la matriz adhesiva (*microbial surfaces components recognizing adhesive matrix molecules*, MSCRAMMs) [37, 38], que forman parte de la superficie de muchas bacterias como, por ejemplo, *Staphylococcus spp.*

- Maduración. Esta fase se caracteriza por (1) la agregación intercelular acoplada a una variedad de moléculas como proteínas o, normalmente, exopolisacáridos de naturaleza polisacáridica, y, (2) fuerzas estructurantes del *biofilm* que lo reordenan en estructuras tridimensionales de morfología variable en función de la especie y con microcanales en su interior [37]. Durante esta etapa, uno de los procesos más importantes es la producción de la matriz de exopolisacáridos, descrita por primera vez por Zobell & Allen en 1935 [39]. Esta matriz es un hidrogel [31] compuesto de un 90% de agua y un 10% de biopolímeros que incluyen: polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y surfactantes [40]. La composición de la matriz extracelular es característica de cada especie, e incluso de cada cepa [37, 38, 41, 42].

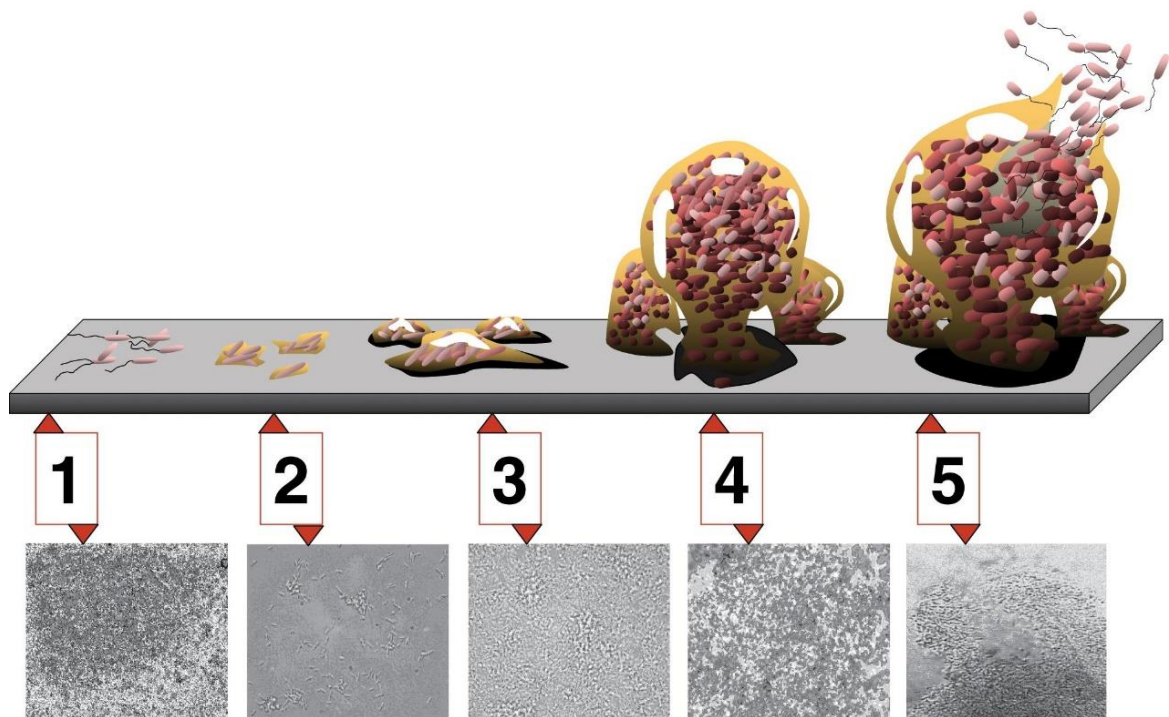


Figura 2. Etapas del desarrollo de del *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa*. 1. Adherencia reversible. 2. Adherencia irreversible. 3. Maduración 1 (el *biofilm* se compone de cúmulos de células y matriz de menos de 10 μm de grosor en los que las células están en su mayoría en contacto con el sustrato). 4. Maduración 2 (el *biofilm* se compone de cúmulos de células envueltas en su matriz totalmente desarrollados con un grosor igual o superior a 100 μm y en el que la mayoría de las células no están adheridas directamente al sustrato). 5. Dispersión. Cada etapa de desarrollo en el diagrama se empareja con una micrografía de un *biofilm* en desarrollo. Todas las micrografías se muestran a la misma escala [35].

La matriz desempeña muchas funciones: de adherencia (tanto a superficies orgánicas como inorgánicas), de cohesión (tanto entre células como entre la matriz y el componente celular), de protección (evita la desecación dado su elevado contenido en agua y la naturaleza hidroabsorbente de sus componentes), de adsorción (de moléculas orgánicas, por ej.: anticuerpos, antibióticos, y compuestos inorgánicos, como metales pesados), de almacenamiento (de nutrientes, material genético, donadores y aceptores de electrones y desechos metabólicos celulares), estructurales, y de sumidero energético (en condiciones de exceso de fuentes de energía en el medio) [30, 40, 43].

En esta etapa, la estructura relativamente simple que adquirió el pre-*biofilm* en la adherencia irreversible, adquiere una organización tridimensional mucho más compleja

estructuralmente [35] (Figura 2.4), que facilita la aparición de al menos cuatro gradientes interrelacionados: un gradiente de nutrientes, un gradiente de oxígeno, un gradiente de pH y un gradiente de comunicación célula-célula o *quorum sensing* [30]. Las células localizadas en la superficie del *biofilm* se alimentan mejor y consumen más oxígeno que las situadas en capas inferiores, que tienen menos oxígeno cuanto más abajo se posicionen. Estas células más superficiales metabolizarán los nutrientes de forma más rápida y eficaz por lo que los desechos metabólicos se encargarían de disminuir el pH de las capas inferiores de forma inversamente proporcional a la profundidad del *biofilm*. El gradiente nutricional, da lugar a una gran variedad de estados (ordenados según aumenta la profundidad del *biofilm*): células metabólicamente activas, células

hambrientas, células dormantes, células viables no-cultivables, células *persisters* y células muertas [30]. El gradiente de oxígeno da lugar a, al menos, tres tipos de estados metabólicos (ordenadas según aumenta la profundidad del *biofilm*): bacterias aerobias, fermentadoras y anaerobias [30].

El *quorum sensing* es un mecanismo concentración-celular dependiente de comunicación intercelular por el que se controla la expresión de determinados genes en función de la densidad poblacional y el medio en el que se desarrolla una población microbiana [44]. Las señales de *quorum sensing* son pequeñas moléculas llamadas autoinductores, de naturaleza peptídica en grampositivas o derivados de N-acil homoserina lactona en gramnegativas [42], aunque son solamente conocidas en ciertas especies y su naturaleza puede ser probablemente mucho más variable. Esta comunicación célula-célula favorece el crecimiento celular y la maduración del *biofilm* [30, 35]. El conjunto de genes cuyo patrón de expresión se altera durante la formación del *biofilm* se reduce a un mínimo subconjunto, así, por ej.: 34 genes aumentan su expresión y 39 genes lo reducen de los 5.570 genes analizados en *P. aeruginosa* durante la formación de su *biofilm* [45], hecho que refuerza la idea de que es una respuesta específica ancestral y adaptativa muy conservada [46].

Todos los gradientes anteriormente citados, contribuyen a la aparición de distintos tipos genotípicos y fenotípicos que se expresan como distintas rutas metabólicas, respuestas al estrés y actividades biológicas específicas yuxtapuestas [47]. Los mecanismos que contribuyen a esta heterogeneidad genética y fisiológica incluyen gradientes químicos a microescala, la adaptación a determinadas condiciones

ambientales, la expresión génica estocástica y la variación genotípica que ocurre a través de mutación y selección [47].

- **Dispersión.** La dispersión es el proceso por el que las células del *biofilm* maduro se dispersan a zonas adyacentes de forma pasiva o activa [29] (Figura 2.5). A través de esta etapa, la infección se disemina a nichos adyacentes en un entorno o dentro del huésped una vez los nutrientes o el espacio se haya agotado [35], allí encontrarían donde adherirse de nuevo y volver a iniciar el ciclo. La dispersión está también estrictamente controlada por *quorum sensing*. Existen tres mecanismos distintos de dispersión del *biofilm* no excluyentes: (1) dispersión por buceo, en la que las células son liberadas a partir de microcolonias al medio líquido o superficies adyacentes; (2) dispersión por acúmulos, en la que pequeños agregados del *biofilm* (células y matriz) son liberados al medio circundante; y (3) dispersión superficial, en la que estructuras completas del *biofilm* avanzan sobre la superficie [31].

In vivo, la apariencia y estructura de los *biofilms* asociados a biomateriales difieren de las observadas *in vitro*. Así, estos *biofilms* carecen de grandes estructuras tridimensionales, contienen nuevos componentes resultantes de la mezcla del *biofilm* con biomoléculas del hospedador, y se presentan en forma de colonias pequeñas y heterogéneamente distribuidas a lo largo del implante [48].

1.3.3. Rol del cuerpo extraño

La patogénesis de las infecciones asociadas a biomateriales son el resultado de la interacción del microorganismo, el implante y el hospedador [5], lo que añade de por sí una dimensión más de complejidad a este tipo de infecciones (Figura3).

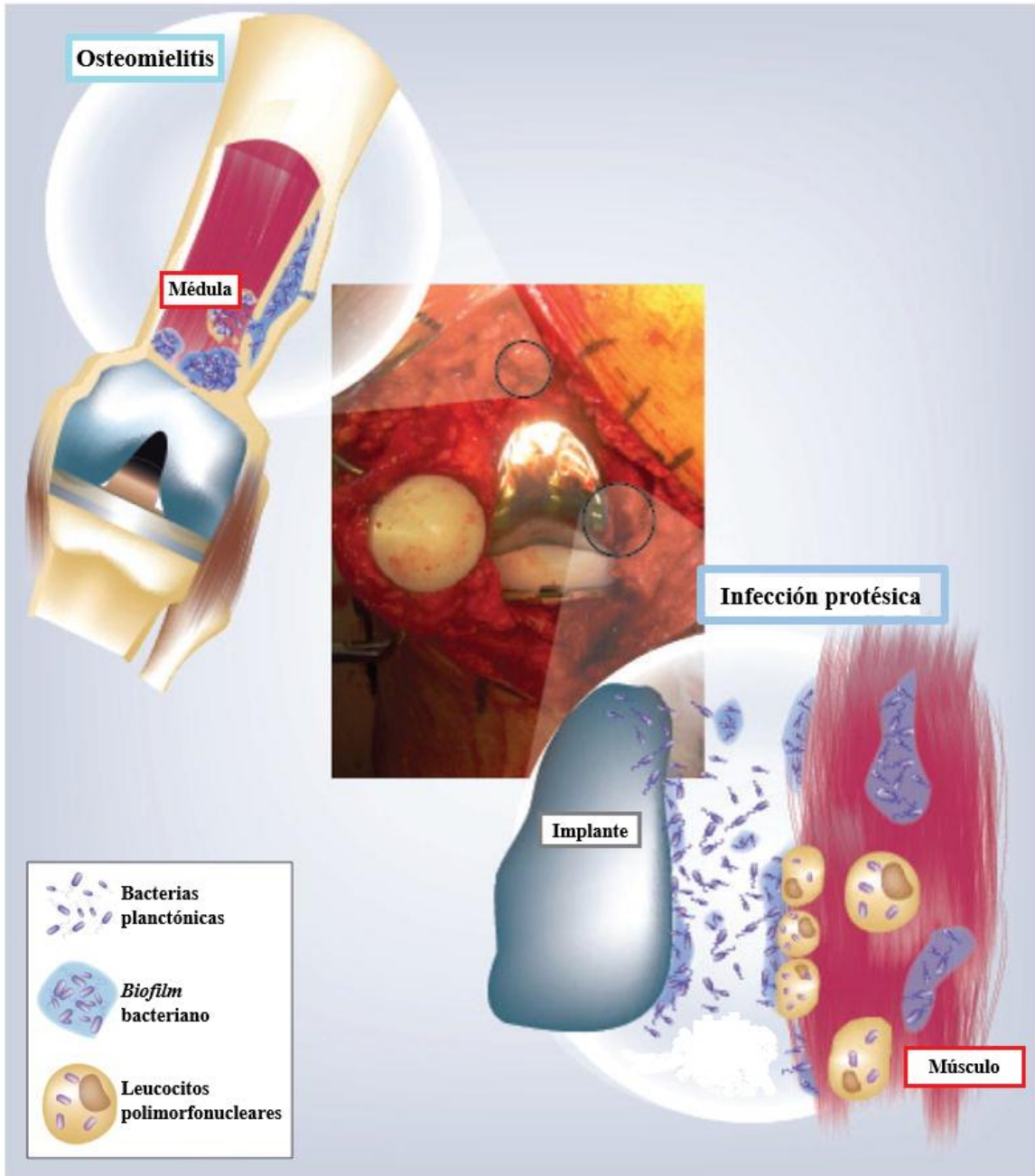


Figura 3. Cómo las bacterias y el *biofilm* podría distribuirse en una IPA usando como ejemplo una prótesis de rodilla. El *biofilm* puede crecer sobre los componentes de la prótesis, el tejido circundante y la cápsula fibrosa. Cada una de estos componentes pueden ser considerados independientemente, pero nichos comunicados. El líquido articular puede contar con células planctónicas o agregados desprendidos del *biofilm*. El tejido periprotésico puede ser invadido por las bacterias. Puede haber migración de bacterias entre cada una de las localizaciones (prótesis, superficie tisular y matriz, la superficie tisular y el fluido articular), lo que favorecería la supervivencia microbiana, ya que, aunque las bacterias en un nicho son erradicadas por desbridamiento quirúrgico o terapia antibiótica, cabría la posibilidad de que el patógeno repoblara la articulación desde otra localización [38].

En el caso de la IPA, el tejido circundante al implante puede incluir áreas de osteointegración y encapsulación fibrosa, y puede que haya una variable respuesta cuerpo extraño-hospedador que depende de la naturaleza del implante colocado [49], su composición química, resistencia a la

corrosión y su biocompatibilidad [1] (véase 1.7. *Biomateriales metálicos en pro de la osteointegración y contra la infección*).

Lo más frecuente es que en el espacio entre el biomaterial y el tejido circundante o medio intersticial sea un *locus minus resistentiae*, que literalmente significa *lugar*

de menor resistencia, caracterizado por ser una zona fibro-inflamatoria inmunodeprimida [50]. Esta zona es un entorno relativamente inaccesible para la respuesta inmune, debido a la ausencia de una irrigación sanguínea normal [35] en el tejido periprotésico, lo que mengua la capacidad de los linfocitos, los anticuerpos o ciertos antibióticos de alcanzar correctamente la superficie del implante, y así prevenir y combatir la infección a través de vía sistémica. Por ello, la prótesis será susceptible de infectarse no solo durante el perioperatorio, sino a lo largo de toda su vida útil [51].

Además, a nivel de la inmunidad celular innata, los neutrófilos se asocian rápidamente con la superficie de la prótesis implantada [52]. Estos neutrófilos se activan prematuramente por contacto con el implante, pierden la capacidad de activarse en respuesta a estímulos normales posteriores, y, además, disminuyen la actividad de otros poliformonucleares a través de la liberación de péptidos neutrofilicos humanos. Estos péptidos pueden, en condiciones determinadas, crear un ambiente hostil para el sistema inmune del hospedador [52], disminuyendo la fagocitosis, los niveles de enzimas granulares y la capacidad para desencadenar el estallido respiratorio [53].

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de las IPA está basado en una combinación de distintos hallazgos clínicos además de los resultados de distintos estudios de laboratorio a partir de sangre periférica y líquido sinovial, datos microbiológicos, evaluación histológica de tejido periprotésico y, en algunos casos, resultados de estudios de imagen, sin que ninguno de ellos por sí solo pueda ser suficiente para diagnosticar este tipo de infección. La prioridad en el diagnóstico de este tipo de infección es saber si la prótesis está realmente infectada, el microorganismo causante y su sensibilidad antimicrobiana.

Dentro de las pruebas analíticas realizadas a partir de muestras de sangre se encuentran

principalmente dos reactantes de fase aguda: la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la concentración de proteína C-reactiva (PCR). Valores por encima de 30 mm/h de VSG y de 10 mg/L de PCR, se suelen asociar con una IPA [11]. Otras pruebas complementarias, incluyen: la determinación de los niveles de interleuquina 6 y procalcitonina, aunque aún no se dispone de valores totalmente establecidos [5]. Otro biomarcador utilizado es la α -defensina, que se ha relacionado con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95% para pacientes con infección de prótesis independientemente del tipo de microorganismo (grampositivo o gramnegativo), especie o virulencia del mismo [54, 55].

La aspiración del líquido sinovial es una prueba de diagnóstico preoperatorio que puede determinar si existe una IPA y cuál es el agente etiológico a través del recuento linfocitario y el cultivo del líquido, preferiblemente en un frasco de hemocultivo para intentar aislar el microorganismo causante de la infección [56]. Un recuento de más de 1.100-4.200 linfocitos/ μ L con más del 65-80% de neutrófilos es consistente con una infección de prótesis de rodilla y cadera, respectivamente [11].

El estudio histopatológico intraoperatorio de muestras de tejido periprotésico puede determinar si existe una inflamación aguda en los tejidos en contacto con el implante como resultado de una infección asociada al mismo. El punto de corte diferencial entre una infección y un aflojamiento aséptico se ha establecido entre cinco y 10 polimorfonucleares por campo de 400 aumentos [8]. Sin embargo, este criterio no es aplicable en pacientes con inflamación crónica, en los que puede ser muy complicada su interpretación [51].

Los análisis microbiológicos son los más determinantes en las IPA. Gracias a estos, se puede identificar el microorganismo o microorganismos causantes y su sensibilidad. Dado que los cultivos de herida o tracto sinusal son a menudo positivos por

estar contaminados por la flora de la piel y no deben emplearse para el diagnóstico [51, 56], las muestras más importantes son el cultivo de muestras intraoperatorias y el procesamiento de la prótesis retirada. Los cultivos de tejidos periprotésicos son considerados el procedimiento diagnóstico de referencia, aunque la detección de cultivos falsos negativos y falsos positivos son inherentes a este tipo de infecciones [57] y dependen de la terapia antibiótica previa del paciente (por lo que se recomienda abandonarla al menos dos semanas antes de la intervención), el uso de cementos con antibióticos, la asociación de la infección al implante y no al tejido, un bajo número de microorganismos en la muestra, y/o un tiempo prolongado de transporte de la muestra hasta el laboratorio [56]. Así, se recomienda tomar al menos seis o siete muestras intraoperatorias, y se considerarán para el diagnóstico etiológico aquellos microorganismos que crezcan en al menos dos muestras [58]. La prótesis retirada o sus componentes por separado también pueden ser procesados para obtener un diagnóstico microbiológico. La ventaja de este procesamiento es que se estudia directamente el foco de la infección [51]. En este procesamiento, la sonicación de la prótesis ha permitido aumentar la sensibilidad [59] del diagnóstico, especialmente en infecciones crónicas y cuando se asocia a las muestras de tejido intraoperatorias [11]. Aunque el cultivo es el estándar de oro dentro del diagnóstico microbiológico de las IPA, debido a las dificultades que conlleva y la idiosincrasia de los microorganismos que las provocan, las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se erigen como una potencial herramienta de diagnóstico rápida y muy sensible, a pesar de que el paciente haya recibido antibióticos antes de la intervención, aunque están asociadas aún con un coste sustancialmente elevado [60, 61].

Los estudios de imagen, como las radiografías, artrografías, medicina nuclear, tomografía computarizada y la resonancia

magnética, pueden aportar información complementaria a otros estudios acerca de la migración, osteolisis, remodelación ósea, presencia de abscesos o derrames articulares y anomalías anatómicas de los tejidos blandos periprotésicos [11, 51]. Debido a la controversia de los resultados obtenidos por distintos estudios [11], determinados autores recomiendan no basarse en las técnicas de imagen para el diagnóstico de las IPA [62]. Sin embargo, respecto a los aportes del diagnóstico por imagen de este tipo de infecciones, caben destacar dos recientes trabajos que respaldan su potencial utilidad en el diagnóstico de este tipo de infecciones. El primero de ellos, propone la tomografía por emisión de positrones (TEP) usando fluorodesoxiglucosa como una buena alternativa para el diagnóstico de la infección de prótesis de cadera debido a su gran sensibilidad y su alta especificidad: 86 y 93 % [63]. El segundo, afirma que el uso de determinadas moléculas radiomarcadas con ^{18}F permite incluso determinar el agente etiológico que está provocando la infección a través de TEP, permitiendo discriminar, hasta el momento, entre: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *M. tuberculosis* [64].

1.5. Tratamiento de las infecciones de prótesis articular

La finalidad que persigue el tratamiento de una IPA es erradicar la infección asociada a la prótesis asegurándose de mantener la funcionalidad de la articulación y la calidad de vida del paciente.

Al contrario que otras infecciones, las IPA no curan espontáneamente [65], por lo que requieren obligatoriamente tomar medidas terapéuticas. Un tratamiento efectivo requiere por lo general la combinación de una adecuada estrategia quirúrgica con una antibioterapia eficaz [66]. Para asegurar el mayor éxito en el tratamiento de este tipo de infecciones se requiere un abordaje terapéutico multidisciplinar en el que cirujanos, internistas y microbiólogos participen conjuntamente.

La antibioterapia de las IPA requieren la individualización de cada caso de acuerdo

con el antibiotipo del microorganismo involucrado y ha de tener en cuenta los anteriores conceptos descritos acerca de la patogénesis de este tipo de infección, por lo que debe presentar también una buena actividad antibiofilm [67]. La antibioterapia de este tipo de infecciones requiere la administración de al menos un antibiótico durante tiempos muy prolongados, de cuatro a seis semanas de antibióticos para infecciones provocadas por bacterias [62], pero hasta 38 meses de antifúngicos para el tratamiento de infecciones producidas por hongos [68]. Los antibióticos más usados en este tipo de infecciones incluyen: betalactámicos (penicilinas como: ampicilina o amoxicilina; cefalosporinas, como cefazolina, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime y cefalorina; o incluso carbapenemas como meropenem, imipenem, o ertapenem), aminoglicósidos (como gentamicina o amikacina), fluoroquinolonas (como ciprofloxacino o levofloxacino), glicopéptidos (como vancomicina o teicoplanina) oxazolidonas (linezolid y tedizolid), lipopéptidos cíclicos (como daptomicina) y ansamicinas (cuyo principal representante la rifampicina), entre otros. [62, 67]. En el caso de los antifúngicos, los más utilizados son: la anfotericina B liposomal, triazoles, dentro de los que destaca el fluconazol, y equinocandinas, principalmente la caspofungina y la anidulafungina. El tratamiento empírico, dosis y duración del tratamiento recomendados pueden consultarse en distintas guías y revisiones bibliográficas [62, 67, 69, 70].

El abordaje quirúrgico se debe decidir y programar considerando: la evolución temporal de la infección, el microorganismo identificado y su sensibilidad a antimicrobianos, las comorbilidades del paciente, la estabilidad del implante, el *stock* óseo, y muchos factores de diversa índole [67]. Dentro de las opciones quirúrgicas se encuentran: el tratamiento con antibioterapia, desbridamiento y retención del implante; el reemplazo del implante en un solo tiempo (extracción del implante

infectado, desbridamiento y reimplante de una nueva prótesis en la misma cirugía); el recambio en dos tiempos (durante la primera intervención se extrae el implante infectado y se desbrida y en la segunda intervención se reimplanta una nueva prótesis tras un periodo de entre dos y seis semanas de tratamiento antibiótico); y, en ciertos casos, se puede practicar una artrodesis, un procedimiento Girdlestone o, incluso, una amputación [67, 71]. Las indicaciones quirúrgicas basadas en la etiología pueden revisarse en distintas publicaciones [11, 62, 65, 72].

Existe un abordaje terapéutico especial que consiste en la retención del implante infectado con un tratamiento antimicrobiano oral con intención no curativa, conocido como tratamiento supresor crónico [73]. En determinadas circunstancias, cuando se conoce el microorganismo causante de la infección, las condiciones del paciente anulan la posibilidad de someterlo a cualquier tratamiento quirúrgico [57], la escasa sintomatología no afecta al mantenimiento de la función de la prótesis articular, tras un abordaje quirúrgico fallido, o por la negativa del paciente a volver a ser intervenido de nuevo, se puede optar por retener el implante, intentar reducir la sintomatología y frenar la progresión de la infección mediante un tratamiento antibiótico oral de duración indefinida [74].

1.6. Prevención de las infecciones de prótesis articular

La prevención de las IPA incluye todas aquellas medidas que persiguen reducir su incidencia. Para ello se han propuesto diversas medidas tales como: la reducción de la flora cutánea, uso de cementos o polimetilmetacrilatos de ultraalto peso molecular cargados con antibióticos, un mayor refinamiento de las instalaciones quirúrgicas y trajes del personal de quirófano o la profilaxis antimicrobiana perioperatoria, entre otras [11, 75].

La profilaxis antimicrobiana perioperatoria hace referencia a la administración de antimicrobianos antes y/o después de la

artroplastia, lo que ha logrado reducir hasta en un 80% el riesgo de este tipo de infecciones [75, 76]. Los resultados más positivos se han obtenido en la administración preoperatoria entre una y dos horas antes de la intervención, aunque también puede administrarse hasta, y como máximo, las 24 h después [11, 56]. Los antibióticos más usados (en orden de mayor a menor frecuencia de uso) son: cefazolina, vancomicina y clindamicina, en monoterapia o en combinación [76].

1.7. Biomateriales metálicos en pro de la osteointegración y contra la infección

Los biomateriales, tanto de origen natural como sintético, son materiales que se emplean en la fabricación de estructuras o implantes para remplazar la pérdida o restaurar la forma o función de una estructura anatómica afectada [77].

Los biomateriales metálicos son de naturaleza inorgánica, carecen de bioactividad y, en su mayoría, no son biodegradables. Estos biomateriales constituyen entre el 70 y el 80% de los dispositivos médicos implantables [78] en Traumatológica y Cirugía ortopédica y son atractivos desde el punto de vista biomédico por su fácil procesamiento, obtención de un buen acabado superficial y la posibilidad de ser esterilizados por procedimientos convencionales sencillos [79].

El biomaterial metálico ideal para su uso en la fabricación de prótesis articulares debe cumplir un conjunto de requisitos importante: su composición química no debe contener elementos que puedan provocar reacciones adversas del tejido adyacente; debe tener una buena resistencia a la corrosión en los fluidos fisiológicos presente en el cuerpo humano y poseer unas buenas propiedades mecánicas capaces de soportar las cargas cíclicas propias de los movimientos de la articulación (Figura 4). Además, es deseable que su módulo de Young se ajuste al del hueso, para evitar el apantallamiento de los esfuerzos, previniendo la reabsorción ósea del tejido adyacente; y, finalmente, su resistencia al

desgaste deberá ser excelente, para para minimizar la generación de partículas de desgaste o *debris* [1].

Los biomateriales metálicos más utilizados en la fabricación de material quirúrgico son: los aceros inoxidable austeníticos, las aleaciones de cobalto-cromo y las aleaciones de titanio [1] (Tabla 2). Otras aleaciones metálicas de base magnesio, como: magnesio-cinc-calcio, magnesio-itrio-cinc y magnesio-disprobio, están siendo actualmente estudiadas como materiales de uso potencial en la fabricación de implantes reabsorbibles de fijación interna [80].

Los materiales de uso más frecuente en la fabricación de prótesis articulares son las aleaciones de cobalto y de titanio [36]. El metal estándar de oro para prótesis articulares de cadera y rodilla, es la aleación de cobalto-cromo-molibdeno articulada con polietileno de ultraalto peso molecular [2]. Además, en la cadera es la única articulación ortopédica en el cuerpo en donde la prótesis metal-metal ha sido probada y documentada [2], sobre todo el par cobalto-cromo-molibdeno-cobalto-cromo-molibdeno debido a su reducido desgaste acumulativo después de 10 años de su implantación [1].

Sin embargo, además de la resistencia al desgaste, existen otras propiedades que también condicionan la selección del biomaterial metálico para una aplicación específica. Algunas de las propiedades que son de máxima importancia en estos biomateriales son: la dureza, resistencia a la tracción, el módulo de elasticidad o de Young y la elongación [77], la biocompatibilidad y la osteointegración.

El módulo de Young es un parámetro que caracteriza el comportamiento elástico de un material, según la dirección en la que se aplica una fuerza. Se estima que el módulo de Young del hueso está comprendido entre 4 y 30 GPa según sea trabecular o cortical, respectivamente [1, 77]. En general todos los metales que se emplean en la actualidad como biomateriales articulares tienen un módulo de Young superior al del hueso [77], esto promueve una atrofia ósea como

	Aceros inoxidables	Aleaciones de cobalto	Aleaciones de titanio
Designación	ASTM F-138	ASTM F-75 ASTM F-799 ASTM F-1537	ASTM F-67 (ISO 5832/TT) ASTM F-136 (ISO 5832/2) ASTM F-1295
Principales elementos aleantes (% peso dentro de la aleación)	Fe (bal.) Cr (17-20) Ni (12-14) Mo (2-4)	Co (bal.) Cr (19-30) Mo (0-10) Ni (0-37)	Ti (bal.) Al (6) V (4) Ni (7)
Ventajas	Coste Disponibilidad Facilidad de procesamiento	Resistencia al desgaste, a la corrosión y a la fatiga	Biocompatibilidad Resistencia a la corrosión y a la fatiga Módulo de Young bajo
Desventajas	Comportamiento a largo plazo Módulo de Young alto	Módulo de Young alto Biocompatibilidad	Resistencia al desgaste Baja resistencia al cizallamiento Procesamiento relativamente complicado
Principal uso en cirugía ortopédica	Dispositivos temporales de fijación Usados en el vástago de prótesis de cadera en Reino Unido	Odontología Vástago de prótesis Componentes portantes en prótesis	Dispositivos de osteosíntesis o fijación permanentes Usadas en prótesis de caderas con cabeza femoral modular asociada a CoCrMo o cerámicas

Tabla 2. Algunas de las características de los biomateriales metálicos utilizados en Traumatología y Cirugía ortopédica (modificada a partir de [1] según [81-82]).

resultado del apantallamiento de estrés mecánico entre el implante y el hueso, lo que provoca la reabsorción ósea, el aflojamiento de los implantes y/o la fractura de hueso [77, 78, 81]. El módulo de Young de los aceros inoxidables y de las aleaciones de base cobalto es mucho más elevado que el del hueso cortical (10-40 GPa): 200 y 200-230 GPa, respectivamente [1]. Por otra parte, las aleaciones de titanio tienen un módulo de Young mucho más bajo comprendido entre 66 y 110 GPa correspondientes a la aleación Ti-13Nb-5Ta-7Zr-0,4O y Ti-6Al-4V, respectivamente [81], lo que las convierte en una mejor elección desde el punto de vista biomecánico para la fabricación de componentes que no estén sometidos a rozamiento como: cuellos femorales, vástagos o superficies porosas [36].

La biocompatibilidad es la capacidad de un material para responder de forma adecuada al medio biológico en el que realiza su función, por lo que se espera que los biomateriales metálicos utilizados en prótesis articulares no sean tóxicos y no

causen reacciones inflamatorias o alérgicas en el cuerpo humano [77]. Ello implica que el éxito de los biomateriales metálicos depende fundamentalmente de la reacción del cuerpo humano frente al implante. Los dos principales fenómenos que influyen en la biocompatibilidad de un material son la respuesta del huésped inducida por el biomaterial metálico y la degradación del mismo en el medio agresivo presente en el cuerpo humano [77]. Esta degradación se puede producir de tres maneras distintas: disolución, corrosión y generación de partículas de desgaste o *debris* [2]. Los iones metálicos o partículas resultantes del desgaste pueden actuar como háptenos de pequeño peso molecular que se unen a proteínas o células y forman complejos organometálicos, que pueden convertirse en antígenos inmunogénicos o alérgenos y desencadenar una hipersensibilidad a los biomateriales metálicos [2]. Los principales elementos metálicos alergénicos (ordenados de mayor a menor) son: níquel, cobalto, cromo, molibdeno, titanio, vanadio y aluminio. Los principales peligros

potenciales que pueden desencadenar son la toxicidad celular local y sistémica, carcinogénesis e hipersensibilidad [2, 49].

La hipersensibilidad a los metales es un fenómeno bien establecido y obliga inevitablemente a la retirada prematuramente de la prótesis [2] en caso de manifestarse. La mayoría de los casos de hipersensibilidad a metales se han detectado en pacientes con prótesis de cadera de cobalto-cromo-molibdeno o acero inoxidable. No es de sorprender, ya que el sensibilizador metálico más común en los seres humanos es el níquel presente en el acero inoxidable, seguido por el cobalto presente en las aleaciones de cobalto [1, 2].

La menor hipersensibilidad promovida por las aleaciones de titanio es consecuencia de la formación de capas de óxido estables en su superficie que las ha convertido en buenos candidatos para su aplicación en biomateriales metálicos implantes dentales [79]. Esta característica, junto con sus buenas propiedades mecánicas (elevada resistencia, rigidez y tenacidad a la fractura) pero, sobre todo, por su buena biocompatibilidad y reducida toxicidad [82], han convertido a las aleaciones de titanio en objeto de interés haciendo que la investigación relacionada con su funcionalización para su uso biomédico haya crecido en los últimos años [83-85].

De entre todas las aleaciones de titanio, las aleaciones de titanio-circonio, con contenidos de circonio comprendidos entre 13-17% y entre ellas destaca la aleación Ti-13Nb-13Zr, destacan por sus excelentes propiedades: mayor ductilidad y resistencia a la fatiga [79]; buena resistencia a la corrosión, como resultado de la formación de una capa de óxido pasiva y de carácter protector que se forma espontáneamente en contacto con el aire [1]; y biocompatibilidad, ya que ninguno de sus aleantes es tóxico y forman óxidos muy estables [1]. Todas estas propiedades convierten a esta aleación Ti-13Nb-13Zr en una alternativa a la aleación de titanio Ti-6Al-4V, actualmente en uso, y que no está exenta de inconvenientes.

1.7.1. Biomateriales metálicos pro osteointegración

Una de los procesos más importantes que condiciona el éxito de una prótesis es la osteointegración [82]. La osteointegración es la formación de una unión directa y funcional entre el hueso vivo y la superficie del biomaterial metálico [86].

Dependiendo de la respuesta del cuerpo humano, los biomateriales se pueden clasificar en: biotolerables, cuando inducen la formación de una fina cápsula de tejido conectivo de 0,1 a 10 μm de grosor que no se adhiere a la superficie del material; bioactivos, cuando promueven la formación de hueso alrededor del implante y este se integra fuertemente con la superficie del material; o biorreabsorbible, cuando el material es reemplazado por tejido autólogo [77]. De entre todos ellos, los metales bioactivos son los más interesantes ya que promueven una elevada integración con el hueso circundante. No obstante, los biomateriales metálicos biotolerables también se emplean para ciertas aplicaciones en la fabricación de implantes [77].

Sin embargo, la osteointegración de un biomaterial puede verse comprometida por muy diversas causas como: la toxicidad de iones, partículas liberadas del biomaterial metálico, [82]; la trombosis, que implica la coagulación de la sangre y la adhesión de las plaquetas de la sangre a la superficie del material; y la encapsulación de tejido fibroso de los biomateriales metálicos que se implantan cerca de tejidos blandos [77, 82].

Con el objetivo de incrementar aún más la osteointegración de los metales bioactivos, durante los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para mejorar esta propiedad utilizando diferentes metodologías de modificación superficial, tanto físicas como químicas.

Algunos de los métodos físicos que se han empleado para la modificación de la morfología y topografía superficial del metal a escala microscópica son procesos de mecanizado; grabado ácido; láser;

pulverización por plasma y granallado [82]. Todas estas metodologías se basan en el hecho de que el aumento de la rugosidad superficial del biomaterial metálico promueve un aumento de la energía de superficie que favorece el anclaje mecánico del hueso, pero también la adsorción de las proteínas, promoviendo la función osteoblástica y, por último, la osteointegración. [82].

Los métodos químicos abordan la mejora de la bioactividad del metal mediante la deposición de recubrimientos utilizando tanto técnicas bioquímicas, como físico-químicas. Entre las primeras, se enmarca el uso de moléculas orgánicas (factores de crecimiento, péptidos o enzimas) que influyen directamente en la respuesta celular. Los métodos físico-químicos, promueven la incorporación de un compuesto inorgánico, como fosfato cálcico o hidroxiapatita, que incrementa el entrelazamiento bioquímico entre las proteínas de la matriz ósea y la superficie del metal a la vez que mejora la unión al hueso [82]. Recientemente se ha demostrado que la incorporación de fosfato inorgánico por este tipo de métodos en aleaciones de titanio, inducen la osteointegración *in vivo* [87, 88].

1.7.2. Biomateriales metálicos contra las infecciones de prótesis articular

Para prevenir las IPA es necesario impedir la adherencia bacteriana y la consecuente colonización del implante por las bacterias, a la vez que permite la osteointegración por el tejido del hospedador con el implante [50]. Esta teoría sobre la competencia entre bacterias y células fue denominada por primera vez por Gristina y colaboradores en 1988 como *la carrera por la superficie* [89]. Esta teoría afirma que cuando las células del hospedador colonizan la superficie del implante en primer lugar, la probabilidad de que las bacterias se adhieran es menor y, viceversa. Este fenómeno impulsa a perseguir un equilibrio entre la actividad bactericida y la citotoxicidad, pues la estrategia utilizada debe ejercer la toxicidad antibacteriana suficiente para evitar el

fracaso de la prótesis por aflojamiento séptico, pero sin provocar una citotoxicidad que impida la osteointegración y favorezca el aflojamiento aséptico [50].

Por eso, los biomateriales con propiedades antibacterianas deben de cumplir al menos cinco condiciones [83]: deben ser biocompatibles; deben poseer una importante eficacia anti-infecciosa (demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* mediante un modelo); la osteointegración no puede verse comprometida por la propiedad bactericida; la durabilidad del efecto antibacteriano deberá ser de al menos de dos años y las propiedades mecánicas del recubrimiento antibacteriano deben mantenerse a lo largo del tiempo (Figura 4).

La mayoría de estrategias desarrolladas para prevenir la infección según su capacidad antimicrobiana, se pueden clasificar en dos grandes categorías no excluyentes: recubrimientos antiadherentes, que disminuyen la adherencia bacteriana; y, recubrimientos bactericidas, disminuyen la viabilidad de las bacterias adheridas a ellos.

Teniendo en cuenta que un *biofilm* maduro es una armadura [29] capaz de proteger a las bacterias del sistema inmune y de multitud de compuestos inorgánicos y orgánicos [30] (Figura 2) (véase 1.3.2. *Biofilm*), la principal estrategia para prevenir la formación de *biofilm* está dirigida hacia la única ventana de oportunidad que permite adoptar medidas preventivas clínicamente razonables, y es la etapa de transición entre la adherencia reversible e irreversible del desarrollo del *biofilm* [83] (Figura 5).

Las principales estrategias para evitar la adherencia bacteriana se basan en: el uso de polímeros antiadherentes [90-92], como: la albúmina [93] y la heparina [94]; recubrimientos superhidrófobos [91, 95, 96]; desarrollo de nanoestructuras superficiales [97-103]; hidrogeles orgánicos e inorgánicos [104-110]; el dopaje de la superficie con iones haluros [111], entre otros muchos [112] (Figura 6). Entre estos métodos cabe destacar que el dopado con flúor (F) de las aleaciones de Ti, ha demostrado reducir al

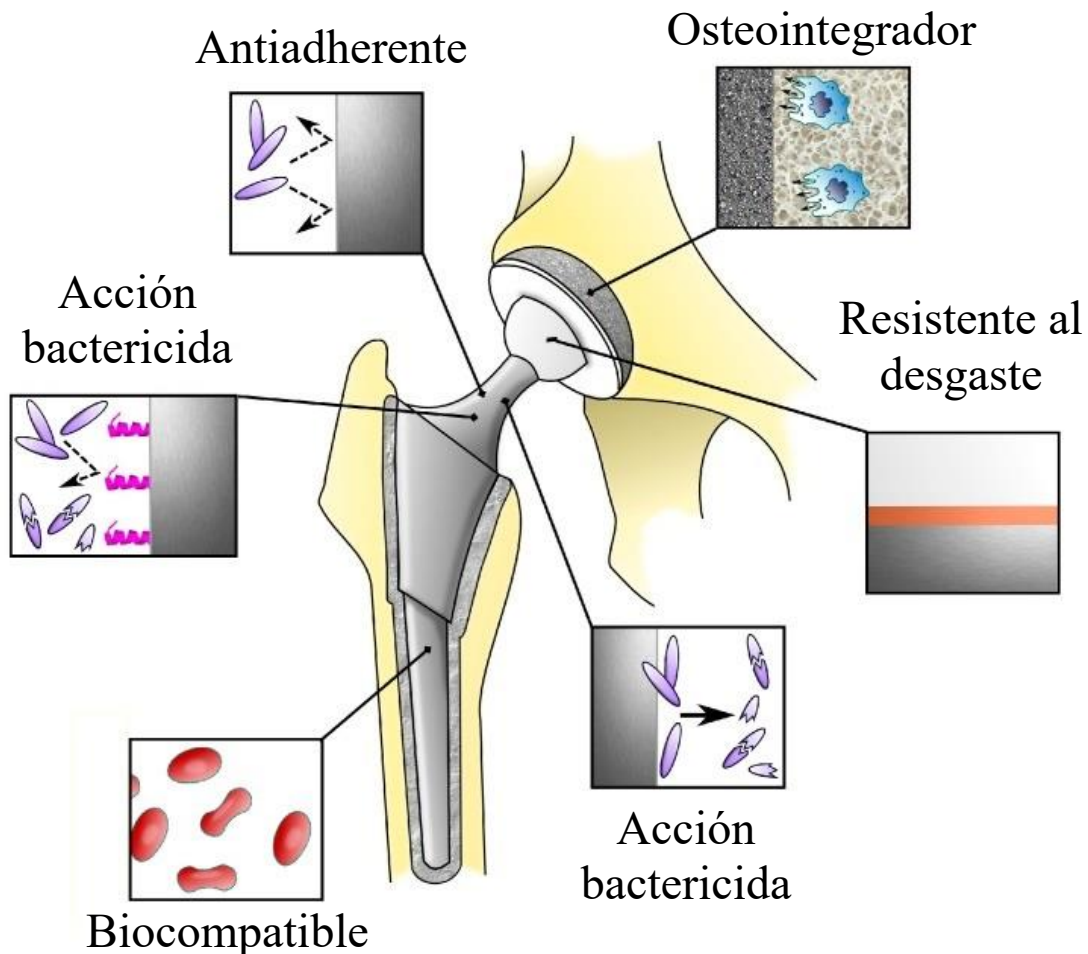


Figura 4. Ideas de superficies multifuncionales en una artroplastia total de cadera diseñada para responder simultánea y exitosamente a tareas biológicas y mecánicas. La respuesta depende de las capacidades específicas de los recubrimientos adquiridos durante el proceso de fabricación [85].

menos en una 50% la adherencia bacteriana de estafilococos *in vitro* [111, 113].

Por otra parte, las principales estrategias utilizadas para proporcionar propiedades bactericidas a los biomateriales metálicos se basan en la utilización de elementos inorgánicos y/o compuestos orgánicos. Así, la terapia local se ha convertido en una estrategia aceptada y adyuvante de la terapia profiláctica sistémica, que ofrece un efecto bactericida dirigido y centrado en la zona de implantación [114].

Los principales elementos inorgánicos utilizados en la funcionalización de biomateriales metálicos son, por lo general, metales con una conocida capacidad bactericida, como: el cobre, el cinc, el magnesio, el oro o, particularmente la plata [35, 50, 83, 115]. Recientemente, el selenio,

un elemento no-metálico, ha demostrado su capacidad para disminuir la viabilidad de estafilococos cuando se une covalentemente a superficies de titanio [116].

Los compuestos orgánicos pueden subdividirse a su vez en: no-antibióticos y antibióticos. Dentro del grupo de compuestos orgánicos no-antibióticos se encuentran antisépticos, como la clorhexidina, el cloroxilenol, y la polihexametilenbiguanina [117]; compuestos cuaternarios de amonio [118]; compuestos cuaternarios del quitosano [119]; el óxido nítrico [35]; pero también biomoléculas activas como la defensina-3 [120] y enzimas como la lisostafina [120-122].

Ventana de oportunidad
para las células del hospedador para los
antibióticos sistémicos y locales

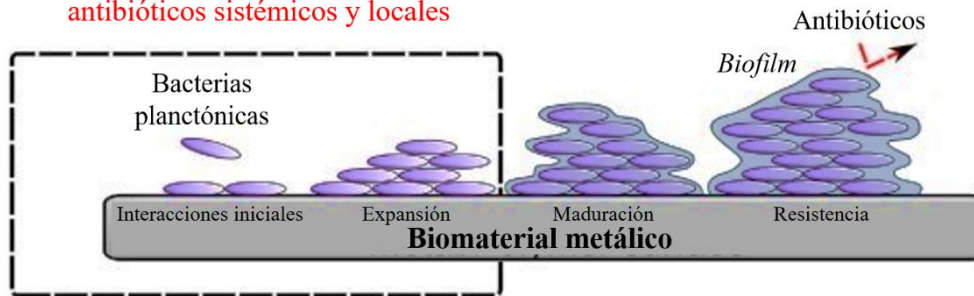


Figura 5. Proceso de colonización de biomateriales empezando por la adherencia de bacterias individuales que proliferan formando microcolonias que darán lugar al *biofilm* [85].

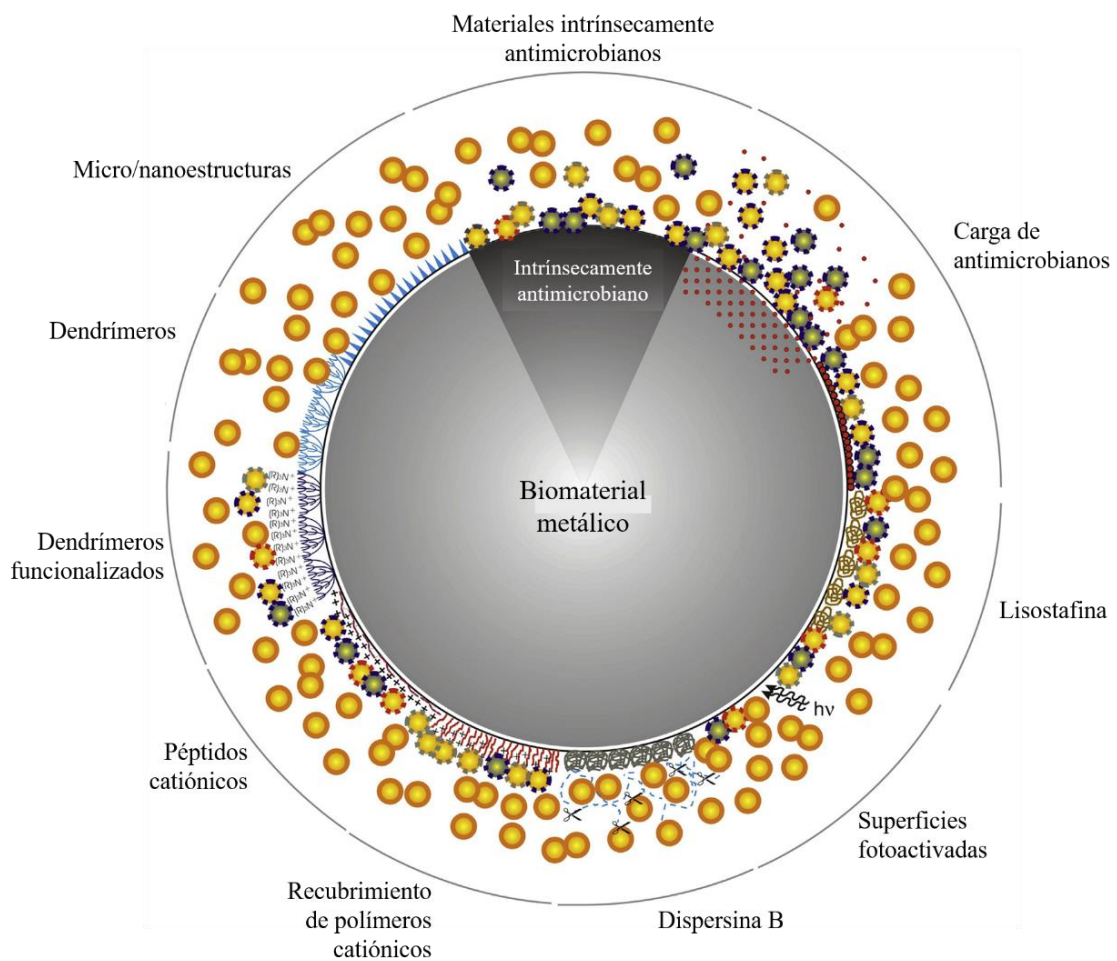


Figura 6. Revisión ilustrativa del amplio espectro de modificaciones superficiales y biomateriales diseñados para prevenir las infecciones asociadas a biomateriales metálicos [114].

Los antibióticos más utilizados para la funcionalización de biomateriales metálicos son: cefoxitina [123], ciprofloxacino [124], la combinación penicilina-estreptomina [125], gentamicina [126-129] y vancomicina [85, 130, 131]. Estos antibióticos pueden incorporarse a los biomateriales metálicos de diversas formas para evitar/tratar la infección de la prótesis: covalentemente [130, 132, 133]; cargados en un biopolímero [123, 131, 134, 135] o almacenados en la nanoestructura, bien sea nanoporosa [136] o nanotubular [126-129, 137] obtenidas mediante un proceso de anodizado en las aleaciones de titanio.

El almacenamiento y liberación de medicamentos, a nivel local, a partir de una estructura nanotubular ofrece al menos dos ventajas frente a las demás técnicas de liberación: por un lado, el proceso de anodizado permite optimizar las dimensiones del nanotubo (diámetro, grosor de pared y longitud) según sea requerido; por otro, el tratamiento de anodizado y, por tanto, el desarrollo de la nanoestructura superficial puede realizarse en muestras tridimensionales como las de los implantes articulares [114]. En este sentido, cabe señalar que este tipo de nanoestructuras tubulares o nanotubos de aleaciones de titanio dopadas con F y fósforo (P) ya han demostrado su capacidad para transportar fármacos como el ibuprofeno [138].

Por último, es importante resaltar que antes de que los recubrimientos cargados con antibióticos se puedan aplicar en la práctica clínica, es necesario resolver tres cuestiones importantes [117]. En primer lugar, es crucial la correcta elección del antibiótico a utilizar, teniendo en cuenta los patrones locales de resistencia antibiótica de las bacterias asociadas a este tipo de infecciones ya que una monoterapia, aunque sea a nivel local, puede inducir inevitablemente a la aparición de resistencia al antibiótico elegido. En segundo lugar, durante la fabricación de los biomateriales cargados con antibióticos se debe tener en cuenta que es necesaria una concentración de antibiótico constante y relativamente

prolongada en el tiempo. Y, en tercer y último lugar, es imperativo descartar cualquier antibiótico que pueda causar citotoxicidad local y/o impedir la osteointegración de la superficie del biomaterial metálico y el tejido óseo circundante.

2. Hipótesis

En este trabajo se evaluaron dos aleaciones distintas, cada una con sus respectivas hipótesis:

Respecto a la aleación Ti-6Al-4V:

- 1.1. La incorporación de gentamicina, vancomicina o la mezcla de ambos en los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V alteraría la adherencia y disminuiría la viabilidad de las bacterias adheridas.
- 1.2. La incorporación de P y F a los nanotubos con forma de botella de la aleación Ti-6Al-4V podría modificar la interacción que tienen las bacterias con la aleación resultante y mejorar considerablemente la osteointegración de dicha aleación *in vitro* e *in vivo*.
- 1.3. La incorporación de P y F a los nanotubos con forma de botella de la aleación Ti-6Al-4V cargadas con gentamicina, vancomicina o la mezcla de ambos antibióticos mostraría unos patrones de liberación y de osteointegración semejantes o superiores a los mostrados por los nanotubos dopados solo con F de la aleación Ti-6Al-4V.

Respecto a la aleación Ti-13Nb-13Zr:

- 1.4. La presencia de circonia (ZrO_2) en la aleación podría tener capacidades antibacterianas sobre las bacterias que se adhirieran a ella.

3. Objetivos

En este trabajo se evaluaron dos aleaciones distintas, cada una con sus respectivos objetivos:

Respecto a la aleación Ti-6Al-4V:

- 1.1. Estudiar la liberación y la capacidad bactericida de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V y cargados con gentamicina, vancomicina y/o la mezcla de ambos antibióticos.
- 1.2. Evaluar los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V a varios niveles:
 - 1.2.1. Estudiar *in vitro* la interacción material-bacteria durante la adherencia y su desarrollo de *biofilm*.
 - 1.2.2. Estudiar *in vitro* a nivel celular de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V.
 - 1.2.3. Estudiar *in vivo* los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V.
- 1.3. Evaluar los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina, vancomicina y/o la mezcla de ambos antibióticos a varios niveles:
 - 1.3.1. Estudiar la liberación de los antibióticos de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina.
 - 1.3.2. Estudiar a nivel celular de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina.

Respecto a la aleación Ti-13Nb-13Zr:

- 1.4. Estudiar de la posible capacidad bactericida de la aleación Ti-13Nb-13Zr en comparación con la aleación Ti-6Al-4V.

4. Material y métodos

Aleación Ti-6Al-4V

4.1. Estudio de la liberación y la capacidad bactericida de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V y cargados con gentamicina, vancomicina y/o la mezcla de ambos antibióticos

4.1.1. Material

Las capas de óxido de TiO₂ nanotubular dopadas con F (NT) se fabricaron a partir de discos de 18 mm de diámetro y 2 mm de espesor de aleación de Ti-6Al-4V ELI ASTM F136-02 (Surgival Co., Valencia, España) y se pulieron a través de grados sucesivos de papel de SiC hasta el grado 1200, se lavaron con un detergente, se aclararon con agua del grifo y después con agua desionizada. Las muestras fueron pulidas químicamente (PQ) en una mezcla de HF (48% en peso): HNO₃ (70% en peso): H₂O con una relación en volumen 1:4:5 durante 5 min a temperatura ambiente bajo agitación continua a 400 rpm, enjuagada en agua destilada, y secadas con aire frío [139]. Los discos de Ti-6Al-4V se pulieron químicamente para conseguir una rugosidad superficial controlada por debajo de 100 nm. Este pulido químico incorpora un contenido de F <0,5 at. % [111]. Este pulido químico posee características superficiales muy semejantes al acabado que presentan las prótesis articulares.

A partir del Ti-6Al-4V PQ, se formaron nanotubos en un cámara con dos electrodos anodizando las muestras a 20 V en un electrolito que contenía H₂SO₄ 1 M y 0,15%

en peso de HF durante 60 min. Se utilizó una malla de platino como cátodo. Las respuestas de anodizado en tiempo de tensión y tiempo de corriente se registraron a una frecuencia de muestreo de 0,1 Hz usando un amperímetro de resistencia cero [139].

4.1.2. Carga de los antibióticos y liberación de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V

La gentamicina (Gm) y la vancomicina (Vm) (Sigma Aldrich, Missouri, EE.UU.) se cargaron en las capas de NT mediante el método descrito por Doadrio y colaboradores [138]. Brevemente, la carga de los antibióticos se realizó sumergiendo las muestras anodizadas de NT en una solución que contenía 150 mg de cada antibiótico en 20 mL de agua (NT-Vm y NT-Gm, respectivamente). La mezcla de Gm y Vm se preparó con 75 mg de cada antibiótico en 20 mL de agua (NT-Gm+Vm). Para la carga, las muestras se sujetaron mediante un alambre de platino y se introdujeron en un recipiente de polipropileno que contenía 20 mL de la solución acuosa de antibiótico en agitación continua, durante 24 h para alcanzar la adsorción máxima de cada fármaco. Este procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se dejaron secar en condiciones de vacío a 20°C durante 24 h. Las capas de NT sin antibióticos fueron usadas como control.

Los perfiles de liberación de fármaco se obtuvieron sumergiendo las muestras en 20 mL de una solución tampón 20 mM

NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ con un pH 7 y a 37°C bajo condiciones de agitación.

La concentración de cada antibiótico en la fase líquida se evaluó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (*reverse phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC). Las mediciones se realizaron con un sistema de cromatografía líquida equipado con un módulo de separación Waters Alliance 2695, un detector Waters 2996 de diodos de longitud de onda variable y controlado por el *software* Millennium 32, a una temperatura de 37°C. Se empleó una columna de fase inversa X-Terra RP-18 (5 mm x 150 mm) (Waters Instruments, España). La fase móvil consistió al 10% en peso de acetonitrilo HPLC (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU) y 90% en peso de agua HPLC (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU). El flujo fue de 1 mL/min, monitorizado a $\lambda = 211$ nm para la Gm y a $\lambda = 227$ nm para la Vm. El volumen de inyección fue de 40 μ L. La Gm mostró un pico con un tiempo de retención de 1,6 min y la Vm a 2,6 min.

La concentración de ambos antibióticos se midió periódicamente a lo largo de una semana.

4.1.3. Actividad biológica mediante difusión en disco

Para la detección de la actividad biológica de los liberados muestreados, se realizó una prueba de difusión en disco utilizando el agar Antibiotic Medium 2 BD Difco™ (BD, New Jersey, EE. UU) usando *Escherichia coli* ATCC 25922 para la Gm sola y en la mezcla de ambos antibióticos y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 para la Vm sola. Estas cepas bacterianas fueron elegidas debido a su sensibilidad a los antibióticos usados. El medio se preparó de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial y fue templado a 45°C. Se mezclaron 20 mL de medio atemperado con 2 mL de un inóculo $1 \pm 0,02$ McF de cada bacteria separadamente en agua estéril. La mezcla se depositó en una placa de Petri estéril de 90 mm de diámetro. Se cargaron discos de ensayo de antibióticos Whatman® de 6 mm de diámetro (Sigma

Aldrich, Missouri, EE.UU.) con 20 μ l de las diferentes muestras. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Tras la incubación, se midió el halo de inhibición y se estimó la concentración de cada antibiótico usando una curva estándar de concentraciones conocidas de cada antibiótico. Este experimento se realizó por triplicado para cada antibiótico/cepa.

4.1.4. Actividad antibacteriana de nanotubos cargados con antibióticos

Para evaluar la actividad antibacteriana de nanotubos cargados de antibióticos, se usaron tres cepas de colección: *S. aureus* 15981 [140, 141], *S. epidermidis* ATCC 35984 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -80°C hasta que se utilizaron.

Las pruebas de adherencia bacteriana se realizaron siguiendo el protocolo modificado descrito por Kinnari y colaboradores [142]. Cada cepa se cultivó en caldo triptona-soja (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) a 37°C durante 20-24 h. Después del cultivo, las bacterias se centrifugaron a 3500 rpm a 22°C durante 10 min. El sobrenadante se desechó y el *pellet* se lavó tres veces con tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*, PBS) (Sigma Aldrich, Missouri, EE.UU.) para *S. aureus* 15981 y *S. epidermidis* ATCC 35984) y solución salina estéril al 0,9% de NaCl (SS) (B. Braun, Melsungen, Alemania) para *P. aeruginosa* ATCC 27853. Después se resuspendieron las bacterias y se diluyeron en PBS o SS hasta alcanzar una turbidez de $0,5 \pm 0,02$ McF de inóculo bacteriano, se incubaron 5 mL de este inóculo con las muestras de Ti-6Al-4V NT a 37°C durante 24 h con el fin de evaluar la adherencia en un modelo estático, tal y como se ha sido descrito previamente por otros autores [111, 113] y para permitir detectar el daño de la membrana bacteriana. Después de la incubación, los discos se lavaron tres veces con PBS o SS para eliminar las bacterias no-adheridas. Finalmente, los discos se tiñeron con el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead Bactlight® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) [143] de acuerdo

con las recomendaciones de la casa comercial.

Se tomaron entre 10 y 13 fotografías a 400 aumentos en un microscopio de fluorescencia DM2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) de cada disco. El porcentaje de superficie total cubierto y el porcentaje de bacterias muertas y vivas adheridas se calculó y analizó utilizando el *software* ImageJ (Instituto Nacional de Salud Bethesda, Maryland, EE.UU.). Los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa y material.

4.2. Evaluación de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V

4.2.1. Interacción material-bacteria durante la adherencia.

4.2.1.1. Material

Se prepararon nanotubos de Ti-6Al-4V en forma de botella (NTc) a partir de Ti-6Al-4V PQ en un electrolito que contenía $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 M y NH_4F 0,3 M a 20 V durante 60 min [139]. Los valores de pH se ajustaron a 4,4-4,6 usando NaOH y aplicando dos tensiones escalonadas: una primera etapa de voltaje de 10 V durante 30 min, seguida de una segunda etapa de voltaje de 20 V durante 60 min [144]. Los NTc contaron con un contenido del 4 al 13% at. de F y del 1 a 8% de P. Como control se utilizó Ti-6Al-4V PQ.

Todos los electrolitos anodizantes se prepararon usando productos químicos de calidad reactiva (Sigma Aldrich, Missouri, EE.UU.). La temperatura se mantuvo a 20°C y se utilizó una malla de platino como cátodo. Los voltajes se aplicaron utilizando una fuente de alimentación de LAB/SM 1300 DC de ET Power Systems Ltd.

4.2.1.2. Liberación de aluminio de las capas anódicas de la aleación Ti-6Al-4V con nanotubos con forma de botella dopados con F y P

Las muestras de la aleación Ti-6Al-4V NTc se vortearon durante 15 s a 3.000 rpm en 10 mL de agua destilada calidad inyectable (B.Braun, Melsungen, Alemania). Estas muestras se incubaron en placas de 12

pocillos con 5 mL de SS a 37°C y 5% de CO_2 durante 54 h. Se muestreó al menos 1 mL de agua a las 2, 3, 4, 24, 26, 28, 32, 33, 34, 48, 50 y 54 h y se estimó la concentración de aluminio (Al) en cada momento mediante espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito utilizando un Perkin Elmer Analyst 600 en los laboratorios Reference (Barcelona, España) con un límite de detección de 5 ng/mL. Este experimento se realizó con y sin 100 µg/mL de deferoxamina (DFX) (Laboratorio Padró, S.A.; Barcelona, España) en el SS.

4.2.1.3. Experimento de adherencia

Se utilizaron cinco cepas de colección: *S. aureus* 15981 [140, 141], *S. epidermidis* ATCC 35984, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. maltophilia* ATCC 13637. Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -80°C hasta que se realizaron experimentos.

Los experimentos de adherencia bacteriana sobre la aleación Ti-6Al-4V PQ y la aleación Ti-6Al-4V NTc se realizaron siguiendo un protocolo modificado del descrito por Kinnari y colaboradores [142] (*véase* 4.1.4. *Actividad antibacteriana de nanotubos cargados con antibióticos*). Con la diferencia de que cada muestra se vorteo durante 15 s a 3.000 rpm en agua destilada calidad inyectable antes de realizar cada experimento, en vez de usar tampón fosfato salino se usó SS y en vez de incubarse durante 24 h se incubó solo durante 120 min.

Finalmente, la solución bacteriana después de la incubación se dividió en tres muestras: se destinaron 2 mL para determinar la concentración de Al en la solución bacteriana después de 120 min de incubación, 2 mL se filtraron usando un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU) para estimar la concentración de Al captado por bacterias planctónicas, y se utilizó 1 mL para estimar las unidades formadoras de colonia (UFC)/mL de bacterias planctónicas

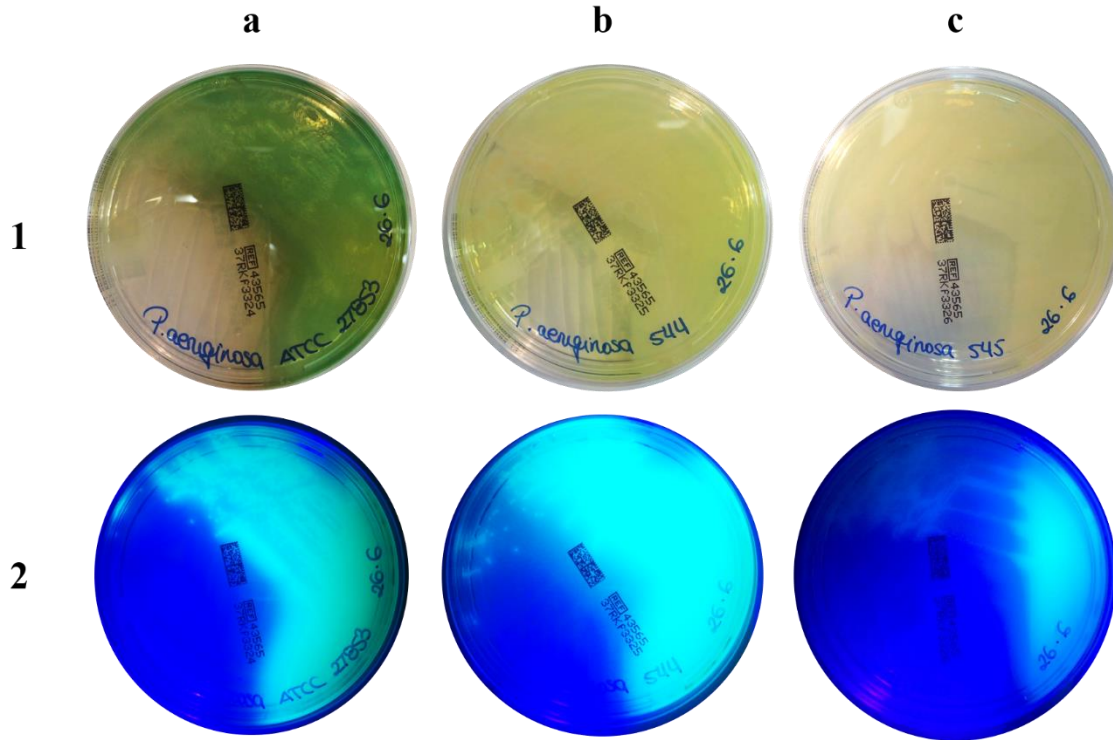


Figura 7. *P. aeruginosa* ATCC 27853 (*wild type*) (a), *P. aeruginosa* ATCC 15692 isocorismato sintasa (PchA) deficiente ($\Delta pchA$) (b) y *P. aeruginosa* ATCC 15692 pioverdina sintetasa F (PvdF) y PchA ($\Delta pvdF/\Delta pchA$) (c) deficiente crecidas en agar cetrimida iluminadas bajo luz normal (1) y bajo luz negra (400 nm) (2). Bajo luz negra, solo la pioverdina es fluorescente.

expuestas a cada material utilizando el método del *drop plate* [145] en agar triptonsoja con 5% sangre de carnero. El método del *drop plate* consiste en estimar la concentración de bacterias viables a partir de la media de las UFC/gota a partir de cinco gotas de 10 μL de cada dilución sembradas en el agar más adecuado.

4.2.1.4. Neutralización del efecto bactericida de la liberación de Al

El mismo protocolo modificado desarrollado por Kinnari y colaboradores [142] se repitió con el fin de neutralizar el efecto bactericida de Al liberado por Ti-6Al-4V NTc en determinadas cepas bacterianas testadas; para ello, se añadieron 100 $\mu\text{g/mL}$ de DFX al SS y se repitió el experimento de adherencia en aleación Ti-6Al-4V NTc. Este experimento se realizó por triplicado para cada cepa.

4.2.1.5. Captación y movilización de Al bacteriano en *P. aeruginosa* ATCC 27853

Para estudiar el mecanismo de captación de Al en una de las especies bacterianas ensayadas, se utilizaron dos cepas mutantes de *P. aeruginosa* para genes relacionados con la síntesis de sideróforos. Para ello, se realizó el experimento de adherencia bacteriana (véase 4.2.1.3. *Experimento de adherencia*) con dos mutantes de *P. aeruginosa*: una cepa de *P. aeruginosa* ATCC 15692 isocorismato sintasa (PchA) deficiente ($\Delta pchA$) y otra cepa de *P. aeruginosa* ATCC 15692 con una deficiente en pioverdina sintetasa F (PvdF) y en PchA ($\Delta pvdF/\Delta pchA$) utilizadas anteriormente por otros autores [146]. *P. aeruginosa* ATCC 27853 se usó como control (*wild type*) (Figura 7).

Para evaluar la movilización de Al, se lavaron las muestras Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc, se vortearon durante 15 s a 3.000 rpm en 10 mL de agua destilada pura y se incubaron en 5 mL de agua destilada

estéril a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 h. Estas muestras se incubaron con una *P. aeruginosa* ATCC 27853 como se describió anteriormente (véase 4.2.1.3. *Experimento de adherencia*) pero durante 24 h en lugar de 120 min. Después de la incubación, las muestras se lavaron tres veces con SS para eliminar bacterias no-adheridas y se sonicaron en un tubo cónico Falcon™ de 50 mL (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU) con 5 mL de SS usando un baño Ultrasons-H 3000840 de bajo consumo (JP Selecta, Barcelona, España) a 22°C durante 5 min [59]. La solución sonicada se dividió en dos muestras: se destinaron al menos 2 mL para determinar la concentración de Al en la solución bacteriana después de 24 h de incubación y 2 mL se filtraron con un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm para estimar la concentración de Al captado por bacterias adheridas. La solución bacteriana de incubación tras 24 h de incubación se trató por igual.

4.2.2. Estudio celular de los nanotubos dopados con F y P de la aleación de Ti-6Al-4V

Los estudios celulares se basaron en los realizados por Lozano y colaboradores [147].

4.2.2.1. Proliferación celular

Las muestras de cada material se colocaron en placas de 12 pocillos antes de sembrar células MC3T3-E1 a una densidad de 10.000 células/cm² en 2 mL de medio esencial mínimo α con suero bovino fetal al 10%, ácido ascórbico a 50 mg/mL, β -glicerol-2-fosfato y 1% de penicilina-estreptomicina, seguido de incubación durante diferentes tiempos a 37°C en CO₂ al 5%. El medio fue reemplazado cada dos días.

La proliferación celular se determinó mediante la adición de la solución Alamar Blue® (BIO-RAD, California, EE. UU) al 10% (v/v) al cultivo celular a 48 y 168 h de crecimiento, siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió con 570 y 620 nm.

4.2.2.2. Mineralización de la matriz celular

La mineralización de la matriz se midió mediante tinción con Alizarin Red S (Sigma Aldrich, Missouri, EE.UU.) después de incubar células subconfluentes MC3T3-E1 con las muestras ensayadas en el medio mencionado durante 10 días. La tinción se disolvió con cloruro de cetilpiridinio al 10% en fosfato sódico 10 mM a pH 7, midiendo la absorbancia a 620 nm.

4.2.2.3. Estudios de expresión génica

Las células MC3T3-E1 se incubaron con las muestras como se describió anteriormente durante 5 días, se extrajo con Trizol (Life Technologies, Maryland, EE. UU) el RNA celular total. La expresión génica se analizó por PCR en tiempo real utilizando un sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, California, EE. UU.).

Se analizó la expresión génica de dos marcadores osteogénicos, Runx2 y BGLAP, relacionados con la diferenciación temprana y tardía de osteoblastos, respectivamente, y la expresión de un factor angiogénico clave, VEGF, en células MC3T3-E1 expuestas a cada material. Los *primers* específicos de ratón no marcados para: Runx2, osteocalcina (BGLAP) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sondas TaqMan™ MGB se obtuvieron del kit Designs Assay (Applied Biosystems, California, EE. UU).

El número de copias de mRNA se calcularon para cada muestra utilizando el valor umbral de ciclo (C_t). 18S rRNA, un gen *housekeeping*, se amplificó en paralelo con los genes probados. El número de veces para cada material se definió como la expresión relativa comparada con la aleación Ti-6Al-4V PQ (control) y se calculó como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = \Delta\Delta C_{\text{material}} - \Delta\Delta C_{\text{control}}$.

4.2.3. Modelo *in vivo* de las capas anódicas de la aleación Ti-6Al-4V con nanotubos con forma de botella dopados con F y P

El estudio *in vivo* se realizó usando conejos (*Oryctolagus cuniculus*) machos albinos de Nueva Zelanda con un peso comprendido entre 2,5 y 3 Kg en las instalaciones del

Servicio de Experimentación animal y Cirugía experimental del Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 53/2013 y con la aprobación del Área de Protección Animal de la Consejería de Medio Ambiente, Administración local y Ordenación territorial de la Comunidad de Madrid (PROEX 111/16).

4.2.3.1. Adecuación de la cepa patógena a conejo

En este modelo animal *in vivo* se usó una cepa de *P. aeruginosa* aislada de una paciente de 80 años con una infección de material de osteosíntesis vertebral (Pa11) aislado en el departamento de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

Para asegurar que esta cepa pudiera provocar una infección en conejo, se adecuó a él. Para ello, se indujo la formación de *biofilm* de esta cepa de *P. aeruginosa* en un cilindro de Ti-6Al-4V PQ de 3 mm de diámetro y 2 cm de largo en una dilución 1:100 de una suspensión $0,5 \pm 0,02$ McF de *P. aeruginosa* en 5 mL de TSB+1% de glucosa, incubado a 100 rpm a 37°C a lo largo de una noche. Tras la incubación, el cilindro cubierto de *biofilm* se lavó tres veces en SS y se implantó subcutáneamente en un conejo. A los 12 días, se extrajo el implante y el pus acumulado a su alrededor. El sonicado del implante y el pus recolectado se sembraron

en agar triptona-soja sangre (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y se incubaron durante 24 h, tiempo tras el cual se obtuvo un crecimiento abundante de la cepa de *P. aeruginosa* que colonizaba el implante (Figura 8.a-c).

4.2.3.2. Procedimiento quirúrgico y monitorización de los animales

La intervención quirúrgica del modelo *in vivo* se basó en el modelo previamente descrito por Cordero y colaboradores [148] (Figura 9). La anestesia se indujo mediante una mezcla 2:1 de ketamina y xilazina de acuerdo con el peso de cada animal administrada vía intramuscular y fue mantenida durante la intervención por vía inhalatoria con isoflurano al 2,5% de acuerdo a la tolerancia de cada animal. Antes de la intervención quirúrgica se procedió al rasurado de la piel de la zona articular femoral y se desinfectó la zona con clorhexidina alcohólica tintada de uso quirúrgico (Figura 9. a).

El aislamiento del campo quirúrgico se llevó a cabo mediante paños fenestrados estériles. La intervención quirúrgica se realizó a través de un abordaje directo sobre el trocánter mayor (asterisco de la Figura 9. b), extendiéndose unos 3 cm hacia la espina iliaca anterosuperior, disecando tejido celular subcutáneo, la fascia superficial, el ligamento iliofemoral hasta alcanzar la cresta intertrocanterea. Se taladró con una

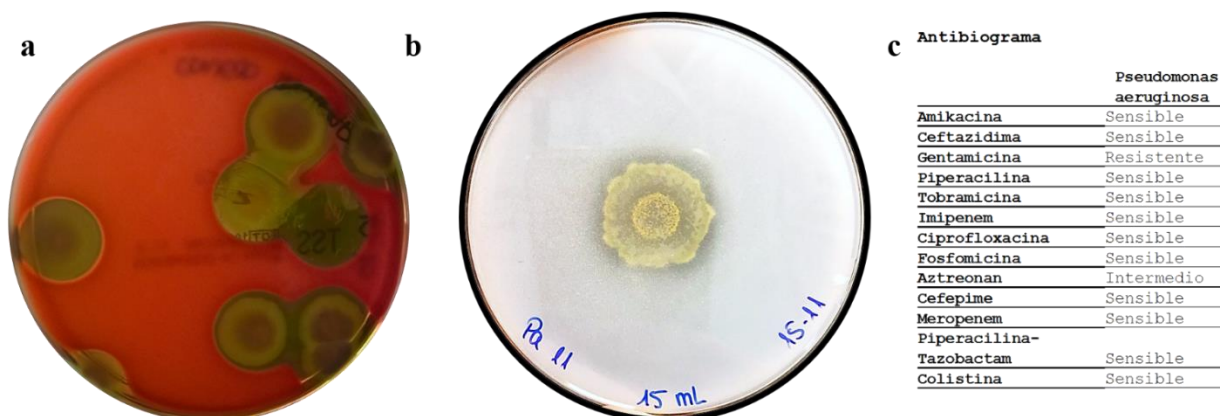


Figura 8. *P. aeruginosa* aislada tras su adecuación en conejo (*Oryctolagus cuniculus*) albino de Nueva Zelanda crecida en agar triptona-soja sangre (a), agar Pikovskayas* (b) y su antibiograma (c). *: El agar Pikovskayas debe su turbidez a la presencia de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, una sal insoluble de fosfato, que en el medio es la principal fuente de P.

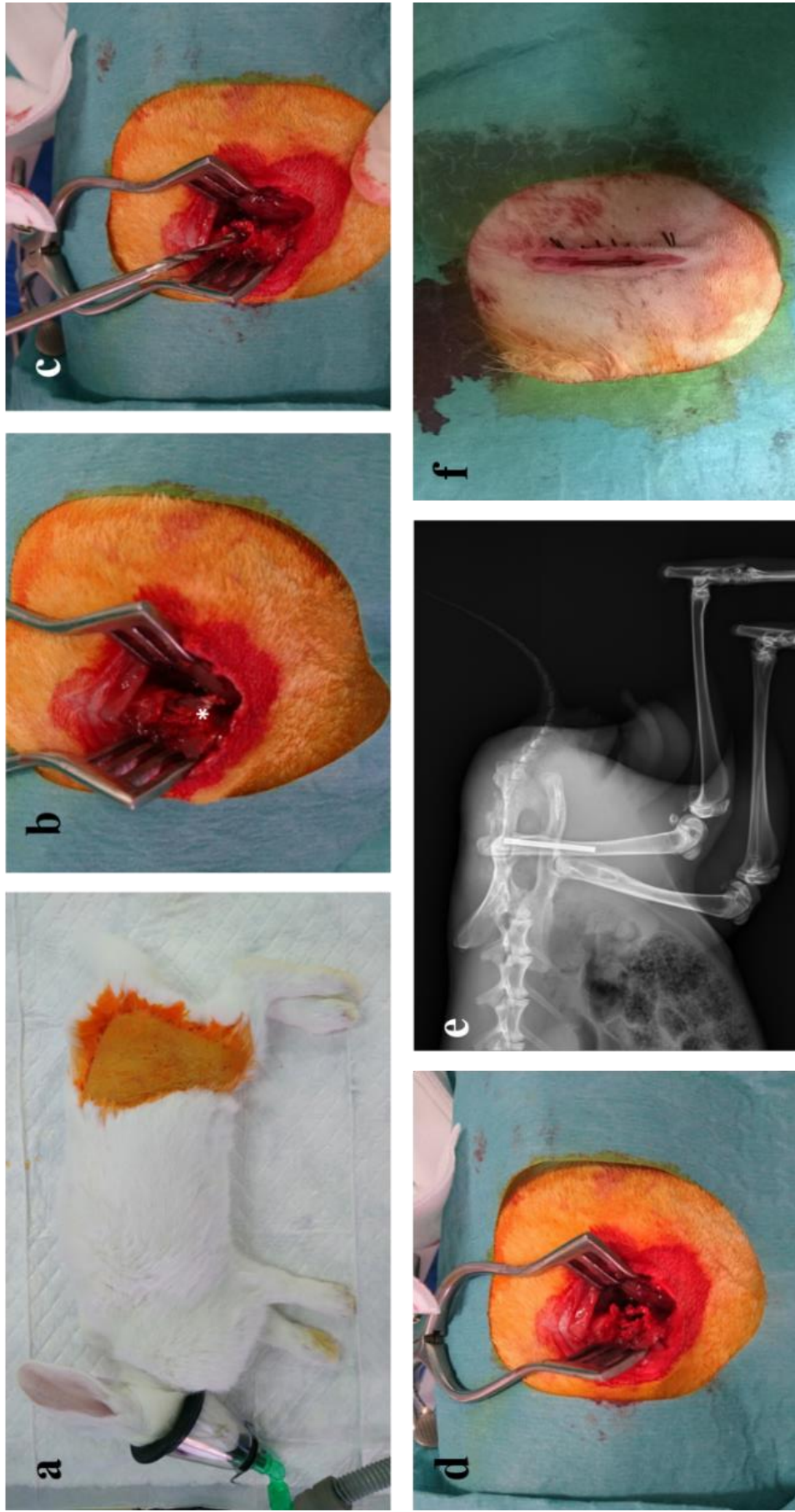


Figura 9. Resumen visual de algunos pasos del procedimiento quirúrgico en conejo (*Oryctolagus cuniculus*) albino de Nueva Zelanda. **a.** Animal anestesiado con el área quirúrgica rasurada y desinfectada con clorhexidina alcohólica tintada. **b.** Trocánter mayor (asterisco) expuesto tras diseccionar piel, tejido subcutáneo, la fascia superficial y el ligamento iliofemorales. **c-d.** Taladrado óseo en la cresta intertrócanterea. **e.** Radiografía del implante correctamente colocado intramedularmente en el agujero taladrado en el fémur. **f.** Incisión quirúrgica suturada con puntos de colchonero horizontales y limpia con suero fisiológico estéril.

broca de 3,2 mm de diámetro (Figura 9. c) hasta alcanzar 2 cm de profundidad (Figura 9. d). Sobre el agujero taladrado, se inyectó 100 µL de suero fisiológico 0,9% NaCl con o sin una concentración total de 10^6 UFC de *P. aeruginosa*. Posteriormente, se implantó a presión cada cilindro de Ti-6Al-4V según el grupo que le corresponda a cada animal hasta enrasar el implante con la superficie articular (Figura 9. e). Después se secó con gasas estériles y se procedió al cierre por los planos de la articulación utilizando puntos de colchonero horizontales (Figura 9. f). La incisión se cubrió con un apósito estéril cubierto de clorhexidina alcohólica tintada y sujeto a la piel del animal por los extremos con puntos simples. A fin de reducir el número de animales a utilizar, se intervinieron los dos fémures de cada animal con separación temporal de una semana entre cirugías.

Cada animal recibió analgesia postoperatoria con 0,2 mL de meloxicam vía subcutánea durante los primeros cinco días, a partir de los cuales se administrará en función de la evaluación del dolor que pase diariamente cada animal. Cada 24 h durante los días laborables, se procedió a la evaluación del dolor-estrés, la toma de la temperatura y el peso de cada animal a fin de velar por su estatus físico. La evaluación del dolor-estrés consistió en evaluar la presencia o ausencia de ocho comportamientos directamente relacionados con el dolor o el estrés en esta especie animal y el procedimiento quirúrgico al que fue sometido: presencia de paso cuidadoso o descarga en las patas delanteras, postura extendida, diarrea, estreñimiento, descarga ocular, protrusión de la membrana nictitante, aspecto adormilado y cabeza girada hacia atrás. Ante una pérdida de peso continuada en el tiempo, se tomaron las medidas de refinamiento más apropiadas para incitar al animal a comer. Para ello, se les ofreció verduras frescas aptas para consumo humano (zanahoria, espinacas y mezclas de brotes tiernos) o golosinas (principalmente mermeladas).

Se utilizaron 20 animales distribuidos en cuatro grupos: un primer grupo con un implante de Ti-6Al-4V PQ por fémur y sin infección (grupo Ti-6Al-4V PQ), un segundo grupo con un implante de Ti-6Al-4V PQ por fémur y con infección inducida por *P. aeruginosa* (grupo Ti-6Al-4V PQ + Pa11), un tercer grupo con un implante de Ti-6Al-4V NTc por fémur y sin infección (grupo Ti-6Al-4V NTc), y un cuarto grupo con un implante de Ti-6Al-4V NTc por fémur y con infección inducida por *P. aeruginosa* (grupo Ti-6Al-4V NTc + Pa11).

A las cuatro semanas de la segunda cirugía, cada animal fue eutanasiado bajo anestesia general por sobredosis intracardiaca de tiobarbital sódico. Las piezas se recuperaron mediante la preparación estéril de la cadera, el aislamiento de campo quirúrgico y el abordaje descritos en la cirugía primaria. Se procedió a la extracción de la diáfisis proximal femoral y se dividió en dos muestras: hueso y prótesis.

4.2.3.3. Procesamiento anatomopatológico y microbiológico de las muestras

El hueso periprotésico fue dividido en dos muestras: la más noble se destinó a los estudios anatomopatológicos y el resto a los estudios microbiológicos.

Para los estudios anatomopatológicos se realizaron a través de evaluación simple ciego. Cada muestra se fijó en una solución de formaldehído al 10% (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU) durante 24 h antes de descalcificarlas en formaldehído al 10% con ácido nítrico al 10% (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU) durante 24-36 h. Una vez descalcificado el tejido óseo se incluyó el material en parafina usando un procesador Leica ASP300 S (Wetzlar, Alemania) y se realizaron secciones de 3 µm de grosor con un micrótopo. Los cortes histológicos se montaron sobre portas SuperfrostTM (Fischer Scientific, New Hampshire, EE. UU) y se realizó una tinción histológica de hematoxilina-eosina usando un teñidor automático Dako CoverStainer (Agilent, California, EE. UU).

Se examinaron todos los cristales obtenidos y en ellos se valoró: la osteointegración, la remodelación ósea y la osteomielitis de aquellos cortes donde se viera completa la oquedad cilíndrica dejada por el implante.

La reacción de osteointegración se valoró a través de: la clasificación en osteointegración completa, parcial o ausente y el grosor medio de la membrana de interfase entre el hueso y el implante. La osteointegración completa se refirió a la formación de una estructura completa de trabéculas óseas, ya fuera de hueso trezado-inmaduro o laminar-maduro, alrededor del implante, con escasa membrana de interfase restante. La osteointegración parcial se definió como la formación focal de hueso con áreas sin osificar, donde la membrana de interfase ocupaba todavía la mitad del tejido periprotésico, mientras que la ausencia de osteointegración se refiere como la ausencia de formación de hueso y todo el tejido periprotésico era membrana de interfase. El grosor medio (μm) de la membrana de interfase se cuantificó mediante metraje microscópico y se estimó como el valor medio comprendido entre el grosor máximo y mínimo de esta membrana desde la luz dejada por el implante hasta la primera línea de hueso/osteoblastos. No se tuvieron en cuenta los restos celulares que pudieran haber sido arrastrados durante el corte, ni las áreas donde el hueso laminar estaba en contacto directo con el cilindro protésico.

La remodelación ósea se valoró de forma binaria en función de la presencia de celularidad remodeladora (osteoblastos y osteoclastos) en las trabéculas de nueva formación más cercanas al implante.

Dentro de la osteomielitis, se distinguió entre osteomielitis aguda y crónica en la totalidad del hueso: la osteomielitis aguda se definió como la aparición de focos de secuestro y necrosis óseos con celularidad polimorfonuclear (PMN) acompañante en campos de gran aumento (CGA) (≥ 5 PMN/CGA), en áreas alejadas de la médula ósea, donde la hematopoyesis de la serie mieloide pudiera llevar a confusión. La

osteomielitis crónica se interpretó como la presencia de focos de hueso esclerosado y restos de trabéculas secuestradas en relación a reacción fibrosa del estroma, con o sin infiltrado inflamatorio crónico acompañante.

Para los estudios microbiológicos, el hueso se sumergió en 15 mL de tampón fosfato salino (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y se sónico durante 5 min en un sonicador de baño de baja potencia. El sonificado resultante se diluyó en un banco de diluciones en base 10 y fue sembrado en agar sangre-chocolate (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) a través del método de extensión en placa, que consiste en sembrar 100 μL /placa de cada dilución. La concentración de bacterias se estimó como UFC/g de hueso y anejos. El implante se sonicó en 5 o 10 mL de tampón fosfato salino estéril (dependiendo de la longitud del implante, 5 mL para los implantes de 2 cm y 10 mL para los implantes de 4 cm) durante 5 min para liberar las bacterias adheridas y se estimó concentración como UFC/cm² de prótesis. Las placas fueron revisadas a las 24 y a las 48 h.

4.2.3.4. Monitorización los niveles de aluminio en la orina

Para este estudio, se realizó el mismo procedimiento experimental anteriormente descrito con algunas modificaciones que se describen a continuación. Para una mejor monitorización de los niveles de Al en la orina de los animales, 12 animales se intervinieron solo una vez utilizándose piezas de cada material de 4 cm de largo en vez de 2 cm y fueron infectados con un inóculo bacteriano de 200 μL de solución con una concentración de *P. aeruginosa* de 10^7 UFC/mL.

Al menos 1 mL de orina por animal se recolectó desde el día 0 hasta el día del sacrificio mediante micción no-forzada. El método de recolección de orina consistió en forrar con plástico la bandeja de la cada jaula y cubrir con una red de nylon de 500 μm el cajón de la misma a fin de evitar que las heces contaminaran la orina. Cada 24 h

después de la recolección de orina, cada bandeja y red fueron lavadas con agua del grifo a presión y enjuagadas concienzudamente con agua destilada desionizada. La concentración de Al total en la orina se estimó mediante adsorción atómica en horno de grafito en los Laboratorios clínicos Reference Laboratory (Barcelona, España).

Se utilizaron 14 animales distribuidos en cinco grupos: un primer grupo con un implante de Ti-6Al-4V PQ por fémur y sin infección (grupo Ti-6Al-4V PQ), un segundo grupo con un implante de Ti-6Al-4V PQ por fémur y con infección inducida por *P. aeruginosa* (grupo Ti-6Al-4V PQ + Pa11), un tercer grupo con un implante de Ti-6Al-4V NTc por fémur y sin infección (grupo Ti-6Al-4V NTc), un cuarto grupo un implante de Ti-6Al-4V NTc por fémur y con infección inducida por *P. aeruginosa* (grupo Ti-6Al-4V NTc + Pa11); y un quinto grupo compuesto por dos animales sin implante y sin infección, usados como control para los niveles basales de Al en la orina del animal.

La analgesia de estos animales fue a demanda en función de su evaluación del dolor-estrés.

En estos animales, se extrajo el fémur completo y se analizaron la diáfisis proximal y la distal femorales por separados para estimar las UFC/g de hueso y anejos y el implante de la misma forma que fue descrito anteriormente (véase 4.2.3.3. *Procesamiento anatomopatológico y microbiológico de las muestras*).

4.2.3.5. Estudios de microtomografía computarizada

Una muestra de hueso del grupo Ti-6Al-4V PQ del modelo anterior y otra del grupo Ti-6Al-4V NTc se fijaron en formol al 10% durante 48 h a 4°C. Tras la fijación, se deshidrataron en etanol al 96% durante 48 h, cambiando el etanol cada 24 h, y en etanol al 100% durante 48 h, cambiando el etanol cada 24 h.

Cada muestra se dejó secar al aire antes de ser escaneada con un dispositivo de

microtomografía computarizada (*micro-computed tomography*, micro-CT) XTH 160 micro-CT (Nikon, Tokio, Japón) con parámetros de escaneo de 140 kV, 52 mA, 1000 proyecciones, promedio de 4 marcos por proyección, usando un *target* de wolframio y un filtro de 0,25 mm de Cu.

Las reconstrucciones de las proyecciones de rayos X se hicieron con MyVGL (v. 3.1 VOLUME GRAPHICS, Heidelberg, Alemania).

4.3. Evaluación *in vitro* de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina

4.3.1. Liberación de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V cargados con gentamicina o vancomicina

La carga y liberación de los antibióticos en el material se llevó a cabo usando la metodología ya descrita en este trabajo anteriormente (véase 4.1.2. *Carga de los antibióticos y liberación de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V*), al igual que la actividad biológica de los liberados de Vm a lo largo del tiempo (véase 4.1.3. *Actividad biológica mediante difusión en disco*). En el caso de Gm, la concentración de antibiótico liberada en cada momento se determinó usando el método espectrofotométrico para el análisis cuantitativo de sulfato de Gm con *o*-ftaldialdehído descrito previamente por Frutos-Cabanillas y colaboradores [149]. El reactivo de ftaldialdehído se elaboró añadiendo 2,5 g de *o*-ftaldialdehído (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU), 62,5 mL de metanol, y 3 mL de 2-mercaptoetanol a 560 mL de una solución de borato sódico en agua destilada. Este reactivo se almacenó en una botella ámbar en oscuridad y durante un periodo no superior a tres días. La concentración de Gm se estimó mezclando la solución con Gm, isopropanol y el reactivo de ftaldialdehído en proporciones 1:1:1 y se incubó 30 min a temperatura

ambiente. Durante este tiempo, el *o*-ftaldialdehído reaccionó con los grupos amino de la Gm generando un cromóforo con una absorbancia máxima a 332 nm. Los valores de absorbancia de cada muestra fueron intrapolados en una recta patrón, previamente elaborada con concentraciones conocidas en el mismo medio de liberación.

4.3.2. Estudio celular de las capas anódicas con nanotubos con forma de botella o cónicos dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina

Para este estudio se usó la misma metodología descrita anteriormente (véase 4.2.2. *Estudio celular de los nanotubos dopados con F y P de la aleación de Ti-6Al-4V*).

Aleación Ti-13Nb-13Zr

4.4. Estudio de la posible capacidad bactericida de la aleación Ti-13Nb-13Zr en comparación con la aleación Ti-6Al-4V

4.4.1. Material

Se usaron barras de aleación Ti-13Nb-13Zr (Xian Saite Metal Materials Development Co., Ltd., Shaanxi, China). Como resultado de los diferentes elementos de esta aleación, el pulido químico en la aleación Ti-13Nb-13Zr favorece una mayor rugosidad, de manera incontrolada. Por lo tanto, los discos de 28 mm de diámetro y 2 mm de espesor de Ti-13Nb-13Zr fueron pulidos a través de grados sucesivos de papel SiC de hasta el grado 4000 (pulido mecánico, PM) y aclarados en agua desionizada para conseguir una rugosidad controlada sin alterar la composición química de la aleación [150]. La aleación Ti-6Al-4V fue usada como control.

Un segundo lote de discos de aleación Ti-6Al-4V también se pulió hasta el grado 4000 (Ti-6Al-4V PM) para poder descartar el efecto de la rugosidad en la adherencia bacteriana de la composición química.

Los valores de rugosidad media (R_a) se obtuvieron utilizando un perfilómetro confocal Plμ 2300 (Sensofar, Barcelona, España) operado a 20×. El R_a es el promedio de seis mediciones. El R_a para la aleación de Ti6AlV PQ, la aleación Ti6AlV PM y la aleación Ti-13Nb-13Zr PM fueron: $85,5 \pm 8,22$, $179 \pm 17,914$ y $154,94 \pm 20,67$ nm, respectivamente. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los pares siguientes: R_a Ti-6Al-4V PM > R_a Ti-13Nb-13Zr PM (p -valor < 0,05); R_a Ti-13Nb-13Zr MP > R_a Ti-6Al-4V PQ (p -valor < 0,001); y R_a Ti-6Al-4V MP > R_a Ti-6Al-4V PQ (p -valor < 0,001).

4.2.1. Bacterias

Se utilizaron cuatro cepas de colección y doce cepas clínicas. Las cepas de la colección fueron: *S. aureus* 15981 [140, 141], *S. epidermidis* ATCC 35984, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922. Las doce cepas clínicas utilizadas fueron: para *S. aureus* P1, P2 y P18, *S. epidermidis* P33, P55 y P101, *P. aeruginosa* Pa1, Pa2 y Pa3, mientras que para *E. coli* fueron Ec1, Ec2 y Ec3. Las cepas clínicas fueron aisladas de pacientes que desarrollaron IPA según un protocolo previamente descrito [38]. Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -80°C hasta que se realizaron experimentos.

4.2.2. Experimento de adherencia y viabilidad sobre la aleación Ti-13Nb-13Zr comparada con la aleación Ti-6Al-4V

Se realizó el procedimiento descrito con anterioridad (véase 4.2.1.3. *Experimento de adherencia*), con dos modificaciones: el medio de lavado e incubación fue SS y el tiempo de incubación fue 90 min.

4.2.3. Experimento de neutralización de la capacidad bactericida de la aleación Ti-13Nb-13Zr

El mismo protocolo descrito en el apartado anterior se repitió con el fin de neutralizar el efecto bactericida del OH^\bullet ; por lo tanto, se añadió dimetilsulfóxido al 1% (DMSO) [151] a ambos SS y agua utilizados para

lavar la tinción. Este experimento se realizó por triplicado para cada cepa.

4.2.4. Estimación de bacterias viables adheridas sobre la aleación Ti-13Nb-13Zr MP

Después del experimento de adherencia de algunas cepas, se estimaron UFC/cm² raspando la superficie superior de los discos con tabillas de madera estériles para corroborar las diferencias de viabilidad en cada aleación. Estas tabillas de madera con bacterias raspadas se sonicaron en un tubo cónico Falcon™ de 50 mL (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) con 10 mL de SS a 22°C durante 5 min [43]. Esta solución resultante del sonicado se diluyó en diluciones de base 10 con SS y se estimaron UFC/cm² adherido utilizando el método del *drop plate* [145]. Este experimento se realizó por triplicado para cada cepa.

4.2.5. Detección cualitativa de OH•

Para realizar este estudio, se prepararon discos especiales de cada aleación de doble cara para la detección química de OH•. Cada disco se sumergió en 5 mL de SS con 1 mg/mL de ácido 4-clorobenzoico (4CBA) (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU) y se incubó a 37°C durante 60 min. Las muestras se tomaron a 5, 15, 30 y 60 min. Como control, se utilizaron 5 mL de SS con 1mg/mL de 4CBA sin disco.

Cada muestra se analizó por RP-HPLC, de manera similar al método descrito por Cho y colaboradores [152]. Se usó una columna de fase inversa Zorbax Eclipse XDB - C18 (5 µm × 4,6 × 150 mm) (Agilent Technologies, California, EE. UU) con un detector Waters 2996 de diodos de longitud de onda variable (Waters Co. Massachusetts, EE.UU.) y controlada por Millennium 32 V4.0 (Agilent Technologies, California, EE.UU.) a 40°C de temperatura del horno. La fase móvil consistió en metanol/agua 80:20 (v / v). El caudal fue de 0,5 mL/min. El efluente se monitorizó a 230 nm para medir la degradación de 4CBA por efecto OH•, como se describió previamente [152]. El volumen de inyección fue de 100 µl. Este experimento se realizó por duplicado para cada aleación.

4.2.6. Evaluación microbiológica por microscopía electrónica de barrido

Se analizaron cuatro cepas bacterianas después de los diferentes protocolos de adherencia con microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM): *S. aureus* P2, *S. epidermidis* ATCC 35984, *P. aeruginosa* Pa3 y *E. coli* ATCC 25922. Se fijaron bacterias sobre las aleaciones con 2,5% de glutaraldehído en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M a pH 7 a 4°C durante 45 min. Las muestras se deshidrataron luego con concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90 y 100%) a 22°C durante 10 min. Las muestras se deshidrataron completamente usando un punto crítico a 1,5°C durante 30 min usando un desecador de vacío Mini Vac de PELCO® 2245 (Tes Pella, INC., California, EE.UU.).

Se obtuvieron micrografías utilizando un instrumento Hitachi S 4800 J de SEM (FEG-SEM) equipado con un detector de rayos X-EDX dispersor de energía (Chiyoda, Tokio, Japón).

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los resultados de RP-HPLC se realizó utilizando un modelo de crecimiento o disminución proporcional a partir de la curva de ajuste, utilizando el *software* Origin v.9 (OriginLab® Northampton, EE.UU.).

Los análisis estadísticos de los resultados microbiológicos y celulares se realizaron utilizando *Stata Statistical Software: Release 11* (StataCorp 2009). Previamente a la realización de cualquier contraste estadístico, se comprobó la normalidad de cada una de las series de datos a través de un test de Shapiro-Wilk. En el caso de que los datos fueran normales, se utilizó el test paramétrico de la *t* de Student unilateral para el contraste de dos grupos de datos, o un análisis de la varianza (ANOVA) para el contraste de más de dos grupos de datos. En el caso contrario, se aplicó el test no-paramétrico de Wilcoxon unilateral para el contraste de dos grupos de datos, o el test de

Kruskal-Wallis para el contraste de más de dos grupos de datos.

En el modelo *in vivo*, la comparación entre la concentración de Al en la orina de cada animal en cada día y la ganancia de peso de los animales se realizó a través de un modelo de regresión de efectos mixtos unilateral. La tasa de excreción cada 24 h de cada grupo experimental de animales se estimó calculando el producto de la concentración de Al (ng/mL), la cantidad de orina media ($62,5 \pm 12,5$ mL/Kg) [153] y el peso medio de cada grupo por día.

Se consideró significativo un nivel de significación estadística de $p \leq 0,05$.

Todos los datos se citan y representan como media y desviación estándar para los resultados estadísticamente normales; y como mediana y rango intercuartílico para los resultados estadísticamente no-normales.

5. Resultados y discusión

Aleación Ti-6Al-4V

5.1. Estudio de la liberación y la capacidad bactericida de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V y cargados con gentamicina, vancomicina y/o la mezcla de ambos antibióticos

Las IPA ocurren con poca frecuencia, pero representan la complicación más devastadora de este tipo de cirugía ortopédica, con alta morbilidad y un coste sustancial. *S. aureus* y *S. epidermidis* son los agentes más comúnmente aislados asociados con ellos [11], pero otras bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa* están ganando importancia ya que se asocian a una alta tasa de fracaso [154]. Tal como se ha descrito anteriormente, el uso de antibióticos administrados directamente en la interfase de prótesis-tejido podría ser una forma de prevenir o incluso tratar a nivel las IPA [114, 129, 154]. Un implante protésico idealmente perfecto debería ser resistente al desgaste y a la corrosión; ser biocompatible; tener propiedades antibacterianas y estimular la integración de los tejidos adyacentes [83].

Es sabido que las capas de nanotubos dopados con F de la aleación Ti-6Al-4V (Ti-6Al-4V NT) mediante el proceso de anodizado disminuyen la adherencia bacteriana hasta el 50% [111, 113] y aumentan la generación de la matriz de mineral de las células osteogénicas [147]. En este apartado, se evaluaron la liberación y la capacidad bactericida de las capas Ti-6Al-

4V NT cargados con Gm y Vm por el método de inmersión.

La mayor parte de la literatura referida a la carga de fármacos en estructuras nanotubulares utiliza un método de liofilización simplificado [85, 127-129, 137]. Este método es ampliamente aceptado y eficaz, ya que permite la carga completa de los nanotubos, sin embargo, no es fácilmente implementable por la industria farmacéutica o aplicable a implantes tridimensionales. Por esto, otros métodos, alternativos tales como: co-precipitación [125] o inmersión [138] se erigen como buenas alternativas.

La Figura 10 muestra las curvas obtenidas para la liberación de Gm y Vm de la capa NT *in vitro* por RP-HPLC aplicando el modelo no lineal de primer orden. Las constantes de velocidad cinética (Kobs) fueron 0,072 y 0,044 y los coeficientes de regresión (R^2) fueron 0,968 y 0,998 para Gm y Vm, respectivamente. Así, la liberación de Gm fue más rápida que la de la Vm. Esto se ve claramente al comienzo de la curva de liberación, que muestra una pendiente más pronunciada para Gm que para Vm (Figura 10). La liberación se estabilizó a los 120 min y 180 min para Gm y Vm, respectivamente. Esto se debe a un mecanismo típico de difusión de Fick para otros biomateriales, como, por ejemplo silicatos mesoporosos [155] y con otras capas nanotubulares de titanio cargadas con antibiótico, como Gm [129, 137] y Vm [85, 128, 156].

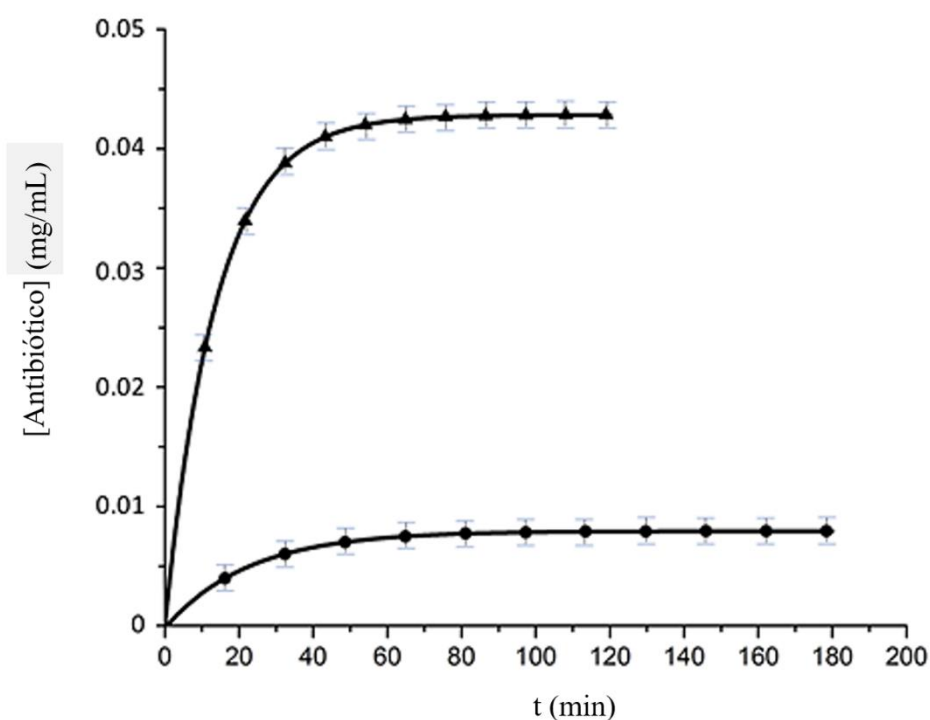


Figura 10. Curvas de liberación de Gm (triángulos) y Vm (círculos) a lo largo del tiempo (t). Las barras representan la desviación estándar.

La liberación de los antibióticos a partir de las capas de Ti-6Al-4V NT tiene lugar en dos etapas. En primer lugar, se produce una rápida desorción durante los primeros minutos, mientras el material se llena de agua [128, 138, 155-158], dando lugar a una liberación descontrolada. La segunda, que tiene lugar cuando las nanoestructuras ya están llenas, resulta en una liberación controlada. La primera etapa depende principalmente de la solubilidad del antibiótico en medio acuoso, mientras que la segunda depende de muchos otros factores tales como: interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, difusión sólido-líquido, solubilidad del fármaco y otros [138]. En trabajos anteriores, se demostró que las fuerzas electrostáticas podrían ser críticas en la liberación de un fármaco de materiales similares [155, 157]. Sin embargo, en este caso, el mayor tamaño de la Vm en comparación con la Gm parece ser la causa de una liberación más lenta de la Vm.

A partir de los 120 min para la Gm y los 180 min para la Vm, se detectó una degradación

antibiótica por RP-HPLC, entendiendo como degradación la disminución de la concentración antibiótica a lo largo de tiempo. Esta degradación puede ser atribuida a un mecanismo hidrolítico típico de estos antibióticos en las condiciones del ensayo [155].

Los resultados obtenidos por el método biológico se muestran en la Figura 11.a-c. La Figura 11.c muestra la concentración biológicamente activa de Gm cuando se carga en la mezcla (Gm+Vm). Esto es posible porque *E. coli* es una bacteria gramnegativa sensible a la Gm, pero totalmente inmune a Vm. No fue posible estimar la concentración de Vm por prueba de difusión en disco liberada por Ti-6Al-4V NT Gm+Vm porque se encontró cualquier bacteria resistente a la Gm y susceptibilidad a la Vm. Este método permitió corroborar que, a pesar de la degradación antibiótica detectada por RP-HPLC, estos compuestos mantienen una actividad biológica relativamente constante a lo largo del tiempo (Figura 11.a-c).

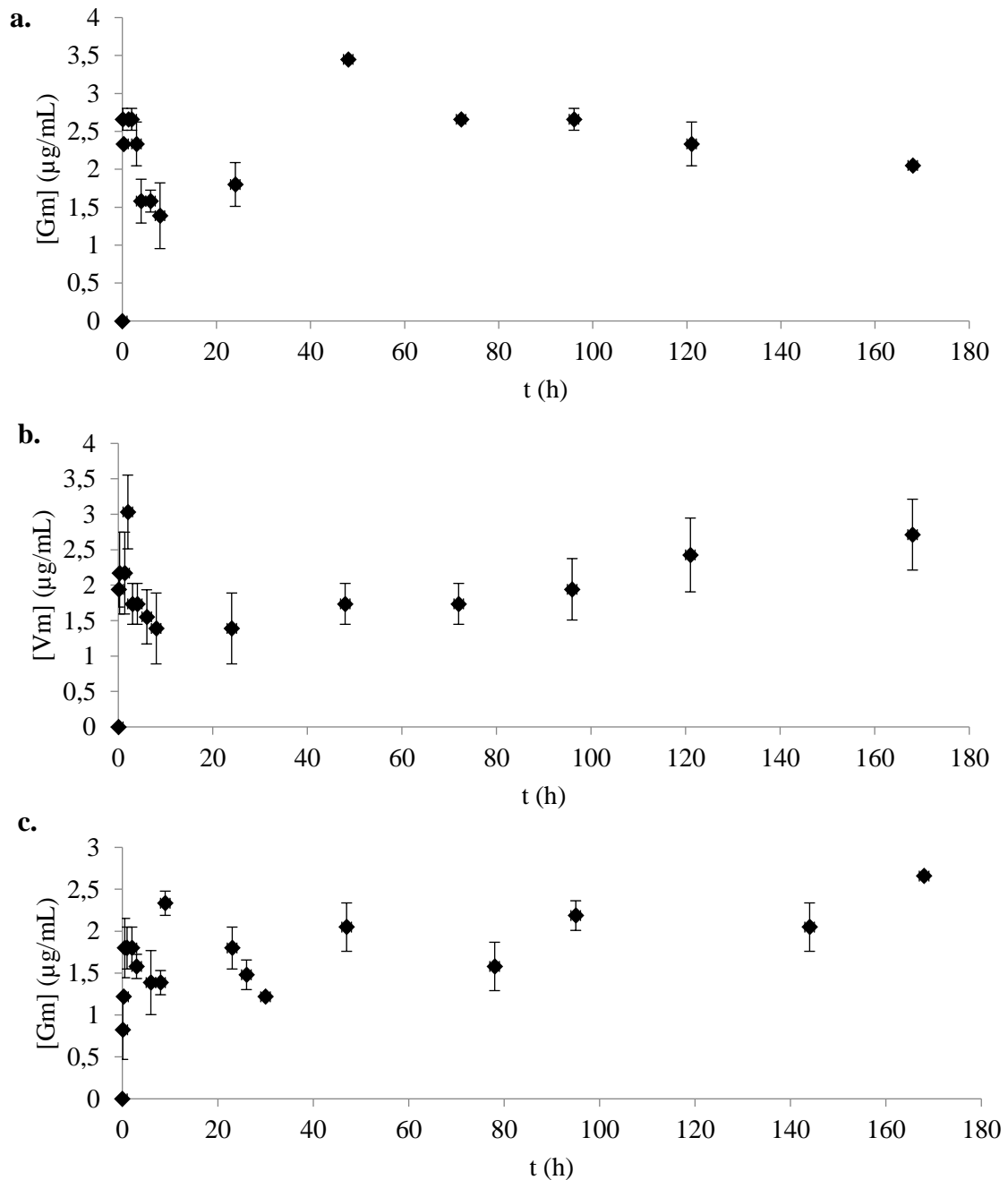


Figura 11. Concentración de Gm (a), Vm (b) y Gm de la mezcla Gm+Vm (c) a lo largo del tiempo (t) de acuerdo con la actividad biológica estimada usando *E. coli* ATCC 25922 para Gm y *B.subtilis* ATCC 6051 para Vm. Las barras representan la desviación estándar.

En este estudio, las capas de Ti- 6Al-4V NT se cargaron con dos de los antibióticos más utilizados en el campo de los biomateriales: Gm [125-127, 129, 155, 157] y Vm [85, 130]. Hasta la fecha, la carga de estos antibióticos se había estudiado *in vitro* por separado y nunca juntos, a pesar de que usar su combinación fuera un enfoque más cercano a la clínica terapéutica preventiva de este tipo de infecciones.

El porcentaje de viabilidad de las tres especies bacterianas testadas en Ti-6Al-4V NT-Gm fue significativamente menor que en muestras de NT sin antibióticos ($p < 0,01$) (Figura 11.a-c). Se detectaron diferencias significativas entre las muestras de Ti-6Al-4V NT-Gm y de Ti-6Al-4V NT-Gm+Vm ($p < 0,05$) para las tres bacterias y no hubo diferencias entre Ti-6Al-4V NT-Vm y Ti-6Al-4V NT-Gm+Vm para los estafilococos ($p > 0,05$) (Figura 12.a-b).

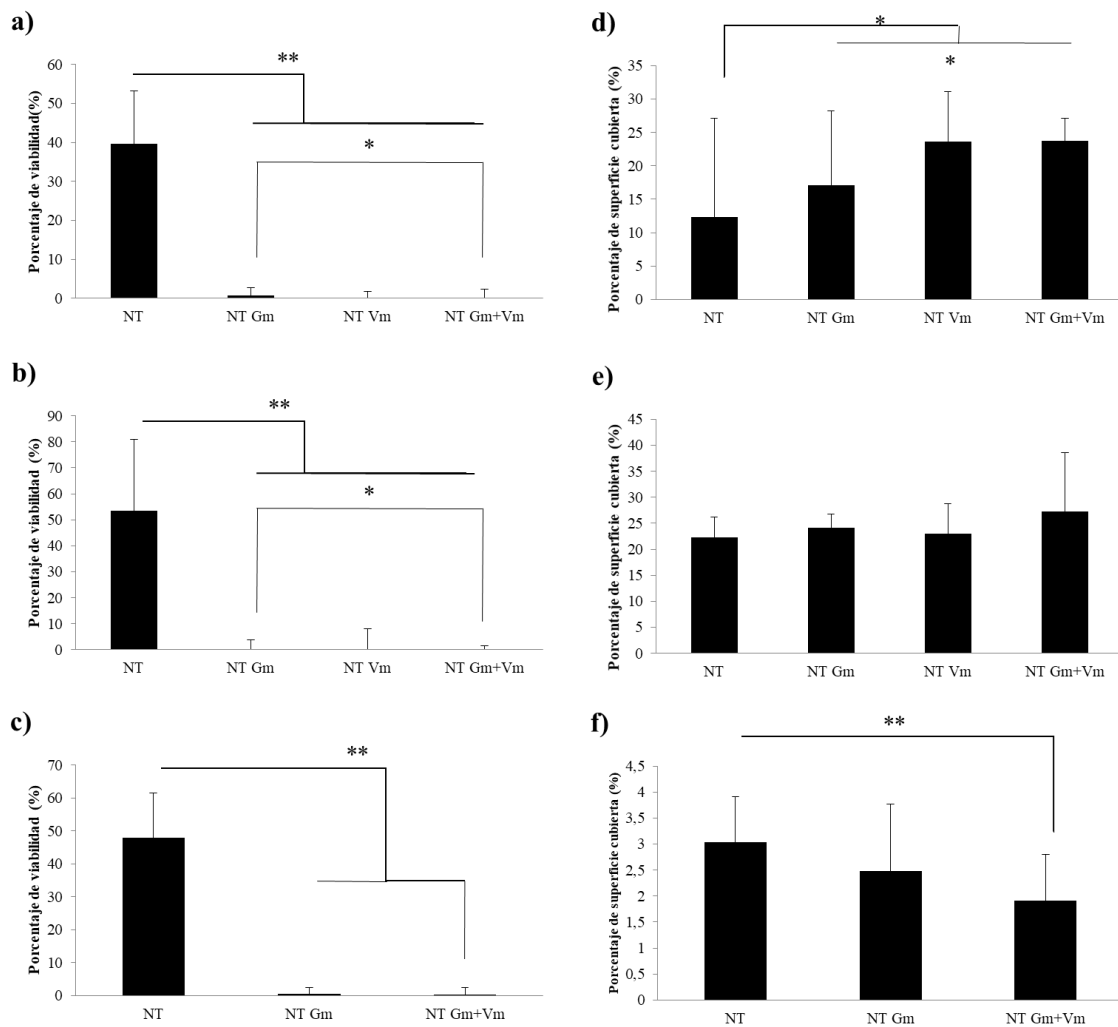


Figura 12. Porcentajes de viabilidad (a-c) y de superficie cubierta (d-f) por las bacterias adheridas de *S. aureus* 15981 (a y d), *S. epidermidis* ATCC 35984 (b y e) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (c y f) sobre Ti-6Al-4V NT-Gm, Vm o Gm+Vm. Las barras representan el rango intercuartílico. *: p<0,05. **: p<0,01.

La viabilidad de las bacterias adheridas a Ti-6Al-4V NT-Gm+Vm fue significativamente menor en comparación con Ti-6Al-4V NT sin antibióticos (Figura 12.a-c). Aunque la viabilidad bacteriana entre Ti-6Al-4V NT-Gm+Vm no fue significativamente diferente respecto Ti-6Al-4V NT-Vm para los estafilococos, se sabe que la utilización prolongada de altas dosis de un antibiótico bactericida conduce a la selección de cepas que producen mayores niveles de *persisters* [159]. Estas bacterias *persisters* pueden soportar altas concentraciones de antibióticos bactericidas, no pueden transferir esta capacidad a su progenie [160], y su proliferación está asociada a la monoterapia con antibióticos [161]. Por lo tanto, el uso de la mezcla de Gm y Vm

podría evitar las futuras resistencias antibióticas, especialmente en estas dos especies bacterianas que representan más del 60% de las IPA [35] y cuya resistencia a Vm es de creciente importancia [162]. Además, solo el uso de la mezcla de estos antibióticos fue capaz de reducir significativamente la viabilidad de las bacterias adheridas grampositivas (*S. aureus* 15981 y *S. epidermidis* ATCC 35984) y gramnegativas (*P. aeruginosa* ATCC 27853).

Los porcentajes de superficie cubierta por *S. aureus* 15981 presentaron diferencias significativas entre Ti-6Al-4V NT sin antibióticos y Ti-6Al-4V NT con antibiótico (p<0,05), y entre estos hubo diferencias significativas entre el material Ti-6Al-4V

NT-Gm y Ti-6Al-4V NT-Vm ($p < 0,05$). (Figura 12.d). Entre ellos, la adherencia en Ti-6Al-4V NT-Vm (solo o su mezcla) fue 35% mayor sobre Ti-6Al-4V NT-Gm, pero sólo hubo diferencias significativas entre Ti-6Al-4V NT-Gm y Ti-6Al-4V NT-Gm+Vm. Este aumento de adherencia se debe probablemente a la autólisis favorecida por el efecto bactericida de la Vm [162] que favorece la liberación del DNA bacteriano hacia el exterior e incrementa aún más la adherencia [163]. Por el contrario, no hubo diferencias significativas en la adherencia de *S. epidermidis* ATCC 35984 entre las muestras de Ti-6Al-4V NT sin cargar o cargadas con antibióticos, independientemente del antibiótico utilizado ($p > 0,05$) (Figura 12.e). La adherencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue llamativamente baja comparada con la de los estafilococos y disminuyó en las capas de Ti-6Al-4V NT dopado con F cargadas con antibióticos en comparación con las no-cargadas (Figura 12.f). Los porcentajes de superficie cubiertos por *P. aeruginosa* ATCC 27853 mostraron diferencias muy significativas entre las muestras Ti-6Al-4V NT-Gm y las Ti-6Al-4V NT-Gm+Vm ($p < 0,01$) (Figura 12.f). Entre ellos, la adherencia en Ti-6Al-4V NT-Gm+Vm fue significativamente menor que sobre Ti-6Al-4V NT-Gm. Esta disminución de la adherencia se debe a los dos efectos bactericidas de la Gm sobre bacterias gramnegativas, pues es capaz de inhibir la síntesis de proteínas a nivel ribosomal y comprometer la integridad de la membrana externa [164]. Esta perturbación de la membrana externa desestabilizaría el mecanismo responsable del funcionamiento de los apéndices implicados en la adherencia, como los pili tipo IV [165] que reconocen y están implicados en la adherencia a las superficies abióticas [166].

5.2. Evaluación de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V

5.2.1. Estudios *in vitro*

5.2.1.1. Estudios microbiológicos

El efecto antibacteriano de las capas anódicas de la aleación Ti-6Al-4V con nanotubos con forma de botella dopados con F y P (Ti-6Al-4V NTc) fue complejo, ya que se demostró una disminución de la adherencia de las dos cepas de estafilococos ensayadas, así como de dos cepas gramnegativas, *E. coli* ATCC 25922 y *S. maltophilia* ATCC 13637. Además, redujo la viabilidad de *S. aureus* 15981, *S. epidermidis* ATCC 35984 y *S. maltophilia* ATCC 13637; y presentó la capacidad de marcar las bacterias gramnegativas que han estado en contacto con él mediante la captación bacteriana del Al liberado desde el interior de la nanoestructura de Ti-6Al-4V NTc (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. maltophilia* ATCC 13637).

La concentración de Al liberado de las muestras de Ti-6Al-4V NTc fue detectable (> 5 ng/mL) y no varió entre 2, 3, 4 y 24 h. Estos niveles se tornaron indetectables (< 5 ng/mL) a partir de las 26 h en SS. Por el contrario, en el SS con DFX, la concentración de Al fue más alta entre 2 y 6 h, en este punto comenzó a disminuir, alcanzando niveles indetectables a las 32 h (Figura 13). Este es el primer trabajo que pone de manifiesto la liberación de uno de los elementos de aleación Ti-6Al-4V: el Al. La presencia de elementos de aleación en la capa de óxido anódico de titanio crecido se ha informado anteriormente [139, 144]. Tanto el Al como el vanadio presente en la aleación de titanio se incorporan en las capas anódicas como Al_2O_3 y V_2O_5 . Como el mecanismo de crecimiento de la capa anódica implica la migración iónica, algunos de los cationes metálicos de titanio o de Al que⁺ entran en el baño anódico y también pueden estar presentes en la solución residual retenida dentro de la nanoestructura crecida. Este Al presente en la solución retenida dentro de los nanotubos puede

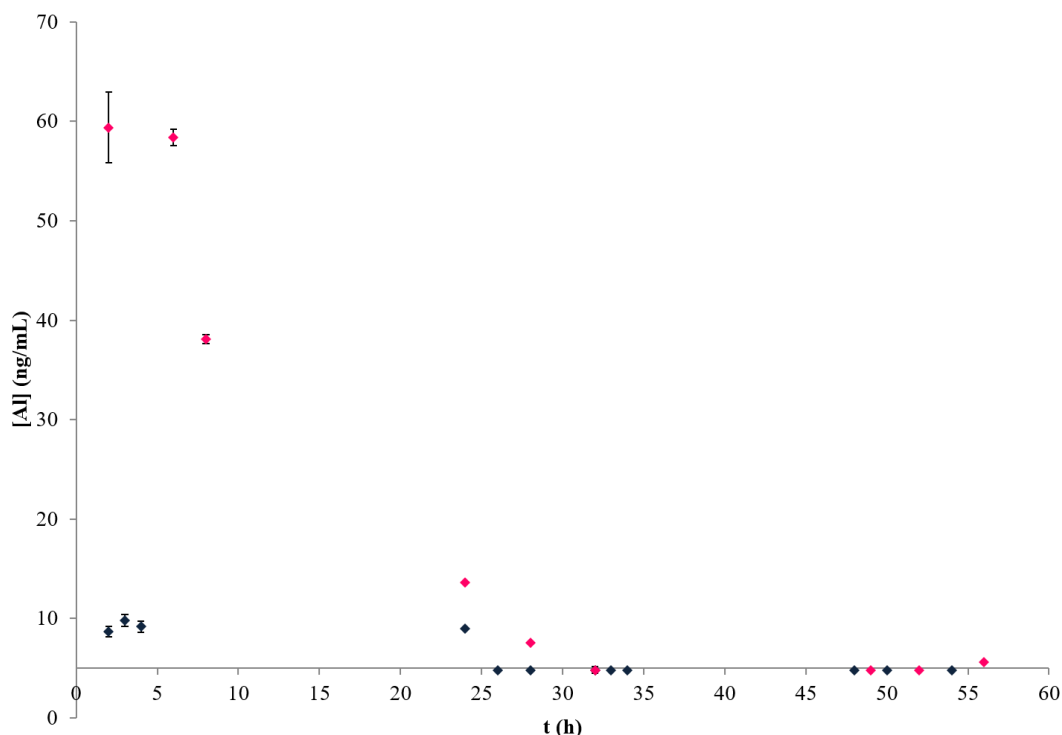


Figura 13. Concentración de Al liberado desde el interior de las nanoestructuras de Ti-6Al-4V NTc a lo largo del tiempo (t) con (puntos magentas) y sin DFX (puntos azules). Las barras representan la desviación estándar.

liberarse más tarde durante las primeras horas de inmersión. La concentración de Al detectada fue mayor cuando se añadió DFX al medio, un quelante de cationes trivalente, (Figura 13). La disminución en la concentración de Al a lo largo del tiempo sería el resultado de la formación de hidróxido de aluminio (insoluble) en las condiciones cercanas a un pH neutro y tamponadoras del ensayo *in vitro* [167, 168].

Desafortunadamente, una de las limitaciones de este estudio fue el límite de detección de Al en el medio (<5 ng/mL), por lo que si los niveles de Al de cualquiera de los materiales estudiados, se encuentra por debajo de este umbral, serían indetectables por la técnica empleada.

Tal y como se comentó anteriormente, las IPA son el resultado de un proceso infeccioso de múltiples pasos que consiste en la adherencia, la proliferación, la maduración y la dispersión de al menos una especie microbiana. Teniendo en cuenta que ningún material puede evitar por completo la adherencia bacteriana y la colonización de la superficie [169], la disminución de la adherencia bacteriana en una aleación

biomédica es una buena estrategia para prevenir las IPA.

La adherencia bacteriana disminuyó en cuatro de las especies bacterianas probadas sobre Ti-6Al-4V NTc en comparación con Ti-6Al-4V PQ (Figura 14.a). La adherencia de *S. aureus* 15981, *S. epidermidis* ATCC 35984, *E. coli* ATCC 25922 y *S. maltophilia* ATCC 13637 disminuyó significativamente, disminuyendo respectivamente en un 20% ($p < 0,0001$), 45% ($p < 0,0001$), 9% ($p = 0,0277$) y 80% ($p < 0,0001$) sobre las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con las muestras de Ti-6Al-4V PQ, respectivamente. Estos resultados son similares a los descritos previamente en la literatura, que informaron que las capas anódicas de TiO₂ dopadas con F en la aleación Ti-6Al-4V disminuyeron significativamente la adherencia estafilocócica [27, 33] e incluso el desarrollo de *biofilms* de bacterias y hongos relacionados con IPA [40]. Por el contrario, *P. aeruginosa* ATCC 27853 aumentó ligeramente su adherencia en muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con Ti-6Al-4V PQ; junto con la viabilidad

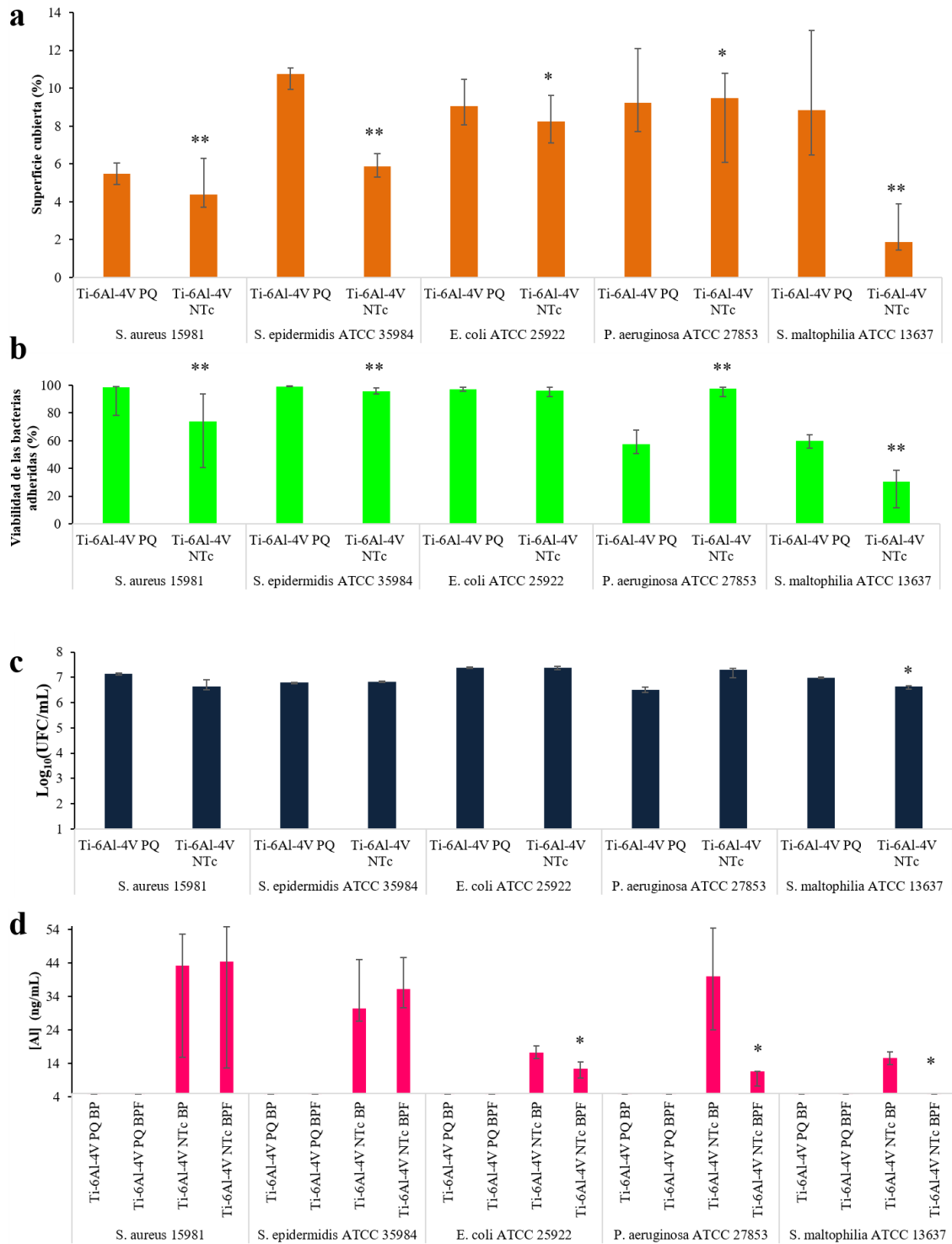


Figura 14. Resultados del experimento de adherencia bacteriana de las diferentes especies probadas: *S. aureus* 15981, *S. epidermidis* ATCC 35984, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. maltophilia* 13637. (a) Porcentajes de superficie cubierta. (b) Porcentaje de viabilidad de las bacterias adheridas. (c) UFC/mL de solución bacteriana después de la incubación. (d) Al liberado de cada aleación en presencia de bacterias planctónicas (BP) y Al no-captado por las bacterias planctónicas (bacterias planctónicas filtradas, BPF). Las barras representan el rango intercuartílico. *: $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc o entre BP y BPF. **: $p < 0,01$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc. ***: $p < 0,001$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc.

significativamente mayor de las bacterias adheridas en Ti-6Al-4V NTc, este aumento en la adherencia sugiere que esta especie se adhiere activamente a las muestras de NTc. Esta afirmación está respaldada por el hecho de que la adherencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en (dopado con F y P) Ti-6Al-4V NTc aumentó hasta en un 50% en comparación con otras capas nanotubulares similares (solo dopadas con F) de Ti-6Al-4V (Ti-6Al-4V NT) [170].

La viabilidad bacteriana de *S. aureus* 15981, *S. epidermidis* ATCC 35984 y *S. maltophilia* ATCC 13637 disminuyó significativamente, en un 25% ($p < 0,0001$), 4% ($p < 0,0001$) y 47% ($p < 0,0001$) sobre las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con las muestras de Ti-6Al-4V PQ, respectivamente (Figura 14.b). Por el contrario, la viabilidad de *P. aeruginosa* ATCC 27853 bacterias adheridas aumentó casi 70% sobre las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con las muestras de Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,0001$).

Solo la concentración de bacterias de *S. maltophilia* ATCC 13637 en la solución bacteriana después de 120 min de incubación disminuyó significativamente en 55% ($p = 0,0495$) sobre Ti-6Al-4V NTc ($\text{Log}_{10}[\text{UFC}/\text{mL}] = 6.6232$) en comparación con Ti-6Al-4V PQ ($\text{Log}_{10}[\text{UFC}/\text{mL}] = 6.9731$) (Figura 14.c). Esta tendencia se observó en *S. aureus* 15981, aunque no fue estadísticamente significativa ($p = 0,1133$).

Con respecto a la captación de Al, solo las bacterias gramnegativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. maltophilia* ATCC 13637) mostraron una diferencia significativa entre los niveles de Al en la solución bacteriana filtrada después de 120 min de incubación y la solución no-filtrada ($p = 0,0071$ para *E. coli* ATCC 25922, $p = 0,0086$ para *P. aeruginosa* ATCC 27853, y $p = 0,0119$ para *S. maltophilia* ATCC 13637) (Figura 14.d). Esta liberación de Al no se detectó en ninguna muestra Ti-6Al-4V PQ.

El catión Al^{3+} es tóxico para los microorganismos [171]. Aunque el mecanismo de toxicidad de Al no se entiende completamente, se sabe que los cationes Al^{3+} pueden unirse a las cabezas hidrófilas de los fosfolípidos y proteínas de la membrana celular, alterando así las interacciones lípido-proteína y modificando la actividad de transporte. Una vez dentro de las bacterias, el Al puede afectar el metabolismo uniéndose a enzimas (por ejemplo, fosfatasa) o sustratos enzimáticos, puede desestabilizar y reemplazar al magnesio o al calcio en los sistemas biológicos y promover la acidificación del medio [171].

La viabilidad bacteriana de las bacterias adheridas de *S. aureus* 15981, *S. epidermidis* ATCC 35984 y *S. maltophilia* ATCC 13637 disminuyó significativamente en las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con Ti-6Al-4V PQ (Figura 14.b), a su vez, pudo apreciarse una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad de las bacterias planctónicas de *S. maltophilia* ATCC 13637 y casi significativa para *S. aureus* 15981 (Figura 14.c). Este efecto bactericida se debió al Al liberado por las muestras Ti-6Al-4V NTc, ya que cuando se agrega DFX, la viabilidad bacteriana de *S. aureus* 15981 y *S. maltophilia* ATCC 13637 aumentó significativamente en las muestras de Ti-6Al-4V NTc +DFX respecto a las muestras Ti-6Al-4V NTc (Figura 15.a), la concentración de bacterias viables planctónicas de *S. maltophilia* ATCC 13637 aumentó hasta ser estadísticamente igual que la concentración expuesta a las muestras Ti-6Al-4V PQ (Figura 15.b) y la captación de Al por parte de las bacterias planctónicas desapareció en *S. maltophilia* ATCC 13637, pues no hubo diferencias significativas entre la concentración de Al en el inóculo de las bacterias planctónicas y en esta solución bacteriana filtrada (Figura 15.c). Este experimento no pudo realizarse utilizando *S. epidermidis* ATCC 35984 porque es intrínsecamente susceptible a la DFX [172]. Este efecto bactericida del Al ha sido descrito recientemente en *S. aureus* por otros autores, que afirman que la membrana

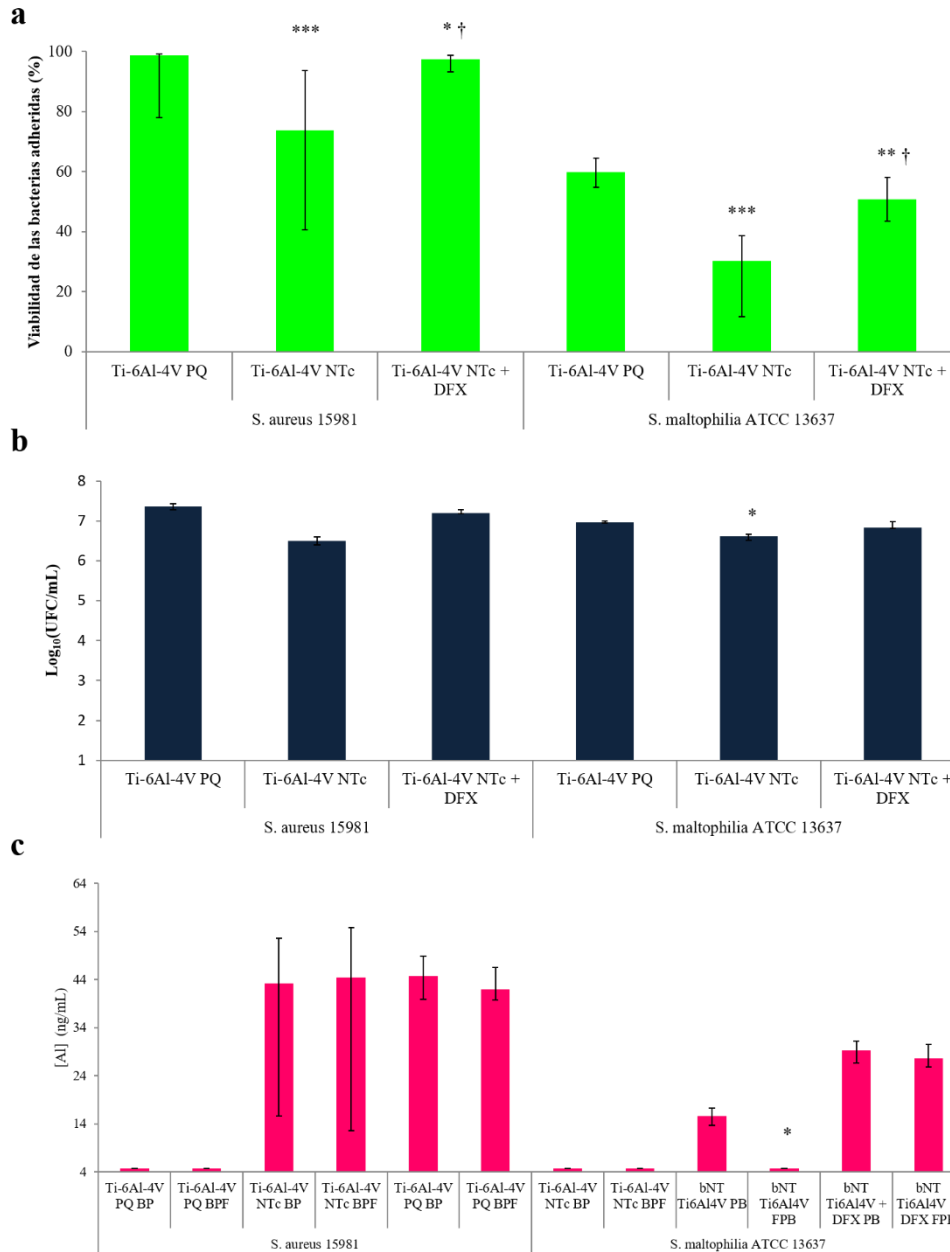


Figura 15. Neutralización del efecto bactericida del Al liberado de las muestras de Ti-6Al-4V NTc en *S. aureus* 15981 y *S. maltophilia* ATCC 13637. (a) Porcentaje de viabilidad de las bacterias adheridas. (b) UFC/mL de solución bacteriana después de la incubación. (c) Al liberado de cada aleación en presencia de bacterias planctónicas (BP) y Al no-captado por bacterias planctónicas (bacterias planctónicas filtradas, BPF). *: $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc o entre BP y BPF. **: $p < 0,01$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc. ***: $p < 0,001$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc. †: $p < 0,001$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V NTc y Ti-6Al-4V NTc + DFX.

citoplasmática de *S. aureus* se compromete gravemente cuando se expone a dosis tóxicas de este metal [173]. Este efecto bactericida de Al no se había sido descrito para *S. maltophilia* ATCC 13637, pero sí se había informado en otras bacterias gramnegativas como *P. fluorescens* [174].

Los sideróforos son pequeñas moléculas orgánicas que exhiben una alta afinidad de unión por el hierro [175], aunque son capaces de quelar otros numerosos cationes metálicos [176, 177]. Estos sideróforos puede desempeñar otras funciones además de la captación de hierro, así desempeñan un papel en la señalización celular, un efecto

antibiótico, protección contra el estrés oxidativo y protección contra metales pesados tóxicos [176]. El Al es uno de los metales distintos al hierro a los que los sideróforos pueden unirse [178]. Dependiendo de la coordinación espacial de los ligandos de oxígeno que se unen al hierro, los sideróforos se pueden clasificar en tres categorías principales: hidroxamato, catecolato y carboxilato. Todas las especies bacterianas ensayadas pueden producir al menos un sideróforo perteneciente a una de estas tres de las familias mencionadas anteriormente, concretamente al tipo de

catecolato. Así, *S. aureus* sintetiza tres sideróforos: estafiloferrina A (tipo catecolato) [179, 180], estafiloferrina B (tipo catecolato) [179, 180], y aureoquelina [181], mientras que *S. epidermidis* sólo puede sintetizar estafiloferrina A [182]. *E. coli* sintetiza un sideróforo principal llamado enteroquelina (tipo catecolato) [183]. Se sabe que, *P. aeruginosa* produce dos sideróforos químicamente distintos: pioquelina (tipo catecolato) [184] y piovordina (tipo hidroxamato) [185]. Los sideróforos de *S. maltophilia* suscitan controversia, ya que esta bacteria puede

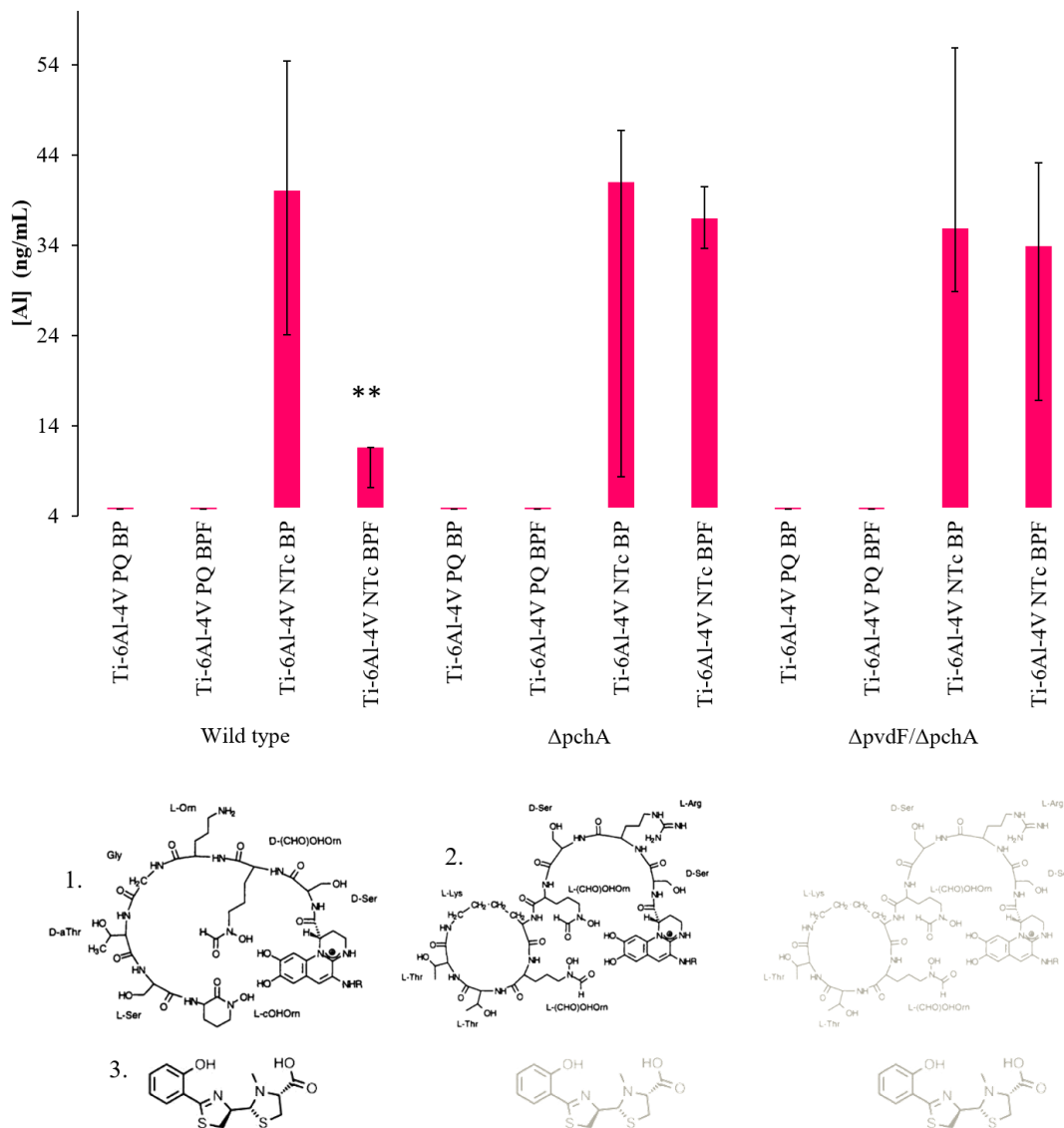


Figura 16. Captación de Al en diferentes mutantes de *P. aeruginosa* para pioquelina ($\Delta pchA$) y piovordina-pioquelina ($\Delta pvdF/\Delta pchA$). Las barras representan el rango intercuartílico. 1: estructura química piovordina de *P. aeruginosa* ATCC 27853 [194]. 2: estructura química piovordina de *P. aeruginosa* ATCC 15962 [196]. 3: estructura química pioquelina de *P. aeruginosa* [176]. BP: bacterias planctónicas. BPF: bacterias planctónicas filtradas. **: $p < 0,01$ para el test de Wilcoxon entre BPy BPF.

capturar eficientemente otros sideróforos bacterianos, a pesar de que algunos autores afirman que esta bacteria sintetiza sus propios sideróforos: únicamente oribactina (tipo hidroxamato) [186], solo enterobactina (tipo catecolato) [187, 188], y/o citrato [187].

Algunos autores afirman que estos sideróforos pueden favorecer la adherencia de enterobacterias en superficies de TiO₂ [189]; quizás esta sea la razón por la cual la adherencia de *E. coli* ATCC 25922 disminuye en muestras de Ti-6Al-4V NTc ya que en lugar de unirse a las muestras de Ti-6Al-4V NTc, la enterobactina estaría quelando el Al liberado por la nanoestructura (Figura 14.a).

Las bacterias grampositivas tienen una sola membrana lipídica rodeada por una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, mientras que la pared de las bacterias gramnegativas consiste en una delgada capa de peptidoglicano en el espacio periplásmico entre la membrana lipídica interna y lipoproteica externa [190]. La captación del complejo sideróforo-metal es específica de especie y es radicalmente diferente entre bacterias grampositivas y gramnegativas. La absorción de sideróforos metálicos de las bacterias gramnegativas es marcadamente diferente de las bacterias grampositivas. Mientras que las cepas gramnegativas requieren un receptor de membrana externa, una proteína de unión periplasmática y una proteína de membrana citoplasmática que pertenece al transportador específico con casete de unión a ATP (transportador tipo ABC) [177, 183], las bacterias grampositivas son más simples y solo requieren un transportador tipo ABC [180]. En este estudio, solo las cepas gramnegativas pudieron captar significativamente el Al liberado de Ti-6Al-4V NTc (Figura 14.d). Este hallazgo concuerda con lo afirmado por otros autores que señalaron que el complejo sideróforo-Al pueden ser reconocido por el receptor de la membrana externa y ser transportados al

periplasma, donde quedaría retenido en las bacterias gramnegativas [191, 192].

En el caso concreto de *P. aeruginosa*, esta captación irreversible de Al estaría mediada por la pioquelina (Figura 16). Como se dijo anteriormente, *P. aeruginosa* produce dos sideróforos, a saber, pioquelina, que se une al Fe³⁺ con una estequiometría de 2:1, y pioverdina, que se une al Fe³⁺ con una estequiometría 1:1, junto con sus respectivos receptores de membrana externa [193]: el receptor de pioquelina:Fe³⁺ (FptA) [194] y el receptor de pioverdina:Fe³⁺ (FpvA) [195]. Ambos permiten al complejo sideróforo:Al³⁺ llegar al periplasma [146, 178, 196-198], mientras que el complejo pioverdina:Al³⁺ puede secretarse mediante un sistema de flujo de salida dependiente de ATP del periplasma al espacio extracelular a través de sistemas de extrusión, como el PvRT-OpmQ descrito previamente en *P. aeruginosa* ATCC 15962 [198, 199], el complejo pioquelina:Al³⁺ no tiene un sistema de extrusión semejante [199], y por lo tanto quedaría retenido en el periplasma, al menos en nuestras condiciones experimentales. Por ello, la captación de Al solo fue detectable en *P. aeruginosa wild type*. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas entre la solución bacteriana filtrada y la no filtrada de *P. aeruginosa* ATCC 15692 mutantes $\Delta pchA$ y $\Delta pvd/\Delta pchA$ (Figura 16). A pesar de la diferencia en la estructura química de la pioverdina entre *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* ATCC 15962 (véase Figura 16.1 y 16.2), se puede suponer que su función es la misma [200].

Este hallazgo incentiva nuevas líneas de investigación centradas en la interacción *P. aeruginosa* y Ti-6Al-4V NTc que permitan evaluar el efecto de la competencia entre el Fe y el Al liberado por el material al unirse a la pioverdina en el desarrollo de *biofilm* y maduración a lo informado por otros autores [201, 202].

La formación de fosfato de aluminio se ha descrito recientemente en aleaciones de aluminio anodizadas en condiciones ácidas

[203]; por lo tanto, se supuso que esta formación podría tener lugar durante el proceso de anodizado de la aleación Ti-6Al-4V. Desafortunadamente, aunque la presencia de fosfato en las muestras de Ti-6Al-4V NTc ha sido confirmada por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X y espectrometría de masas de iones secundarios estáticos (datos no mostrados), no fue posible establecer si el fosfato se encontraba en forma de fosfato de titanio y/o de aluminio o solo de fosfato de titanio. Por su parte, *P. aeruginosa* es una de las bacterias capaces de promover la solubilización de fósforo insoluble, a partir de compuesto como CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 y AlPO_4 , a formas accesibles como ortofosfato para sí misma y para las plantas con las que pueda establecer simbiosis en la rizosfera [203-207]. Para testar la capacidad de movilización de Al por *P. aeruginosa*, se incubó *P. aeruginosa* ATCC 27853 con muestras de Ti-6Al-4V NTc que habían sido tratadas hasta que los niveles de Al fueran indetectables en suero fisiológico, por lo que solo quedaría el AlPO_4 formado durante el proceso de anodizado. Después de 24 h de incubación, la movilización biológica de Al se detectó solo en el interior de las bacterias planctónicas expuestas a las muestras de Ti-6Al-4V NTc (Figura 17.a) y no en las bacterias adheridas a él (Figura 17.b). Se sabe que este Al ha sido captado, ya que hubo diferencias significativas entre la solución bacteriana filtrada después de 24 h min de incubación y sin filtrar ($p=0,0495$). La concentración de Al fue detectable en las bacterias adheridas en solo uno de los experimentos: 6,1 ng/ml de Al (Figura 17.b).

Este tipo de interacción entre una bacteria y una aleación de titanio anodizado con potencial uso clínico no había sido descrito hasta ahora. Este hallazgo respaldaría la hipótesis antes mencionada de que el ligero, pero significativo aumento de la adherencia y de la viabilidad de *P. aeruginosa* ATCC 27853 se deben a que esta bacteria se adhiere activamente a la aleación Ti-6Al-4V NTc. En base a los resultados, parece que *P. aeruginosa* se adhiere primero a las muestras

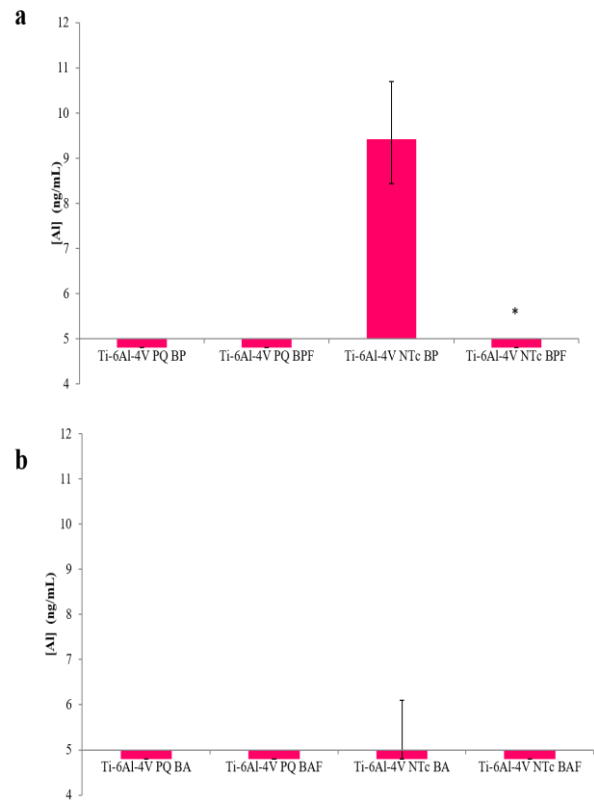


Figura 17. Resultados de movilización y captación de Al por *P. aeruginosa* ATCC 27853 en las bacterias planctónicas (a) y adheridas (b) después de 24 h de incubación en Ti-6Al-4V NTc. Las barras representan el rango intercuartílico. *: $p < 0.05$ para el test de Wilcoxon entre BP y BPF.

de Ti-6Al-4V NTc, solubiliza Al a partir del AlPO_4 de la aleación anodizada, y luego se despegar de ella. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que, en una de las réplicas experimentales, se detectó Al en bacterias adheridas sobre Ti-6Al-4V NTc (Figura 17. b).

5.2.1.2. Estudios celulares de las capas anódicas de la aleación Ti-6Al-4V con nanotubos con forma de botella dopados con F y P

En este apartado se demuestra que la aleación Ti-6Al-4V NTc tiene un efecto osteostimulador que promueve la proliferación celular, la generación de matriz ósea y la expresión génica de la diferenciación ósea debido a la incorporación de P en la superficie de la aleación Ti-6Al-4V [139, 144].

La formación de hueso alrededor de los implantes es un proceso compuesto de varias

etapas que implica la adherencia de los osteoblastos, la proliferación, la diferenciación, la secreción de proteínas de la matriz extracelular y la mineralización ósea de esta matriz.

La proliferación celular de células osteoblásticas MC3T3-E1 aumentó significativamente en las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con las muestras de Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,0001$). Por lo tanto, el porcentaje medio de proliferación celular en las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con Ti-6Al-4V PQ (normalizado al 100%) fue 203 y 156% a las 48 y 168 h, respectivamente (Figura 18.a).

La mineralización de la matriz ósea aumentó significativamente en las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con las muestras de Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,0001$), por lo que el porcentaje medio de mineralización celular en las muestras de Ti-6Al-4V NTc en comparación con Ti-6Al-4V PQ (normalizado a 100%) era aproximadamente 140% a los 10 días de cultivo (Figura 18.b).

Las muestras de Ti-6Al-4V NTc aumentaron significativamente la expresión génica de todos estos marcadores probados en células MC3T3-E1 a las 120 h: VEGF y BGLAP triplicaron su expresión ($p = 0,0085$ y $p = 0,0028$, respectivamente), mientras que RunX casi duplicó su expresión en las muestras Ti-6Al-4V NTc ($p < 0,0001$) (Figura 18.c).

Previamente, algunos autores afirmaron que la adherencia, la proliferación y la diferenciación celular están relacionadas con la nanoestructura donde estas células crecen [208-214], sin tener en cuenta los cambios en la composición del óxido inducidos por el proceso de anodizado y debido a la presencia de diferentes aniones en la solución de anodización. Los resultados del este estudio muestran que la presencia de F y P en las capas anódicas crecidas sobre la aleación Ti-6Al-4V aumentan el crecimiento osteoblástico, la mineralización de la matriz ósea y la expresión génica de todos los marcadores osteoblásticos probados debido

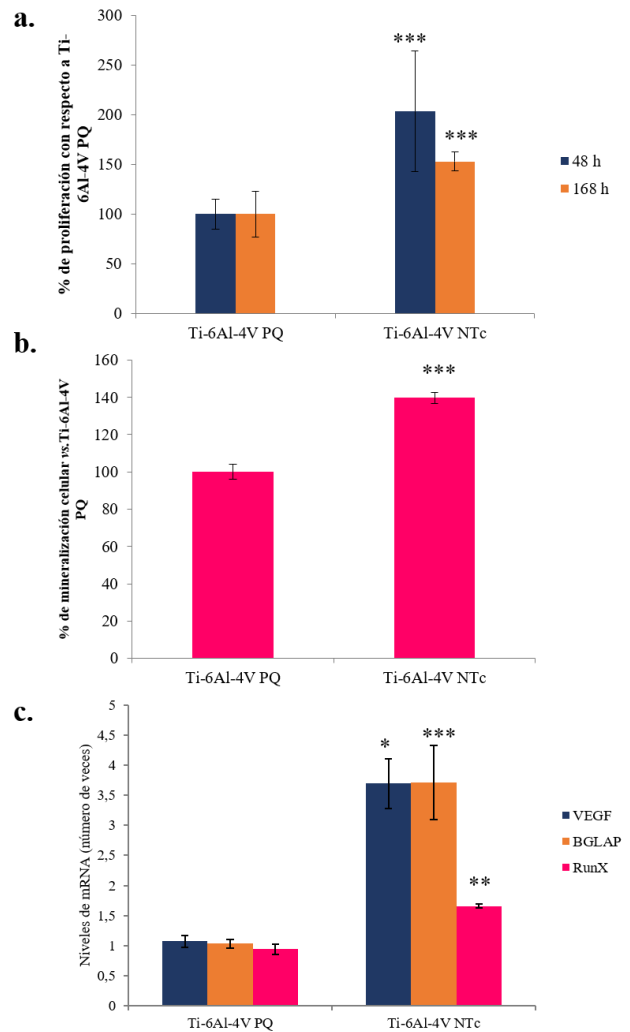


Figura 18. Proliferación de células MCT3T3-E1 a las 48 y a las 168 h (a); mineralización de la matriz ósea a las 120 h de cultivo (b); y expresión génica de los marcadores angiogénico (VEGF) y osteoblásticos (BGLAP y Runx2) a las 120 h (c), en presencia de Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc. Las barras representan la desviación estándar. *: $p < 0.05$ para el test *t*-Student entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc. **: $p < 0.01$ para el test *t*-Student entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc. ***: $p < 0.001$ para el test *t*-Student entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc.

a la incorporación de F y P en la aleación de Ti-6Al-4V.

Lozano y colaboradores [147] reportaron anteriormente que las capas nanoporosas dopadas con F de la aleación Ti-6Al-4V aumentó: la proliferación celular en un 42% y 33%, a las 48 y a las 168 h, respectivamente; la mineralización de la matriz celular en un 100%; y de la expresión de todos los marcadores osteoblásticos (60% para VEGF, 90% para BGLAP y 100% para

RunX2) comparados con muestras de Ti-6Al-4V PQ. En este trabajo, se reportó un aumento: en la proliferación celular en un 103% y un 56% a las 48 y a las 168 h, respectivamente; en la mineralización de la matriz celular en un 40%; y, en la expresión de marcadores osteoblásticos (2,7 veces para VEGF; 2,6 veces para BGLAP y 75% para RunX2) (Figura 18.c). Por lo tanto, parece que osteoestimulador se podría deber directamente a la incorporación de P y no a la forma de la nanoestructura.

5.2.2. Estudios *in vivo*

5.2.2.1. Estudios anatomopatológicos y microbiológicos

El uso de la aleación de Ti-6Al-4V NTc parece mejorar cualitativamente la osteointegración del implante en comparación con la aleación Ti-6Al-4V PQ.

La osteogénesis periprotésica del hueso del receptor del implante puede ser de dos tipos: a distancia y de contacto. La osteogénesis a distancia se refiere a la formación de trabéculas óseas periprotésicas que se desarrollan desde la cavidad del hueso hacia la prótesis. La osteogénesis de contacto, por su parte, se refiere a la formación de hueso nuevo desde la superficie de la prótesis hacia el hueso preexistente [215]. Esta osteogénesis fue observada en todas las muestras de los animales independientemente del material implantado y la presencia o ausencia de infección que, excepto en un animal con un implante de Ti-6Al-4V PQ, que no presentó osteointegración alguna. En aquellos animales con osteointegración, ya sea parcial o total, no se puede delimitar la capa de hueso nuevo formado por contacto y la capa de hueso nuevo formado a distancia. La fusión entre el hueso formado a distancia y el hueso formado por contacto, sugiere que la superficie del implante es reconocida favorablemente por las células osteogénicas como un andamio biomimético [216]. Por otra parte, la presencia de hueso no-laminar y laminar fue cualitativamente superior en Ti-6Al-4V NTc sin infección que en Ti-6Al-4V PQ sin infección (Tabla 3).

Se observaron tres tipos de respuesta ósea a los implantes (Figura 19): no-osteointegración (Figura 19.a), osteointegración parcial (Figura 19.b) y osteointegración completa (Figura 19.c). Solo un implante de Ti-6Al-4V PQ mostró ausencia total de osteointegración. Los resultados de osteointegración obtenidos para la presencia de más de cinco osteoblastos por 10 campos de gran aumento, la formación de hueso no-laminar y la formación de huso laminar no permitieron la realización de ningún tipo de inferencia estadística (Tabla 3).

Los resultados obtenidos por micro-TC (Figura 20) avalan esta osteointegración de las muestras de ambos materiales. Aunque es necesario aumentar el número de muestras analizadas, se intuye una mayor osteointegración alrededor de los implantes de Ti-6Al-4V NTc (Figura 20.b), respecto a los de Ti-6Al-4V PQ (Figura 20.a).

La membrana de interfase es un tejido fibroconectivo que suele envolver los materiales implantados dentro de tejidos esta misma naturaleza independientemente de su composición química. Su presencia fue descrita en todas las muestras analizadas en este estudio independientemente del material implantado y la presencia o ausencia de infección. De forma semejante a otros implantes en otros tejidos, su función es inmovilizar el implante actuando como un “parche de anclaje” del implante a los tejidos conectivos adyacentes [217]. El grosor mediano de esta membrana fue 3,7 veces mayor en el hueso periprotésico del material Ti-6Al-4V NTc respecto al Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,01$) independientemente de la presencia o ausencia de infección, lo que apunta que su grosor mediano dependería directamente de las características superficiales del material (nanotopografía y composición química). El grosor mediano de la membrana de interfase mostró diferencias estadísticas en función del tipo de osteointegración observada (Tabla 3). Cuando la osteointegración fue completa, la membrana de interfase que recubría los

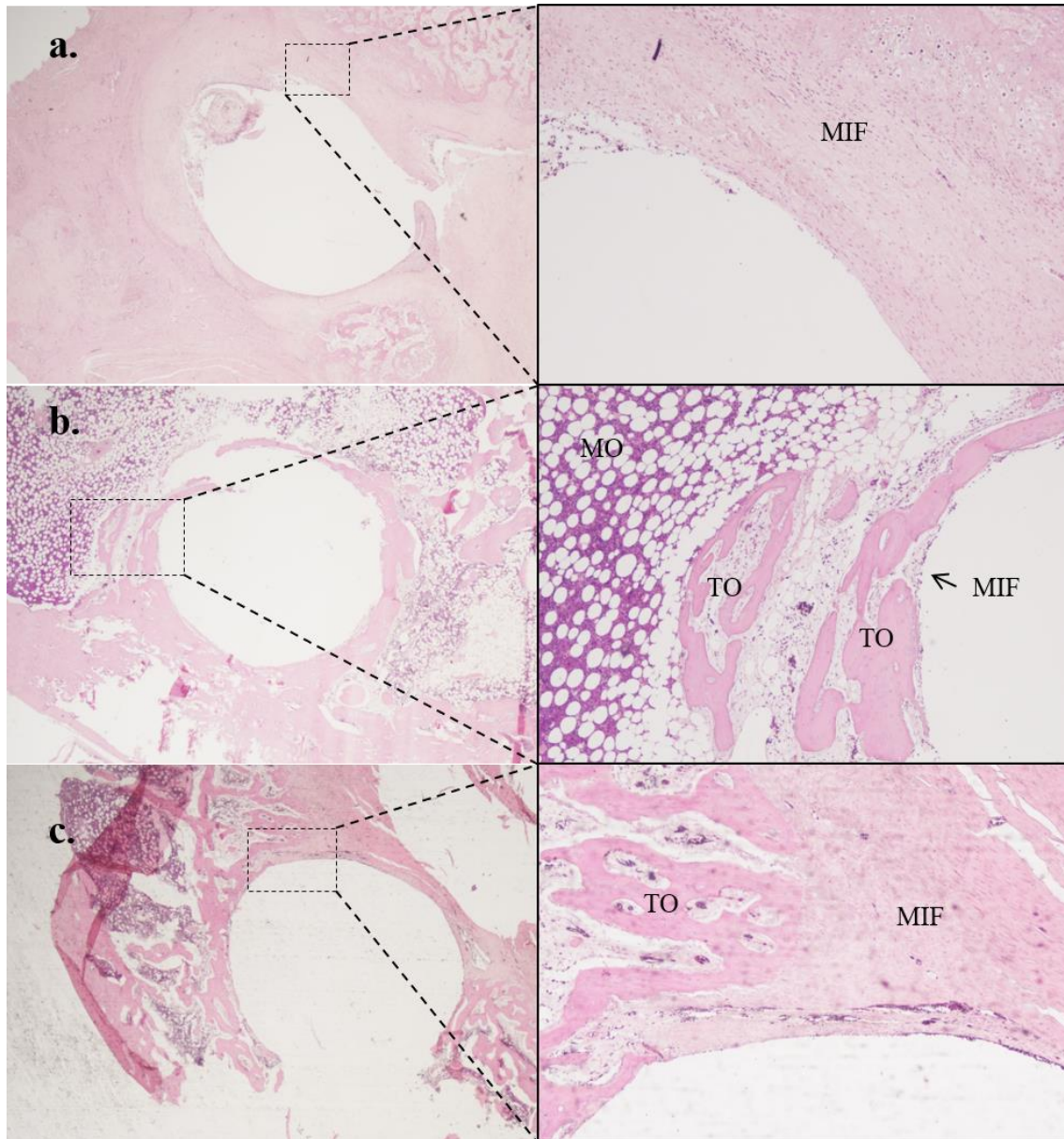


Figura 19. Tipos de osteointegración observada en el estudio anatomopatológico de las muestras de hueso periprotésico descalcificado y teñido con hematoxilina-eosina a 40 (columna izquierda) y 200 aumentos (columna derecha): ausencia de osteointegración (a), osteointegración parcial (b) y osteointegración completa. MIF: membrana de interfase. MO: médula ósea. TO: trabécula ósea.

implantes de Ti-6Al-4V NTC fue significativamente más gruesa que la que recubría los implantes de Ti-6Al-4V PQ ($p=0,0026$), mientras que no se detectaron diferencias significativas entre cada material con y sin infección ($p>0,05$). Cuando la osteointegración fue parcial, se analizaron por una parte los grosores medios de la zona con osteointegración completa y por otro lado los grosores medios de la zona con osteointegración parcial. La osteointegración completa mostró una distribución homogénea

independientemente del material implantado y de la presencia o ausencia de infección ($p=0,6536$ para el test de Kruskal-Wallis), al igual que la osteointegración parcial ($p=0,3074$ para el test de Kruskal-Wallis). El grosor de la membrana de interfase en las áreas de osteointegración completa en las muestras con osteointegración parcial fue significativamente igual al de aquellas muestras que solo presentaron osteointegración completa para cada uno de los grupos ($p>0,05$).

El hueso en contacto con la superficie de la prótesis sufre una remodelación morfológica que se inicia justo después de la intervención. Esta remodelación ósea del hueso maduro periprotésico en las prótesis osteointegradas se confirma por la presencia de espacios medulares que contienen osteoclastos, osteoblastos, células mesenquimales y vasos linfáticos/sanguíneos al lado de la superficie de la prótesis [215]. La proporción de muestras de hueso con remodelación ósea alrededor de los implantes de Ti-6Al-4V NTc (9/10) fue significativamente superior a la proporción remodelación ósea de los implantes de Ti-6Al-4V PQ (5/10) ($p=0,025$) (Tabla 3). La remodelación ósea entre ambos materiales cuando hubo infección fue significativamente idéntica ($p=1,000$). Esta remodelación ósea activa observada en los implantes sin infección, mediada por los osteoclastos y los osteoblastos que trabajan sincrónicamente refleja que, después de una osteointegración inicial de hueso esponjoso en torno al implante, dicho hueso se reabsorbe y se sustituye por hueso compacto gradualmente [218].

P. aeruginosa, tiene una propensión a adherirse a estructuras articulares fibrocartilaginosas y óseas, y se asocia con osteomielitis, artritis séptica y, con menos frecuencia, infección articular protésica [154]. El grosor mediano de la membrana de interfase hueso-implante no mostró diferencias significativas entre presencia o ausencia de infección, aunque la celularidad residente en ella si permitió diferenciar entre osteomielitis aguda y crónica en la mayoría de aquellos animales a los que se les indujo infección durante la intervención quirúrgica en ambos materiales (Tabla 3). La detección de osteomielitis aguda y crónica solo tuvo lugar en las muestras de aquellos animales en los que se indujo infección en una proporción elevada tanto de Ti-6Al-4V PQ (8/10 con osteomielitis aguda y 3/10 con osteomielitis crónica) y de Ti-6Al-4V NTc (7/10 con osteomielitis aguda y 2/10 con

Material	Tipo* (n)	Osteointegración			Osteomielitis			
		MIF (Q ₁ -Q ₃) (µm)	Osteoblastos*	Hueso no-laminar	Hueso laminar	Remodelación ósea	Aguda	Crónica
Ti-6Al-4V PQ	NO (1)	124,15						
	OP (1)	44,63-182,68	6	5	9	5	0	1
	OC (8)	26,1 (24,28-46)						
Ti-6Al-4V PQ + Pa11	OP (4)	382,1 (218,23-401,39)	9	10	10	7	8	3
	OC (6)	39,32 (33,19-64,67)						
Ti-6Al-4V NTc	OP (4)	260 (129,3-475,1)	10	10	10	9	0	0
	OC (6)	98,46 (65,72-125,37)						
Ti-6Al-4V NTc + Pa11	OP (3)	767,4 (330,1-829,29)	10	10	10	7	7	2
	OC (7)	65,57 (48,11-244,63)						

Tabla 3. Resultados de los estudios anatomopatológicos de las muestras de hueso crecido alrededor de los distintos implantes con y sin infección por *P.aeruginosa* (Pa11), descalcificado y teñidas con hematoxilina-eosina. *: NO: no-osteointegración. OP: osteointegración parcial. OC: osteointegración completa. †: >5 osteoblastos/ 10 campos de gran aumento.

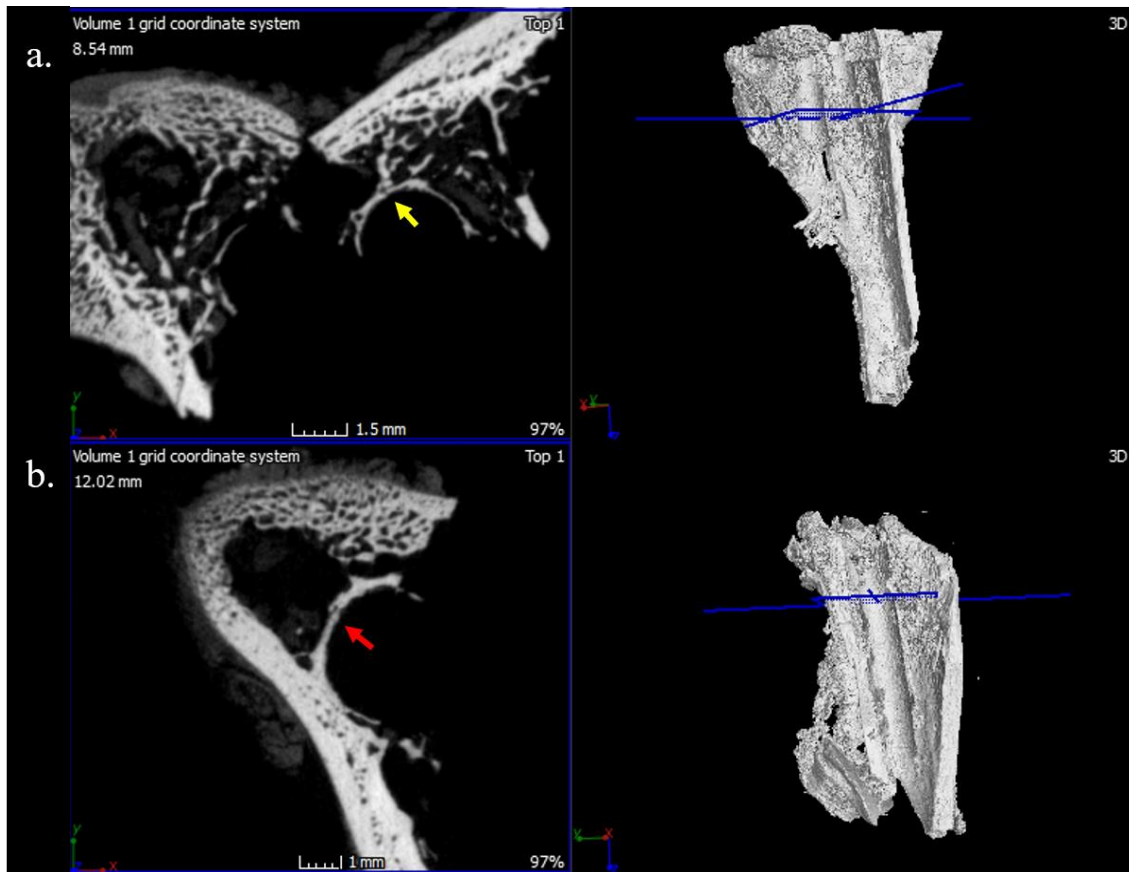


Figura 20. Hueso de nueva formación en torno al implante de Ti-6Al-4V PQ (a. flecha amarilla), en torno al implante de Ti-6Al-4V NTc (b. flecha roja) y sus respectivas representaciones tridimensionales de las muestras de fémur elaboradas por micro-TC.

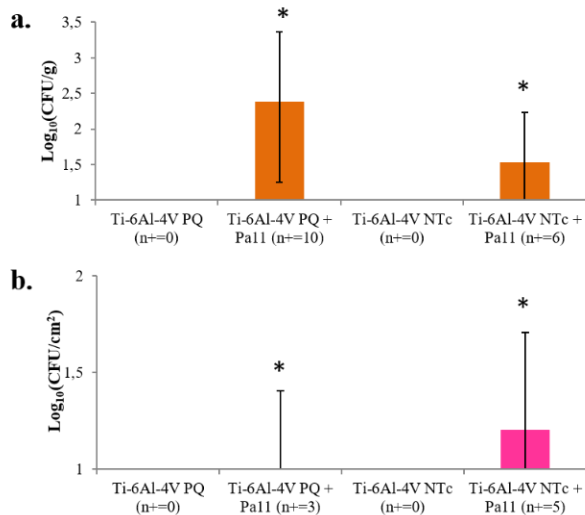


Figura 21. Concentración de bacterias (UFC) por gramo de hueso y anejos (a) en la diáfisis femoral proximal y por centímetro cuadrado en las prótesis (b) de cada grupo experimental. Las barras representan el rango intercuartílico. *: $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon entre los grupos con infección por *P. aeruginosa* (Pa11).

osteomielitis crónica). Las proporciones de ambos tipos de osteomielitis fueron significativamente iguales en ambos materiales cuando se indujo infección con esta bacteria ($p=0,303$). Por esta razón, el estudio histopatológico de este tejido es considerado la mejor muestra anatomopatológica para el diagnóstico de este tipo de infección [219].

Los resultados microbiológicos no mostraron ninguna diferencia significativa en la cantidad de bacteria aislada en hueso y anejos o en el implante infectados con uno u otro material ($p > 0,05$) (Figura 21). Sin embargo, curiosamente, se pudo observar una tendencia gráfica a aislar mayor cantidad de bacterias en el implante infectado de la aleación Ti-6Al-4V NTc que, en su hueso respectivo, si se compara con los implantes de Ti-6Al-4V PQ.

5.2.2.2. Monitorización los niveles de aluminio en la orina

La monitorización de los niveles totales de Al en la orina de los animales utilizados en el modelo *in vivo* con un solo implante a lo largo de los primeros 15 días postoperatorios permitió distinguir entre animales infectados por *P. aeruginosa* o no.

Es aceptado que las aleaciones de titanio, dentro de las que se incluye la aleación Ti-6Al-4V, son “inertes” en el interior del cuerpo humano [49]. Pero la realidad es que cualquier implante metálico en el cuerpo humano se degrada debido a al menos cuatro fenómenos fundamentales: la lixiviación, el desgaste, la corrosión [2, 220], así como del fenómeno resultante de la sinergia entre estos dos últimos [49], la tribocorrosión. La corrosión y el desgaste son los más estudiados en las aleaciones de uso médico.

El desgaste es la degradación de dos materiales que están en contacto en condiciones de movimiento relativo [49]. Por tanto, en una prótesis el desgaste se produce por la acción de otra superficie, ya sea entre los distintos componentes de una misma prótesis o por su interacción con el hueso.

La corrosión de los biomateriales metálicos es un proceso electroquímico complejo, multifactorial que depende de las características geométricas, metalúrgicas, mecánicas y químicas del implante [49] y está favorecido por el medio fisiológico: su pH (7,4 en humanos y 7,6 en conejos) y la temperatura corporal (36,5°C en humanos y 38-40°C en conejo) [221-223]. La corrosión se caracteriza por dos parámetros de naturaleza termodinámica y cinética. El parámetro termodinámico determina la tendencia de un material o de sus elementos a oxidarse, mientras que el parámetro cinético indica la velocidad a la que tiene lugar dicha reacción [221].

Las aleaciones de titanio están cubiertas de una capa de óxido de titanio termodinámicamente estable, continua, altamente adherente, protectora y autorregenerante. A pesar de su estabilidad

termodinámica, esta aleación es susceptible a cualquier tipo de ataque mecánico, químico o electroquímico que puede liberar elementos aleantes a través de un proceso de disolución pasiva [221]. Los estudios de corrosión de implantes de Ti-6Al-4V en pacientes pusieron de manifiesto que la detección de niveles elevados de titanio y niveles normales de Al y vanadio (respecto a un grupo control sin aflojamiento) en el suero o la orina de portadores de una prótesis de esta aleación, se relacionaba con la existencia de un aflojamiento aséptico [49, 222-224]. Otros estudios reportaron que la liberación de titanio, Al y vanadio con implantes de esta aleación en conejos puede tener lugar en ausencia de desgaste o aflojamiento [49, 225] o incluso solo con la implantación de material de osteosíntesis [226, 227]. Hasta la fecha, ningún estudio ha analizado la posible relación entre la liberación de iones de aleantes de la aleación Ti-6Al-4V en relación con la presencia o no de infección.

El aluminio (Al) es un aleante de la aleación Ti-6Al-4V, en la que representa el 6 (5,5-6,5) % de su composición química [49]. Su liberación ha sido reportada en distintos estudios realizados en pacientes con una prótesis de esta aleación [49, 222-224, 226, 227]. Su liberación, al igual que la del titanio, puede ser debida a lixiviación, a corrosión, desgaste o tribocorrosión. Los niveles de Al liberado en pacientes con este tipo de aleaciones son más elevados en aquellos tejidos inmediatamente cercanos la prótesis o el implante (en orden decreciente): la membrana de interfase, cápsula articular, líquido sinovial, orina y sangre [224, 228].

Cuando el pH es cercano a la neutralidad, el catión de Al^{3+} se convierte el hidróxido de Al, sin embargo, en un sistema vivo, esta formación de hidróxido es inhibida por la presencia de aniones complementarios y otros ligandos de la sangre [167]. Esto explicaría la discrepancia entre los niveles detectados *in vitro* (Figura 13) y los niveles detectados en la orina de los animales del modelo *in vivo* (Figura 22).

Dado que nuestro modelo experimental se basa en un implante intramedular en el fémur de cada animal, cuando el Al se libera del implante se incorporaría al hueso a través de tres mecanismos: intercambio heteroiónico con calcio, magnesio y fosfato en la superficie ósea, co-precipitación junto con el calcio y el fosfato durante la mineralización ósea, y acoplamiento con biomoléculas del tejido óseo no-mineralizado, como glicosaminoglicanos, glicoproteínas ácidas y proteínas ácidas de la matriz ósea como fosfoproteínas [167]. Una vez unido al hueso, el Al seguiría el ciclo de los metales pesados en el tejido óseo, de forma análoga al descrito para el plutonio [167]. La parte del Al retenida en la superficie ósea por intercambio heteroiónico o unión a las moléculas orgánicas es susceptible de pasar a la circulación sanguínea donde será captado por un componente sérico y otro celular. Dentro de los componentes séricos el Al se une a: la transferrina y la albúmina (91%), el citrato (7-8%), los hidroxilos libres (<1%) y el fosfato sérico (<1%). Otras proteínas involucradas en este transporte son la albúmina. Dentro del componente celular, el Al se puede unir a los macrófagos (residentes de la médula ósea y circulantes) y a los glóbulos rojos. La fracción de Al incorporada en la parte mineralizada del hueso será susceptible a ser movilizada por los osteoclastos durante la remodelación y absorción ósea [167]. Este Al movilizado puede ser excretado vía urinaria (principalmente) o depositado nuevamente por cualquiera de los anteriores mecanismos mencionados. Este mecanismo fisiológico justificaría la detección de este metal en la orina en todos los animales portadores de implante de la aleación Ti-6Al-4V. La liberación prolongada a lo largo del tiempo podría verse directamente mantenida por la porción del Al sanguíneo retenido en los eritrocitos [167].

Los niveles de Al detectados en los animales control (sin implante) monitorizados durante 28 días fueron estadísticamente normales y su valor promedio (\pm desviación estándar) fue de 23.13 ± 14.72 ng/mL. El origen de este Al en los conejos control solo puede proceder del agua y del alimento ingeridos [153, 229].

Los niveles medios de Al en la orina a lo largo del tiempo fueron muy similares entre los animales que tenían el mismo tipo de material implantado y visualmente menores en aquellos que tenían infección inducida por *P. aeruginosa* (Figura 22.a y 22.c). Los resultados obtenidos en la monitorización de los niveles de Al en orina (ng/mL) de los conejos intervenidos ponen de manifiesto que: los animales con implantes de Ti-6Al-4V mostraron niveles de Al más elevados en la orina que nos los animales no-intervenidos (controles) (Figura 22.a y 22.c área gris) y, además los animales con infección por *P. aeruginosa* muestran niveles más bajos que los animales sin infección. No se observó una tendencia clara de estos niveles a lo largo del tiempo en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, el modelo de regresión lineal de efectos mixtos aplicado a la concentración total de Al en la orina de cada animal en cada día mostró resultados cuasignificativos para los animales implantados con ambos materiales e infectados por *P. aeruginosa* ($p=0,089$ para Ti-6Al-4V PQ y $p=0,054$ para Ti-6Al-4V NTc) y claramente no-significativos entre los animales infectados entre y no infectados entre sí, con ambos materiales (Tabla 4).

Por otra parte, los tratamientos superficiales permiten crecer capas pasivas en ciertos biomateriales metálicos que reducen la velocidad de la reacción de oxidación, y por tanto, la corrosión del metal [221]. El tratamiento de anodizado, empleado en este trabajo, promueve el crecimiento de una capa de óxido amorfo sobre la superficie de la aleación que aumenta su estabilidad química y disminuye la corrosión y, con ello, los niveles de iones metálicos al medio fisiológico [224, 225]. No obstante, a pesar de ello, todavía es posible encontrar Al en la orina de los animales implantados con la aleación anodizada. Los resultados obtenidos *in vitro* revelaron que el origen de este Al no tendría su origen solo por causa de la corrosión, sino que también se deben la liberación del Al retenido en el interior de los

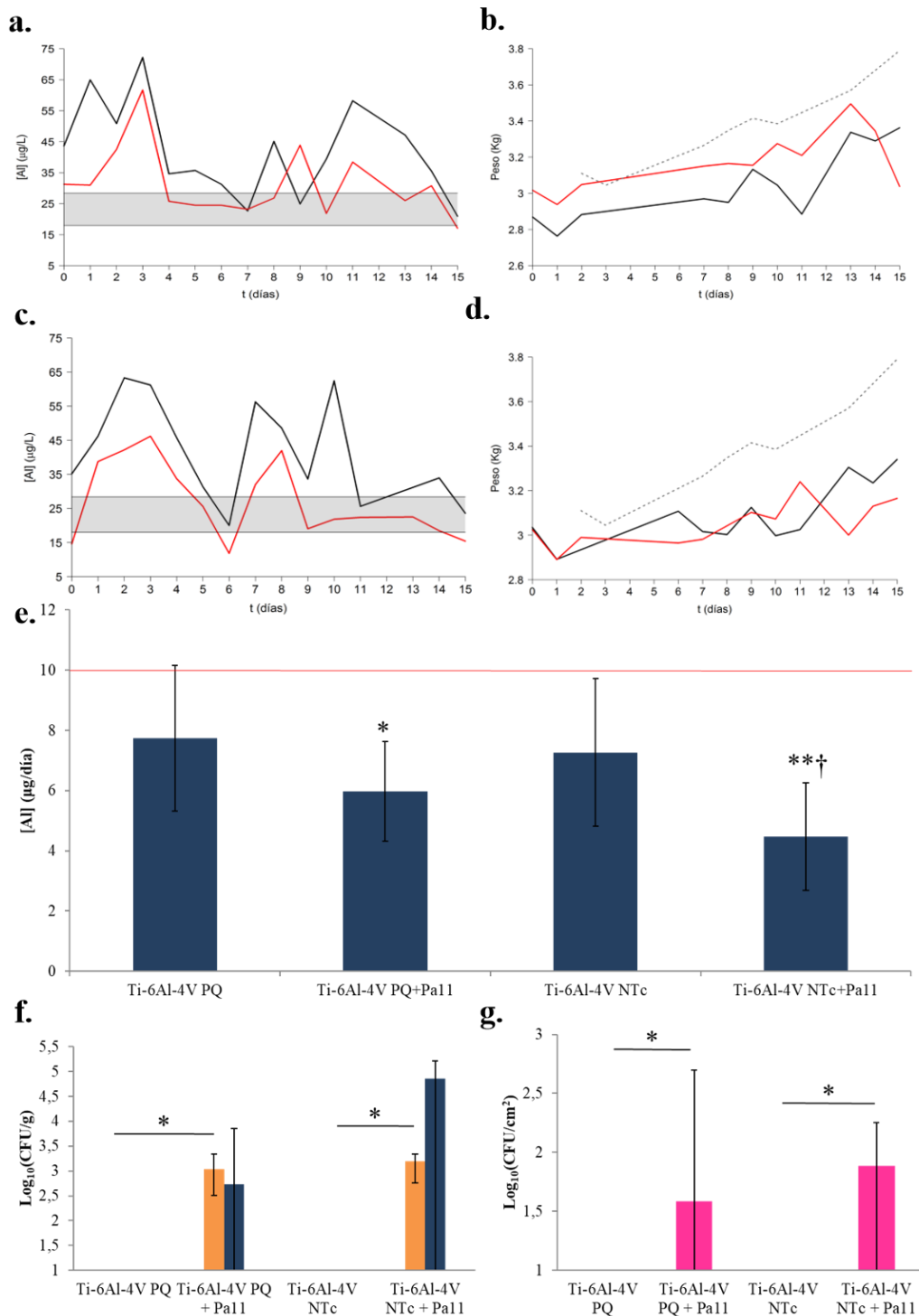


Figura 22. Modelo *in vivo* de la monitorización de los niveles de Al total en la orina de conejos con un solo implante con y sin infección provocada por *P. aeruginosa* (Pa11). Niveles promedio de Al en la orina y el peso en conejos con un solo implante de Ti-6Al-4V PQ (a-b) y Ti-6Al-4V NTc (c-d) a lo largo de los primeros 15 días postoperatorios. La línea negra representa los valores medios correspondientes a los animales sin infección. La línea roja representa los valores medios correspondientes a los animales con infección por Pa11. El área gris representa el intervalo de confianza del 95% para los niveles de Al en la orina de los animales control. La línea gris discontinua representa el peso medio de los animales del grupo control. Niveles medios del Al excretado por día en los animales con un implante de cada material (e). Las barras representan la desviación estándar. *: p<0,05 para el test *t*-Student entre los grupos de cada material con y sin infección. **: p<0,01 para el test *t*-Student entre los grupos de cada material con y sin infección. †: <0,05 para el test *t*-Student entre los grupos de cada material con y sin infección. La línea roja representa el valor por encima del cual se considerarían elevados los niveles de excreción de Al en la orina (según [229]). Concentración mediana de bacterias (UFC) por gramo de hueso y anejos (f) en la diáfisis femoral proximal (azul) y distal (naranja) y por centímetro cuadrado en las prótesis (g) de cada grupo experimental. Las barras representan el rango intercuartílico. *: p<0,05 para el test de Wilcoxon entre los grupos comparados. **: p<0,01 para el test de Wilcoxon entre los grupos comparados.

Comparación	Diferencia	Error	Inferior	Superior	p
Ti-6Al-4V PQ + Pa11 vs. Ti-6Al-4V PQ	-11,6	7,13	-31,4	8,16	0,089
Ti-6Al-4V NTc + Pa11 vs. Ti-6Al-4V NTc	-8,81	5,44	-19,6	1,98	0,054
Ti-6Al-4V NTc vs. Ti-6Al-4V PQ	-1,29	4,56	-13,9	11,4	0,396
Ti-6Al-4V NTc + Pa11 vs. Ti-6Al-4V PQ + Pa11	2,16	7,61	-17,4	21,7	0,394

Tabla 4. Resultados del modelo de regresión lineal de efectos mixtos para la concentración de Al en la orina de los animales con un solo implante de cada material.

	Coefficiente	Error	Inferior	Superior	p
Tiempo	0,030	0,005	0,020	0,041	<0,001
Ti-6Al-4V PQ + Pa11 vs. Ti-6Al-4V PQ	0,157	0,140	-0,233	0,547	0,163
Tiempo	0,026	0,005	0,016	0,036	<0,001
Ti-6Al-4V NTc + Pa11 vs. Ti-6Al-4V NTc	-0,104	0,121	-0,441	0,234	0,221
Tiempo	0,027	0,007	0,013	0,040	<0,001
Ti-6Al-4V NTc + Pa11 vs. Ti-6Al-4V PQ	-0,068	0,146	-0,473	0,338	0,334
Tiempo	0,029	0,003	0,023	0,035	<0,001
Ti-6Al-4V PQ + Pa11 vs. Ti-6Al-4V NTc	0,115	0,113	-0,198	0,428	0,183
Tiempo	0,030	0,005	0,020	0,040	<0,001
Ti-6Al-4V NTc vs. Ti-6Al-4V PQ	0,038	0,134	-0,334	0,411	0,395
Tiempo	0,026	0,006	0,015	0,037	<0,001
Ti-6Al-4V NTc + Pa11 vs. Ti-6Al-4V PQ + Pa11	-0,202	0,123	-0,542	0,138	0,088

Tabla 5. Resultados del modelo de regresión lineal de efectos mixtos para el peso de los conejos con un solo implante de cada material.

nanotubos en forma de botella tras el proceso de anodizado.

Además, se ha demostrado previamente que *P. aeruginosa* es capaz de captar *in vitro* una cantidad limitada de Al a través de una captación irreversible mediada por la pioquelina (apartado 5.2.1.1. *Estudios microbiológicos*). Los resultados obtenidos *in vivo* corroboran los resultados *in vitro* para el material Ti-6Al-4V NTc, pero además ponen de manifiesto que la diferencia entre infección o no-infección por esta bacteria es detectable *in vivo* también en Ti-6Al-4V PQ, material con características muy semejantes al material usado en Cirugía ortopédica. Así, los animales con implantes de Ti-6Al-4V PQ e infección mostraron niveles de Al más bajos durante los primeros siete días, y los animales con implantes de Ti-6Al-4V NTc e infección mostraron niveles más bajos durante al menos los primeros 15 días en comparación con sus respectivos sin infección.

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos aplicado al peso de los animales (Figura 22 b y 22.d) mostró que la ganancia de peso aumenta a lo largo del tiempo, sin que haya ninguna diferencia significativa entre los grupos experimentales analizados (Tabla 5). De ello, se deduce que la ganancia de peso no es significativamente distinta entre los distintos grupos experimentales a lo largo del tiempo, lo que permite asumir que el aluminio procedente de la dieta en los animales es el mismo en todos los grupos y que las variaciones en los niveles de Al se deben únicamente al liberado por el implante colocado en cada animal. Los valores normales de Al excretados en la orina suelen ser menores a 10 µg/día en personas, sin embargo, determinados laboratorios clínicos contemplan la detección de Al en orina como un parámetro normalmente elevado (entre 10 y 20 µg/día) en pacientes con una prótesis articular correctamente funcional y sin aflojamiento [230]. Cuando estos niveles superan los 50 µg/día, se consideran sugestivos de un desgaste acelerado de la

prótesis o de aflojamiento [230]. Las mediciones no presentaron una tendencia tiempo-dependiente (datos y contrastes no mostrados). Los niveles de excreción de Al excretados pusieron de manifiesto que estos niveles fueron inferiores a 10 µg/día y que los niveles de Al excretados fueron superiores en los animales sin infección para ambos materiales y significativamente menores en aquellos animales con una infección por *P. aeruginosa* ($p=0,0298$ para Ti-6Al-4V PQ y $p=0,0030$ para Ti-6Al-4V NTc) (Figura 22.e). No hubo diferencias significativas entre los valores de Al excretados por los conejos con implantes sin infección de Ti-6Al-4V PQ y los de Ti-6Al-4V NTc ($p=0,6556$), pero sí entre los animales con infección ($p=0,0263$), ya que los animales infectados con *P. aeruginosa* y con un implante de Ti-6Al-4V PQ presentaron niveles de excreción más elevados que los animales infectados con un implante de Ti-6Al-4V NTc.

La reacción a un cuerpo extraño derivada de la corrosión metálica y desgaste es conocido como metalosis y está asociada a necrosis y absorción del tejido circundante debido a la inflamación crónica, que da lugar a la aparición de tejido de granulación y la coloración marrón oscuro en los tejidos adyacente [231]. El hueso circundante a los implantes de ambos materiales en este procedimiento experimental no mostró signos de metalosis, ni macroscópicos ni microscópicos.

La única toxicidad del Al comprobada es la asociada a la inhalación de polvos industriales con una elevada concentración de óxido de Al en suspensión. Ante esta exposición, el Al es causa de fibrosis pulmonar, que cursa normalmente como una fibrosis intersticial de los lóbulos superiores [232]. Otros autores afirman que el Al podría ser causante de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson y Alzheimer [232]. Estos síntomas neurológicos aparecerían en personas con concentraciones urinarias iguales o superiores a 135 µg/L [233]. Por otra parte, los niveles elevados de Al se han asociado a distintas patologías, además de las neurológicas, en pacientes

renales crónicos con y sin diálisis renal, como enfermedades óseas (osteomalacia resistente a la vitamina D) y anemia [232, 234]. El hueso crecido en contacto con los implantes de ambos materiales, no presentó evidencias histológicas de osteomalacia.

El modelo de infección *in vivo* para la monitorización de la orina, presentó, además la aparición de focos de osteomielitis en la diáfisis proximal femoral, focos de mielitis en la diáfisis distal en dos de cada tres animales en los que se indujo infección por *P. aeruginosa* (Figura 22.f, barras naranjas, compare Figura 23.a-c con 23.d). A pesar de ello, no hubo diferencias significativas en la cantidad de bacteria aislada de la diáfisis proximal ($p=0,5127$), ni de la diáfisis distal ($p=0,3758$) entre los implantes de los distintos materiales infectados por *P. aeruginosa*. La cantidad de bacteria aislada sobre los implantes de cada material no fue significativamente diferente entre los dos materiales utilizados ($p=0,4867$). La explicación más plausible para explicar la aparición de mielitis en la diáfisis distal femoral es que al taladrar una oquedad mayor (4 cm) e inyectar un volumen mayor de inóculo bacteriana (200 µL), este inóculo se podría haberse desplazado al implantar el material desde la diáfisis femoral proximal.

Lastimosamente, este modelo experimental presenta limitaciones a la hora de extrapolar los resultados *in vivo* en conejos a humanos. La primera, la distinción entre presencia o ausencia de infección solo sería detectable cuando el microorganismo asociado a la IPA sea *P. aeruginosa*, y por extensión posiblemente otras bacterias no-fermentadoras y ciertas especies gramnegativas fermentadoras, basándonos en resultados preliminares *in vitro*, aunque serían necesarios más estudios para corroborar dichos resultados *in vivo*. En segundo lugar, la exposición al Al es mucho mayor y variable en nuestra especie que en los animales de experimentación utilizados (con factores que abarcan desde conductas de higiene y sociales, hasta demográficas y geográficas), por lo que habría que tener en

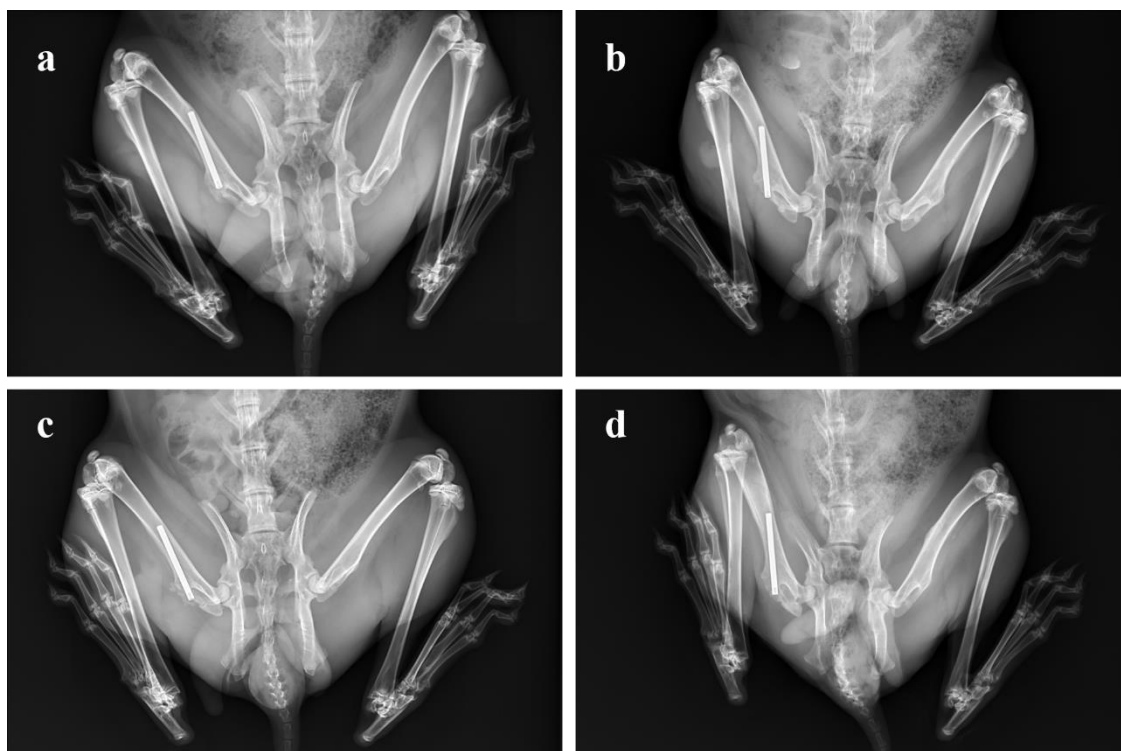


Figura 23. Radiografías dorsoventrales de los conejos con un implante de Ti-6Al-4V PQ (a-b) o de Ti-6Al-4V NTc (c-d) con (b, d) o sin infección (a, c) por *P. aeruginosa* para la monitorización de los niveles de Al total en la orina.

cuenta esta exposición antes de usar esta monitorización.

5.3. Evaluación *in vitro* de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina

5.3.1. Liberación de los antibióticos desde la aleación Ti-6Al-4V con nanotubos con forma de botella o cónicos dopados con F y P

La liberación de estos dos antibióticos (Gm y Vm) se mantuvo durante mucho más tiempo cuando se cargan en el interior de las nanoestructuras de la aleación Ti-6Al-4V NTc, en comparación que cuando es cargada en Ti-6Al-4V NT.

La Figura 24.a muestra las curvas obtenidas para la liberación de Gm y Vm de la capa Ti-6Al-4V NTc *in vitro* por RP-HPLC aplicando el modelo no-lineal Boltzmann. Los coeficientes de regresión (R^2) fueron 0,96694 y 0,9023 para Gm y Vm, respectivamente. Los valores máximos de liberación se obtuvieron a los 240 min para ambos antibióticos. Los resultados

obtenidos por el método del ftaldialdehído para la Gm y por el método biológico para la Vm se muestran en la Figura 24.b.

La liberación de los antibióticos cargados en las muestras de Ti-6Al-4V NTc (modelo no-lineal de Boltzmann) fue diferente a la de Ti-6Al-4V NT (modelo no-lineal de primer orden) y se estabilizó a los 240 min para ambos antibióticos, tiempo superior que los alcanzados por las muestras de Ti-6Al-4V NT cargados con Gm (120 min) y con Vm (180 min). Esto se debe a un mecanismo típico de difusión de Fick, tal y como se mencionó y discutió anteriormente (apartado 5.1. *Estudio de la liberación y la capacidad bactericida de los nanotubos dopados con F de la aleación de Ti-6Al-4V y cargados con gentamicina, vancomicina y/o la mezcla de ambos antibióticos*). De forma semejante, a partir de estos tiempos, se detectó una degradación de ambos antibióticos por RP-HPLC. A pesar de la degradación de los antibióticos, el método del ftaldialdehído para la Gm y el método biológico para la Vm demostró que los productos de esta degradación antibiótica continúan activos a lo largo del tiempo (Figura 24.b).

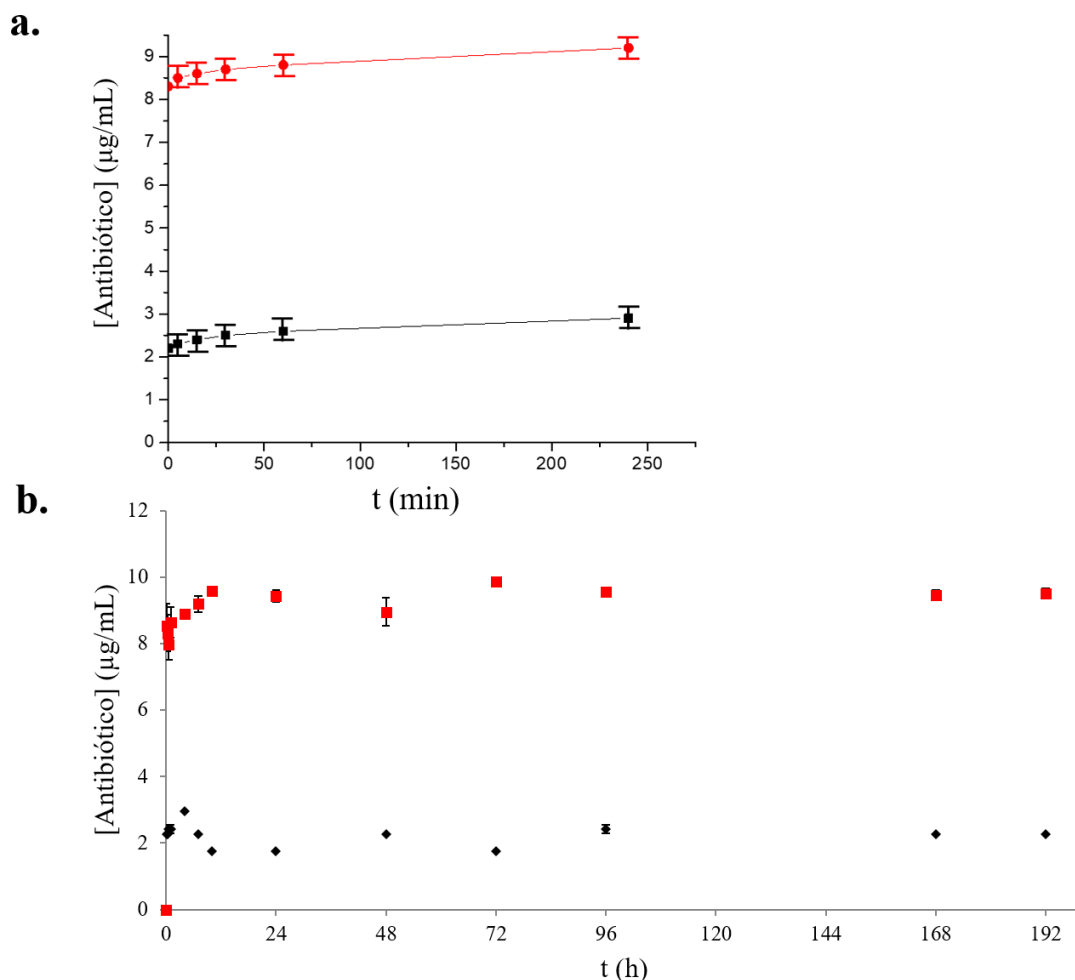


Figura 24. Curvas de liberación de Gm (rojo) y Vm (negro) cargados en Ti-6Al-4V NTc determinados por RP-HPLC (a). Concentración de Gm determinada por el método del ftaldialdehído (puntos rojos) y de Vm determinada por el método biológico (puntos negros) a lo largo de 192 h (b). Las barras representan la desviación estándar de cada medida puntual.

5.3.2. Estudios celulares de las capas anódicas con nanotubos con forma de botella o cónicos dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina y/o vancomicina

La carga de la mezcla Gm y Vm (Gm+Vm) en el interior de las nanoestructuras de la aleación Ti-6Al-4V NTc no alteró las cualidades osteoestimulantes del material anteriormente descritas.

La proliferación celular de células osteoblásticas MC3T3-E1 aumentó significativamente en Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm en comparación con Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,0001$). Por lo tanto, el porcentaje medio de proliferación celular en Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm en comparación con Ti-6Al-4V PQ

(normalizado al 100%) fue 128 y 168% a las 48 y 168 h, respectivamente (Figura 25.a).

La mineralización de matriz aumentó significativamente en Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm en comparación con Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,0001$), por lo que el porcentaje medio de mineralización celular en las muestras de Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm en comparación con Ti-6Al-4V PQ (normalizado a 100%) era aproximadamente 152% a los 10 días de cultivo (Figura 25.b).

Por último, las muestras de Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm aumentaron significativamente la expresión génica de todos estos marcadores probados en células MC3T3-E1 a las 120 h: VEGF y BGLAP triplicaron su expresión ($p = 0,0016$ y $p < 0,0001$, respectivamente),

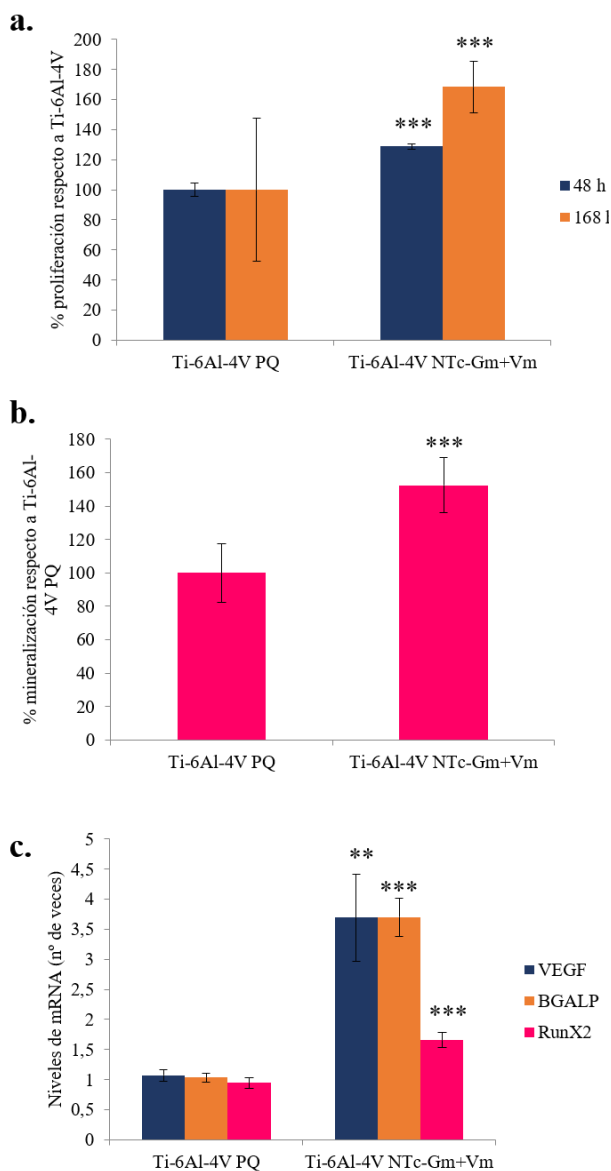


Figura 25. Proliferaci3n de c3lulas MCT3T3-E1 a 48 y 168 h (a); mineralizaci3n de la matriz a las 120 h de cultivo (b); y expresi3n g3nica de marcadores angiog3nico (VEGF) y osteobl3sticos (BGLAP y Runx2) a las 120 h (c), en presencia de Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc. Las barras representan la desviaci3n est3ndar. *: $p < 0,05$ para el test *t*-Student entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm. **: $p < 0,01$ para el test *t*-Student entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm. ***: $p < 0,001$ para el test *t*-Student entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm.

mientras que RunX aument3 un 65% su expresi3n en Ti-6Al-4V NTc ($p < 0,0001$) (Figura 25.c), en comparaci3n con Ti-6Al-4V PQ.

Curiosamente, la proliferaci3n celular de c3lulas osteobl3sticas MC3T3-E1 aument3 significativamente en Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm en comparaci3n con Ti-6Al-4V PQ

($p < 0,0001$). Cabe destacar, que en sobre el material Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm la proliferaci3n celular fue tiempo-dependiente (fue mayor a las 168 h que a las 48 h), al contrario que sobre el material Ti-6Al-4V NTc sin antibi3ticos (Figura 18.a y Figura 25.a). De la misma forma, la mineralizaci3n de la matriz 3sea fue ligeramente superior en Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm a los 10 d3as de cultivo. Por su parte, la expresi3n de genes en ambos materiales fue muy similar entre Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm y en Ti-6Al-4V NTc para VEGF y BGLAP triplicaron su expresi3n, pero ligeramente inferior para RunX que solo aument3 un 65% en Ti-6Al-4V NTc-Gm+Vm y casi duplic3 su expresi3n en Ti-6Al-4V NTc.

Aleaci3n Ti-13Nb-13Zr

5.4. Estudio de la posible capacidad bactericida de la aleaci3n Ti-13Nb-13Zr en comparaci3n con la aleaci3n Ti-6Al-4V

Ning3n material puede evitar completamente la adherencia bacteriana y la colonizaci3n de la superficie [169]. En este apartado, la mayor3a de las cepas estafiloc3cicas (cinco de ocho) y todas las cepas de *P. aeruginosa* mostraron una adherencia significativamente mayor en la aleaci3n Ti-13Nb-13Zr MP respecto a Ti-6Al-4V PQ. Por el contrario, todas las cepas de *E. coli* (excepto Ec1) mostraron una adherencia significativamente menor en la aleaci3n Ti-13Nb-13Zr MP. Adem3s, la aleaci3n Ti-13Nb-13Zr MP mostr3 una capacidad bactericida *in vitro* frente a gramnegativos debido a la formaci3n de radicales libres hidroxilo generados a partir de la ionizaci3n de la circonia presente en su superficie.

En general, los porcentajes de bacterias adheridas fueron bajos (inferiores al 12%) (Figura 26 y 27). Cinco de las ocho cepas estafiloc3cicas ensayadas se adhirieron m3s a la aleaci3n Ti-13Nb-13Zr MP que a la aleaci3n Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,05$). Tres cepas restantes (P1, P33 y P55) fueron cepas cl3nicas (Figura 26.a y 26.c).

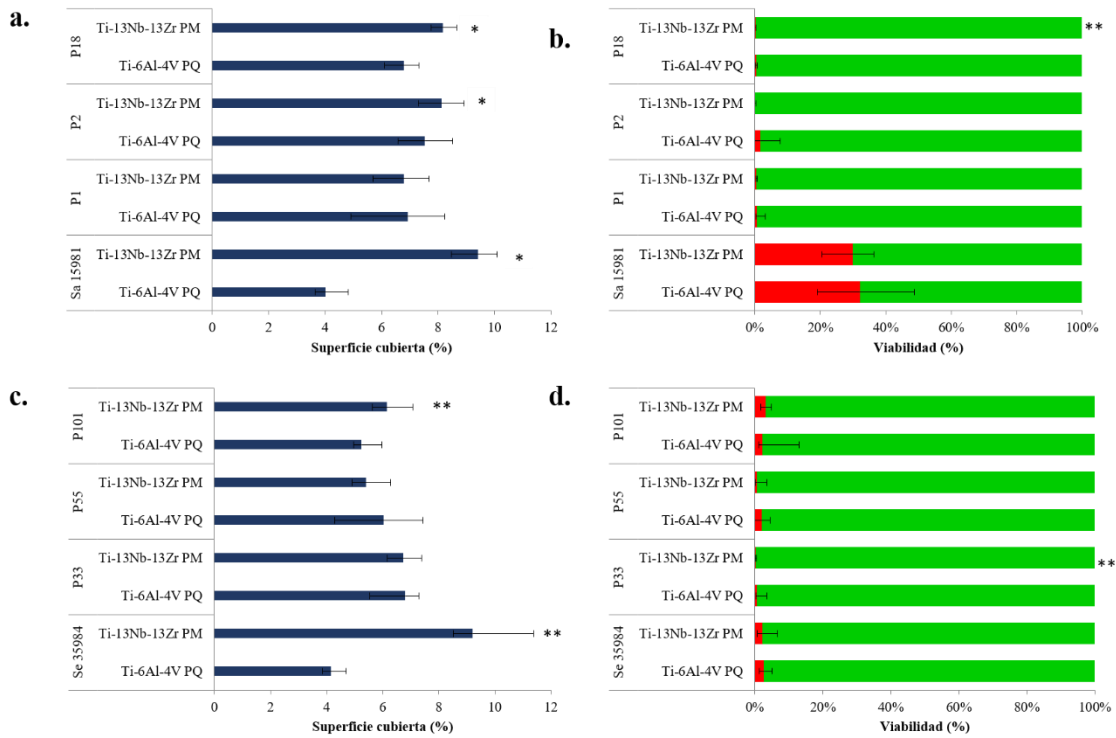


Figura 26. Porcentajes de superficie cubierta, vivas (verde) y muertas (rojo) de las bacterias grampositivas: *S. aureus* (a-b) y *S. epidermidis* (c-d). Las barras representan el intervalo intercuartílico. *: $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-13Nb-13Zr MP. **: $p < 0,01$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-13Nb-13Zr MP.

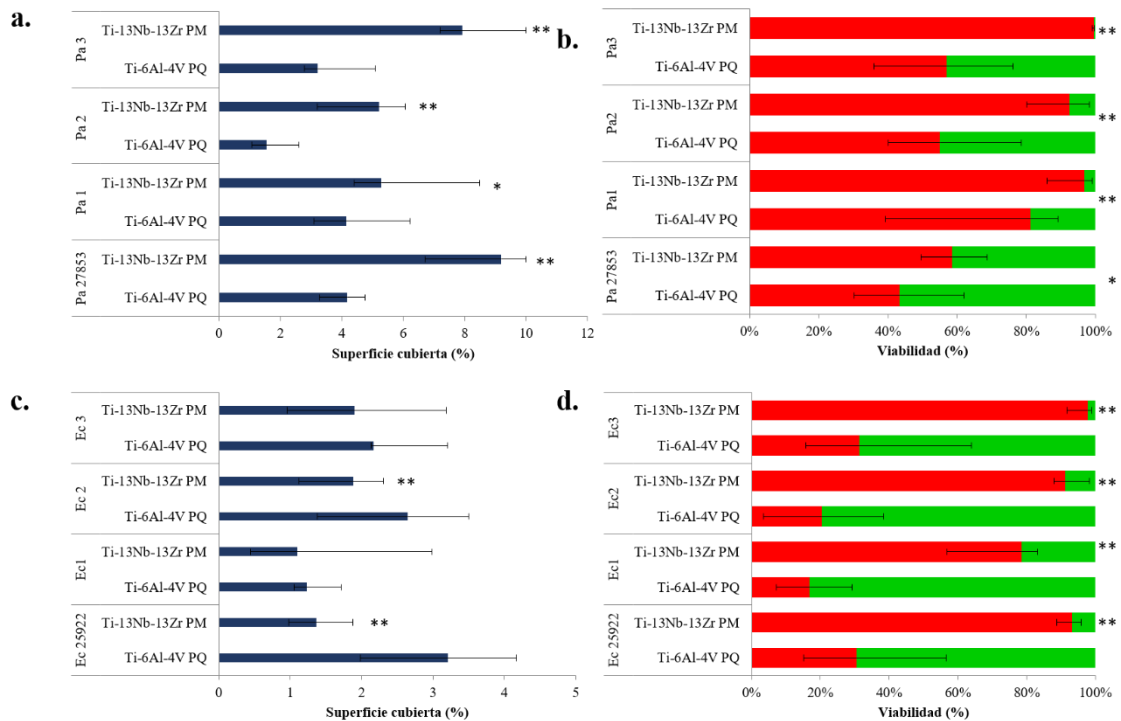


Figura 27. Porcentajes de superficie cubierta, vivas (verde) y muertas (rojo) de las bacterias gramnegativas: *P. aeruginosa* (a-b) y *E. coli* (c-d). Las barras representan el intervalo intercuartílico. *: $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-13Nb-13Zr MP. **: $p < 0,01$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-13Nb-13Zr MP.

La rugosidad es una característica de los materiales relacionada con un aumento de la adherencia bacteriana [235, 236]. Una superficie más rugosa tiene mayor área superficial y los valles o depresiones pueden proporcionar sitios más propensos a la colonización bacteriana [237]. La adherencia de todas las cepas de *P. aeruginosa* fue significativamente mayor en la aleación Ti-13Nb-13Zr MP que en la aleación Ti-6Al-4V PQ ($p < 0,01$) (Figura 27.a), aproximadamente dos veces. A diferencia de las cepas de *E. coli*, que presentaron una disminución significativa ($p < 0,05$), excepto a la cepa Ec1 ($p = 0,2488$) (Figura 27. c). Este aumento de la adherencia bacteriana detectada en la aleación Ti-13Nb-13Zr MP fue debido a una mayor rugosidad, ya que la rugosidad de las muestras Ti-13Nb-13Zr MP era 1,8 veces mayor que la aleación de Ti-6Al-4V PQ. Esto se confirmó con los resultados obtenidos para la adherencia bacteriana de *S. epidermidis* ATCC 35984 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en la aleación Ti-6Al-4V MP (Figura 28) y son consistentes con Lee y colaboradores [238], quienes encontraron diferencias significativas en la adherencia bacteriana cuando la rugosidad de la superficie era inferior a 200 nm y con otros autores que señalaron que la adherencia bacteriana varía incluso a rangos de rugosidad menores a 30 nm [237, 239, 240]. Esta diferencia no fue detectada en tres de las seis cepas clínicas estafilocócicas.

Además del aumento de adherencia bacteriana en Ti-13Nb-13Zr MP, también se observó que el porcentaje de bacterias gramnegativas adheridas muertas fue significativamente mayor en la aleación Ti-13Nb-13Zr MP en comparación con la aleación Ti-6Al-4V PQ (Figura 27.b y 27.d).

En la superficie Ti-13Nb-13Zr, se encuentran los óxidos de cada aleante (titanio, niobio y circonio) y óxidos complejos formados por estos elementos [241]. La circonia (ZrO_2) carece de citotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad y genotoxicidad [242]. También, se ha demostrado que las

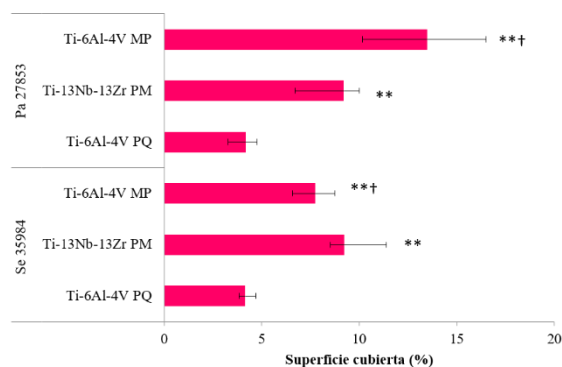


Figura 28. Porcentaje de superficie cubierta por *S. epidermidis* ATCC 35984 (Se 35984) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Pa 27853) sobre las distintas aleaciones y acabados superficiales. Las barras representan el intervalo intercuartílico. **: $p < 0,01$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-13Nb-13Zr MP. †: $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-6Al-4V MP.

nanopartículas de ZrO_2 son tóxicas para diferentes tipos de microorganismos [169, 243-246], principalmente bacterias gramnegativas como *E. coli* [244, 245], *Aeromonas hydrophila* y *P. putida* [243], pero también bacterias grampositivas como *S. aureus* [244-246] y *B. subtilis* [246]. El mecanismo antibacteriano de ZrO_2 parece estar mediado por una de las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS): el radical libre hidroxilo ($OH\cdot$). La formación de $OH\cdot$ sería el resultado de la ionización de la ZrO_2 a ZrO_2^- [244]. Varias ROS intracelulares pueden ser neutralizados por compuestos como el glutatión [247] o ser eliminados por enzimas, como superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas cuando se tratan de ROS como el anión superóxido (O_2^{2-}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [248], sin embargo, no se conoce una enzima capaz de desactivar el $OH\cdot$, si se produce en el exterior de la bacteria. Las dianas biológicas para las ROS son: lípidos, proteínas, RNA y DNA [249].

Los lípidos son las principales dianas del estrés oxidativo exógeno [250]. Las ROS atacan directamente a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas e inician la peroxidación de lípidos [151]. La peroxidación lipídica disminuye la fluidez de las membranas y altera las propiedades de

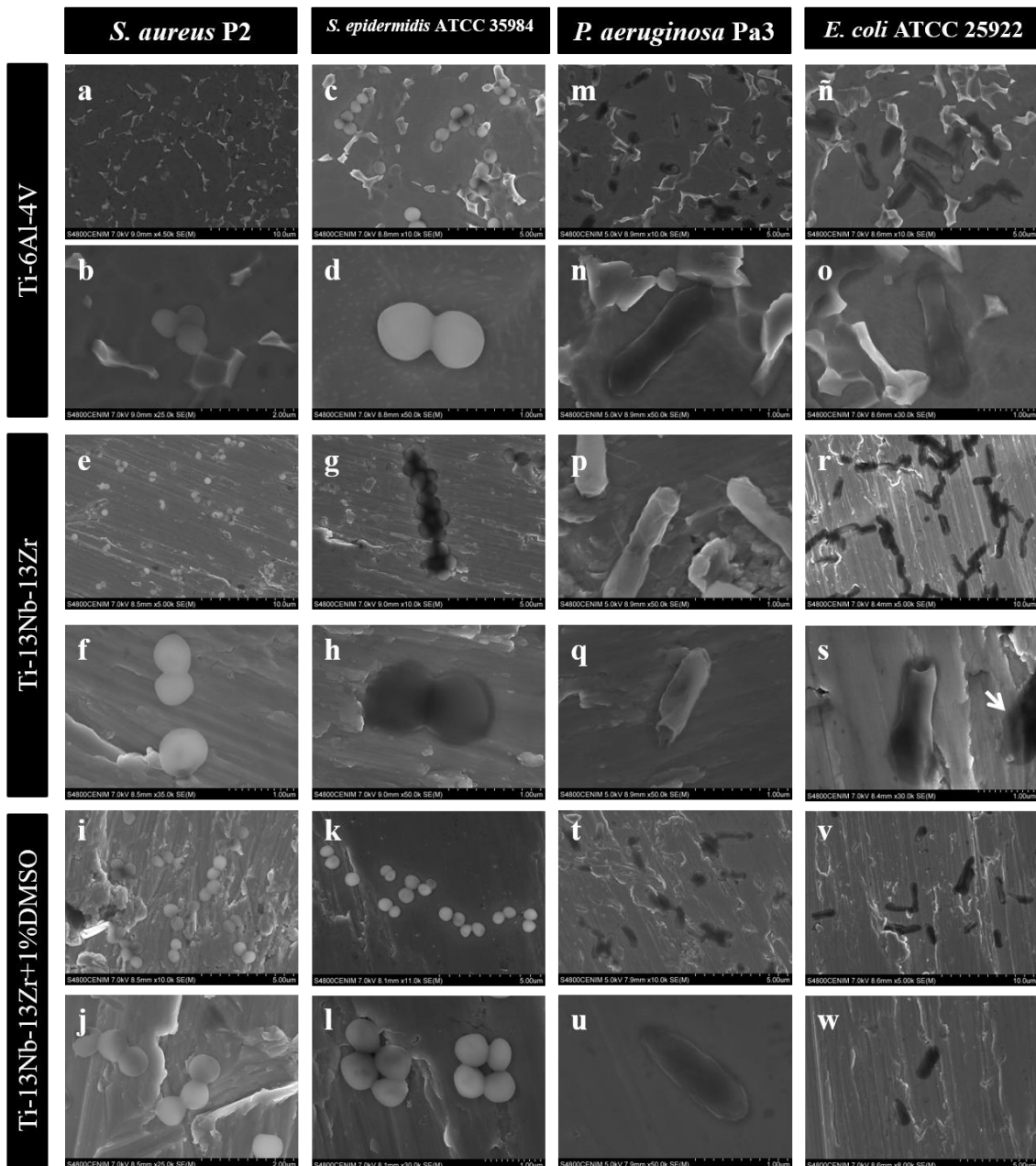


Figura 29. Micrografías de *S. aureus* P2 (a-b, e-f, i-j), *S. epidermidis* ATCC 35984 (c-d, g-h, k-l), cepa clínica de *P. aeruginosa* Pa3 (m-n, p-q, t-u) y *E. coli* ATCC 25922 (ñ-o, r-s, v-w) adheridas sobre Ti-6Al-4V PQ (a-d, m-o), sobre Ti-13Nb-13Zr PM (e-h, p-s), y sobre Ti-13Nb-13Zr PM+1% DMSO (i-l, t-w).

las mismas y de las proteínas unidas a ellas. Este efecto actúa como un amplificador de la generación de otras ROS, ya que algunas de estas otras ROS son generadas a partir de este proceso de lipoperoxidación [42].

La tinción utilizada (kit Live/Dead Bactlight®) en este trabajo permite detectar este daño de membranas en todas las especies analizadas [143]. Esta tinción y el análisis de las fotografías utilizando el *software* ImageJ proporcionan información sobre la morfología de la superficie y la

adherencia bacteriana, lo que resulta interesante para el diseño racional de las superficies biomédicas que controlen o inhiban la adherencia, la viabilidad bacterianas y la formación de *biofilm* [36, 102]. Además, este tipo de análisis es comparable a otros métodos destructivos para la estimación de las unidades formadoras de colonias adheridas por centímetro cuadrado [102, 251, 252].

Las cepas grampositivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*) no mostraron ningún cambio

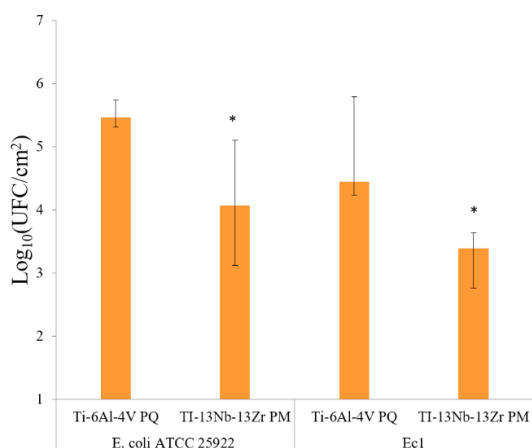


Figura 30. Unidades formadoras de colonia (UFC) por centímetro cuadrado en *E. coli* ATCC 25922 y una de sus cepas clínicas (Ec1). Las barras representan el intervalo intercuartílico. *: $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon entre Ti-6Al-4V PQ y Ti-13Nb-13Zr PM.

significativo en su viabilidad sobre la aleación Ti-13Nb-13Zr MP en comparación con la aleación Ti-6Al-4V PQ (Figura 26.b y 26.d). La mayoría de las cepas de estafilococos formadoras de biopelículas producen EPS, incluyendo adhesinas intercelulares de polisacáridos, que tienen un papel protector contra las sustancias tóxicas y compuestos producidos por el sistema inmune innato humano [37, 41, 253], incluyendo las ROS. Esta producción de EPS sobre la aleación Ti-13Nb-13Zr PM se observó en *S. epidermidis* ATCC 35984 (Figura 29.g-h) pero no en *S. aureus* P2 (Figura 29.e-f) comparando su aspecto sobre Ti-6Al-4V PQ (Figura 29.a-d y 29.i-l). Esto podría ser debido a la respuesta específica frente a las ROS en *S. epidermidis* mediada por el factor de transcripción AbfR que aumenta la viabilidad bacteriana y la formación de *biofilm* [254] y el efecto protector frente a ROS del pigmento dorado de *S. aureus* o estafiloxantina que la protegería del OH• sin necesidad de estimular la producción de EPS [255].

De acuerdo con los resultados obtenidos, la aleación Ti-13Nb-13Zr PM muestra un efecto bactericida sobre bacterias gramnegativas que disminuye *in vitro* la viabilidad de las bacterias adheridas de entre 26 y 99% de cepas *P. aeruginosa* (entre 82 y 99% de las cepas clínicas de *P. aeruginosa*)

(Figura 27.b) y entre 74 y 97% de las cepas de *E. coli* (Figura 27.d). Esta disminución de la viabilidad de *E. coli* fue corroborada por la estimación de las bacterias adheridas por unidad de área (Figura 30), ya que $\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$ disminuyó de 5,46 y 4,45, en la aleación Ti-6Al-4V PQ, a 4,07 y 3,39 en la aleación Ti-13Nb-13Zr PM para *E. coli* ATCC 25922 y Ec1, respectivamente. Esta capacidad bactericida sobre las bacterias gramnegativas adheridas parece estar causada por los OH• producidos a partir de la ionización de la ZrO_2 presente en la aleación Ti-13Nb-13Zr PM. Esta afirmación está sustentada en tres evidencias: (1) la capacidad bactericida del Ti-13Nb-13Zr PM aleación fue neutralizada utilizando DMSO (Figura 28), el principal OH• captador [151]; (2) la presencia de OH• fue detectada cualitativamente por RP-HPLC, que detectó un 60% de degradación de 4CBA en la aleación Ti-13Nb-13Zr PM respecto a la presente sobre Ti-6Al-4V PQ, lo que sólo puede atribuirse a la presencia de OH• [152, 256]; y (3) el daño de la membrana observado en la cepa clínica Pa3 de *P. aeruginosa* y *E. coli* ATCC 25922 de las bacterias adheridas sobre la aleación Ti-13Nb-13Zr PM (Figura 29.p-s), que señalaría a la lipoperoxidación como el principal responsable del efecto bactericida de esta aleación. Por lo tanto, este trabajo es el primero que explica el mecanismo bactericida *in vitro* de la aleación Ti-13Nb-13Zr, una potencial alternativa a la Ti-6Al-4V en el diseño de implantes protésicos.

Los pili tipo IV de *P. aeruginosa* desempeñan un papel clave en la adherencia bacteriana sobre superficies abióticas y bióticas [166, 257] como, por ejemplo: el aceros inoxidable [166, 257], y como se puede observar en la Figura 29.p, también intervienen en la adherencia de *P. aeruginosa* a la aleación Ti-13Nb-13Zr PM (Figura 29.p). Después de la adherencia, los pili de tipo IV deberían retraerse despolimerizándose por su base [42], pero como es apreciable en las micrografías de SEM, los bacilos no los retraen porque han perdido su viabilidad debido al efecto

bactericida de los OH•. Estos apéndices no fueron detectables ni sobre Ti-6Al-4V PQ ni sobre Ti-13Nb-13Zr MP+1%DMSO (Figuras 29.m-n y 29.t-u). Además de por el efecto de la rugosidad, el aumento de la adherencia bacteriana sobre Ti-13Nb-13Zr PM podría ser también promovido por la lisis y la liberación de material intracelular bacteriano al medio [258] (Figura 29.q).

La disminución de la adherencia de *E. coli* sobre la aleación Ti-13Nb-13Zr PM en comparación con la aleación Ti-6Al-4V PQ se debería a la lisis que esta especie exhibe en respuesta a la presencia de los OH• [249, 250] (Figura 29.r-s). Esta lisis podría justificar las marcas de EPS observadas sólo en la aleación Ti-13Nb-13Zr PM (flecha de la Figura 29.q), ya que los restos de membrana de las bacterias adheridas muertas se desprenderían a lo largo del protocolo de tinción y sólo dejarían esas improntas de EPS.

La síntesis de EPS mejora la adherencia [259], facilita la transición de la adherencia reversible a irreversible [259] y se incrementa durante la etapa de maduración [42] del *biofilm*. Por lo tanto, la síntesis de EPS es un buen indicador de la viabilidad bacteriana [260, 261]. Estos EPS tienen un

efecto protector contra los OH• en *P. aeruginosa* [243]. En este sentido, los EPS fueron más apreciables en la cepa clínica Pa3 de *P. aeruginosa* adherida sobre la aleación Ti-6Al-4V PQ y sobre Ti-13Nb-13Zr PM+DMSO al 1% que sobre Ti-13Nb-13Zr PM (Figura 29.m-n y 29.t-u). Por el contrario, la producción de EPS de *E. coli* ATCC 25922 fue muy similar en ambas aleaciones (Figure 29.ñ-o, 29.r-s, 29.v-w), esto se debe a que los EPS favorecerían la adherencia de *E. coli* [262, 263] sobre ambas aleaciones, pero no la protegerían del efecto bactericida de los OH• generados sobre Ti-13Nb-13Zr PM [264].

Por desgracia, este hallazgo tiene al menos dos limitaciones: (1) el efecto bactericida *in vitro* de OH• podría verse completamente neutralizado *in vivo* debido a la presencia de moléculas capaces de captar o neutralizar los OH• originados por la aleación Ti-13Nb-13Zr como, por ejemplo: el ácido ascórbico (vitamina C), el ácido úrico, la bilirrubina, la albúmina, el glutatión, el γ -tocoferol (vitamina E) o el ubiquinol de las lipoproteínas de la sangre [265]; y (2) evidentemente, se requieren más estudios para confirmar estos resultados, como por ejemplo estudios *in vivo*.

6. Conclusiones

1. El método de inmersión es un método sencillo de carga de antibiótico en nanoestructuras creadas sobre aleaciones de uso clínico, que añade a las propiedades de las capas de óxido nanotubular dopadas con F de la aleación Ti-6Al-4V (biocompatibilidad y osteointegración) la capacidad bactericida a nivel local gracias a la incorporación de antibióticos que pueden personalizarse en función de cada caso. La mezcla de gentamicina y vancomicina en el interior de los nanotubos dotó a las capas anódicas nanotubulares de una capacidad bactericida de amplio espectro, frente a bacterias grampositivas y gramnegativas.

2. La interacción entre las bacterias y los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V fue compleja. La adherencia de cuatro especies bacterianas disminuyó (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *S. maltophilia*), y mientras que *P. aeruginosa* mostró una adhesión ligeramente superior sobre los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V. El aluminio liberado desde el interior de la nanoestructura de la aleación Ti-6Al-4V dopada con F y P puede ser quelado por los sideróforos bacterianos, y este complejo sideróforo:aluminio únicamente es retenido por las bacterias gramnegativas.

3. *P. aeruginosa* presentó la capacidad de movilizar una parte del aluminio de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V.

4. Los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V mostraron un efecto osteoestimulador *in vitro* que se tradujo en un aumento significativo en la proliferación celular, la mineralización de la matriz ósea y la expresión génica relacionada con la diferenciación celular ósea.

5. Los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V cargados con gentamicina o vancomicina mostraron un tiempo de liberación máxima superior para ambos antibióticos.

6. La carga de la mezcla de gentamicina y vancomicina en los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V no alteró *in vitro* las propiedades osteoestimuladoras sobre las células MC3T3-E1.

7. Los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V presentaron *in vivo* una osteointegración igual o superior cualitativamente que el Ti-6Al-4V pulido químicamente y *P. aeruginosa* mostró una infectividad semejante a la hora de desarrollar una infección sobre ambos materiales *in vivo*.

8. La monitorización de los niveles del aluminio total en la orina en el modelo *in vivo* usando conejos con un solo implante permitió determinar la presencia o ausencia de infección.

producida por *P. aeruginosa* en implantes de Ti-6Al-4V, al menos durante los primeros siete días después de la operación en el caso de la aleación Ti-6Al-4V pulida químicamente y durante los primeros 15 días en el caso de los nanotubos con forma de botella dopados con F y P de la aleación Ti-6Al-4V.

9. La adherencia bacteriana en la aleación Ti-13Nb-13Zr pulida mecánicamente aumentó en la mayoría de las cepas bacterianas (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*) en comparación con la aleación Ti-6Al-4V pulida químicamente debido a la diferencia de rugosidad.

10. El porcentaje de las bacterias gramnegativas adheridas muertas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) se incrementó significativamente en la aleación Ti-13Nb-13Zr pulida mecánicamente debido al efecto bactericida del radical libre hidroxilo resultante de la ionización del ZrO_2 a ZrO_2^- .

Referencias bibliográficas

1. Long, M. and H.J. Rack, *Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective*. Biomaterials, 1998. **19**(18): p. 1621-39.
2. Wolford, L.M., *Factors to consider in joint prosthesis systems*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2006. **19**(3): p. 232-8.
3. Hawker, G.A., et al., *Which patients are most likely to benefit from total joint arthroplasty?* Arthritis Rheum, 2013. **65**(5): p. 1243-52.
4. Wilcock, G.K., *Benefits of total hip replacement to older patients and the community*. Br Med J, 1978. **2**(6129): p. 37-9.
5. Trampuz, A. and W. Zimmerli, *Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment*. Swiss Med Wkly, 2005. **135**(17-18): p. 243-51.
6. MacInnes, S.J.G., A.; Wilkinson, M., *Risk Factors for Aseptic Loosening Following Total Hip Arthroplasty*. Vol. Recent Advances in Arthroplasty. 2012: InTech.
7. Abu-Amer, Y., I. Darwech, and J.C. Clohisy, *Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**: p. S6.
8. Ariza, J., G. Euba, and O. Murillo, *[Orthopedic device-related infections]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2008. **26**(6): p. 380-90.
9. Jover-Saenz, A., et al., *[Risk factors for total prosthetic joint infection. Case-control study]*. Med Clin (Barc), 2007. **128**(13): p. 493-4.
10. Kurtz, S.M., et al., *Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States*. J Arthroplasty, 2012. **27**(8 Suppl): p. 61-5 e1.
11. Tande, A.J. and R. Patel, *Prosthetic joint infection*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(2): p. 302-45.
12. Dale, H., et al., *Increasing risk of prosthetic joint infection after total hip arthroplasty*. Acta Orthop, 2012. **83**(5): p. 449-58.
13. Barberán, J., *Entrevista al Dr. José Barberán López*. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia: Infección y Vacunas, 2013. **2**(9): p. 14-16.
14. Cobo, J., *Infecciones sobre prótesis articulares: diagnóstico y tratamiento*. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia: Infección y Vacunas, 2013. **2**(9): p. 26-31.
15. Levy, D.M., N.G. Wetters, and B.R. Levine, *Prevention of Periprosthetic Joint Infections of the Hip and Knee*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2016. **45**(5): p. E299-307.
16. Kahl, B.C., K. Becker, and B. Loffler, *Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections*. Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(2): p. 401-27.
17. Benito, N., et al., *Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(8): p. 732 e1-8.
18. Peel, T., et al., *Management of Prosthetic Infection According to*

- Organism, in *Arthroplasty - Update*, P. Kinov, Editor. 2013, InTech: Rijeka. p. Ch. 23.
19. Cobo, J., et al., *Early prosthetic joint infection: outcomes with debridement and implant retention followed by antibiotic therapy*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(11): p. 1632-7.
 20. Han, Z., et al., *Mycoplasma pneumoniae periprosthetic joint infection identified by 16S ribosomal RNA gene amplification and sequencing: a case report*. J Bone Joint Surg Am, 2011. **93**(18): p. e103.
 21. Sneller, M., et al., *Prosthetic joint infection with Mycoplasma hominis*. J Infect Dis, 1986. **153**(1): p. 174-5.
 22. Thoendel, M., et al., *A Novel Prosthetic Joint Infection Pathogen, Mycoplasma salivarium, Identified by Metagenomic Shotgun Sequencing*. Clin Infect Dis, 2017. **65**(2): p. 332-335.
 23. Portillo, M., *Update on Infections Associated with Orthopaedic Implants: Diagnosis and Management (oral communication)*. ESCMID Postgraduate Education Course Pamplona, 2017.
 24. Romano, C.L., et al., *A case of a late and atypical knee prosthetic infection by no-biofilm producer Pasteurella multocida strain identified by pyrosequencing*. Pol J Microbiol, 2013. **62**(4): p. 435-8.
 25. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 711-45.
 26. Diggle, S.P., *Microbial communication and virulence: lessons from evolutionary theory*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 12): p. 3503-12.
 27. Nadell, C.D., J.B. Xavier, and K.R. Foster, *The sociobiology of biofilms*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(1): p. 206-24.
 28. West, S.A., et al., *Social evolution theory for microorganisms*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(8): p. 597-607.
 29. Monroe, D., *Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms*. PLoS Biol, 2007. **5**(11): p. e307.
 30. Flemming, H.C., et al., *Biofilms: an emergent form of bacterial life*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(9): p. 563-75.
 31. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 95-108.
 32. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 881-90.
 33. Hoiby, N., et al., *The clinical impact of bacterial biofilms*. Int J Oral Sci, 2011. **3**(2): p. 55-65.
 34. Kostakioti, M., M. Hadjifrangiskou, and S.J. Hultgren, *Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(4): p. a010306.
 35. McConoughey, S.J., et al., *Biofilms in periprosthetic orthopedic infections*. Future Microbiol, 2014. **9**(8): p. 987-1007.
 36. Ribeiro, M., F.J. Monteiro, and M.P. Ferraz, *Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions*. Biomatter, 2012. **2**(4): p. 176-94.
 37. Otto, M., *Staphylococcal biofilms*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **322**: p. 207-28.
 38. Otto, M., *Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(8): p. 555-67.
 39. Zobell, C.E. and E.C. Allen, *The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces*. J Bacteriol, 1935. **29**(3): p. 239-51.
 40. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(9): p. 623-33.
 41. Buttner, H., D. Mack, and H. Rohde, *Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions*. Front Cell Infect Microbiol, 2015. **5**: p. 14.
 42. Laverty, G., S.P. Gorman, and B.F. Gilmore, *Biomolecular Mechanisms*

- of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. Pathogens, 2014. **3**(3): p. 596-632.
43. Harrison, J.J., H. Ceri, and R.J. Turner, *Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(12): p. 928-38.
 44. Arciola, C.R., et al., *Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials*. Biomaterials, 2012. **33**(26): p. 5967-82.
 45. Whiteley, M., et al., *Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 860-4.
 46. Hancock, R.E., *A brief on bacterial biofilms*. Nat Genet, 2001. **29**(4): p. 360.
 47. Stewart, P.S. and M.J. Franklin, *Physiological heterogeneity in biofilms*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(3): p. 199-210.
 48. Bjarnsholt, T., et al., *The in vivo biofilm*. Trends Microbiol, 2013. **21**(9): p. 466-74.
 49. Jacobs, J.J., J.L. Gilbert, and R.M. Urban, *Corrosion of metal orthopaedic implants*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(2): p. 268-82.
 50. Garcia-Gareta, E., et al., *Biofilm formation in total hip arthroplasty: prevention and treatment*. RSC Advances, 2016. **6**(83): p. 80244-80261.
 51. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. Ochsner, *Prosthetic-joint infections*. N Engl J Med, 2004. **351**(16): p. 1645-54.
 52. Kaplan, S.S., R.P. Heine, and R.L. Simmons, *Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection*. Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1640-5.
 53. Zimmerli, W., et al., *Comparative superoxide-generating system of granulocytes from blood and peritoneal exudates*. Infect Immun, 1984. **46**(3): p. 625-30.
 54. Bingham, J., et al., *The alpha defensin-1 biomarker assay can be used to evaluate the potentially infected total joint arthroplasty*. Clin Orthop Relat Res, 2014. **472**(12): p. 4006-9.
 55. Deirmengian, C., et al., *The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infection Responds to a Wide Spectrum of Organisms*. Clin Orthop Relat Res, 2015. **473**(7): p. 2229-35.
 56. Del Pozo, J.L. and R. Patel, *Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints*. N Engl J Med, 2009. **361**(8): p. 787-94.
 57. Ariza, J., et al., *Executive summary of management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC)*. Enferm Infec Microbiol Clin, 2017. **35**(3): p. 189-195.
 58. Atkins, B.L., et al., *Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(10): p. 2932-9.
 59. Esteban, J., et al., *Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(2): p. 488-92.
 60. Esteban, J., et al., *Conventional and molecular diagnostic strategies for prosthetic joint infections*. Expert Rev Mol Diagn, 2014. **14**(1): p. 83-96.
 61. Prieto-Borja, L., et al., *Evaluation of a commercial multiplex PCR (Unyvero i60(R)) designed for the diagnosis of bone and joint infections using prosthetic-joint sonication*. Enferm Infec Microbiol Clin, 2017. **35**(4): p. 236-242.
 62. Osmon, D.R., et al., *Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(1): p. e1-e25.
 63. Verberne, S.J., P.G. Raijmakers, and O.P. Temmerman, *The Accuracy of*

- Imaging Techniques in the Assessment of Periprosthetic Hip Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis.* J Bone Joint Surg Am, 2016. **98**(19): p. 1638-1645.
64. Ordonez, A.A., et al., *A Systematic Approach for Developing Bacteria-Specific Imaging Tracers.* J Nucl Med, 2017. **58**(1): p. 144-150.
 65. Zimmerli, W., *Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection.* J Intern Med, 2014. **276**(2): p. 111-9.
 66. Moran, E., I. Byren, and B.L. Atkins, *The diagnosis and management of prosthetic joint infections.* J Antimicrob Chemother, 2010. **65 Suppl 3**: p. iii45-54.
 67. Esteban, J. and J. Cordero-Ampuero, *Treatment of prosthetic osteoarticular infections.* Expert Opin Pharmacother, 2011. **12**(6): p. 899-912.
 68. Schoof, B., et al., *Fungal periprosthetic joint infection of the hip: a systematic review.* Orthop Rev (Pavia), 2015. **7**(1): p. 5748.
 69. Moran, E., et al., *Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: The microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention.* J Infect, 2007. **55**(1): p. 1-7.
 70. Sousa, R., et al., *Empirical antibiotic therapy in prosthetic joint infections.* Acta Orthop Belg, 2010. **76**(2): p. 254-9.
 71. Darouiche, R.O., *Treatment of infections associated with surgical implants.* N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1422-9.
 72. Jiranek, W.A., et al., *Surgical Treatment of Prosthetic Joint Infections of the Hip and Knee: Changing Paradigms?* J Arthroplasty, 2015. **30**(6): p. 912-8.
 73. Prendki, V., et al., *Outcome of patients over 80 years of age on prolonged suppressive antibiotic therapy for at least 6 months for prosthetic joint infection.* Int J Infect Dis, 2014. **29**: p. 184-9.
 74. Siqueira, M.B., et al., *Chronic Suppression of Periprosthetic Joint Infections with Oral Antibiotics Increases Infection-Free Survivorship.* J Bone Joint Surg Am, 2015. **97**(15): p. 1220-32.
 75. Jansen, E., et al., *Prevention of deep infection in joint replacement surgery.* Acta Orthop, 2010. **81**(6): p. 660-6.
 76. AlBuhairan, B., D. Hind, and A. Hutchinson, *Antibiotic prophylaxis for wound infections in total joint arthroplasty: a systematic review.* J Bone Joint Surg Br, 2008. **90**(7): p. 915-9.
 77. Geetha, M., et al., *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review.* Progress in Materials Science, 2009. **54**(3): p. 397-425.
 78. Niinomi, M., *Low Modulus Titanium Alloys for Inhibiting Bone Atrophy,* in *Biomaterials Science and Engineering*, R. Pignatello, Editor. 2011, InTech: Rijeka. p. Ch. 12.
 79. Saini, M., et al., *Implant biomaterials: A comprehensive review.* World J Clin Cases, 2015. **3**(1): p. 52-7.
 80. Malekani, J.S., B.; Gu, Y. T.; Schuetz, M.; Yarlagaadda, P. K. , *Orthopedic bone plates : evolution in structure implementation technique and biomaterial.* GSTF Journal of Engineering Technology (JET), 2012. **1**(1): p. 135-140.
 81. Navarro, M., et al., *Biomaterials in orthopaedics.* J R Soc Interface, 2008. **5**(27): p. 1137-58.
 82. Wang, W. and C.K. Poh, *Titanium Alloys in Orthopaedics,* in *Titanium Alloys - Advances in Properties Control*, J. Sieniawski and W. Ziaja, Editors. 2013, InTech: Rijeka. p. Ch. 01.
 83. Gallo, J., M. Holinka, and C.S. Moucha, *Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants.* Int J Mol Sci, 2014. **15**(8): p. 13849-80.
 84. Gallo, J., et al., *Silver Nanocoating Technology in the Prevention of Prosthetic Joint Infection.* Materials (Basel), 2016. **9**(5).
 85. Zhang, H., et al., *Improved antibacterial activity and*

- biocompatibility on vancomycin-loaded TiO₂ nanotubes: in vivo and in vitro studies.* Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 4379-89.
86. Branemark, P.I. and U. Breine, *Formation of Bone Marrow in Isolated Segment of Rib Periosteum in Rabbit and Dog.* Blut, 1964. **10**: p. 236-52.
 87. Cardoso, M.V., et al., *Titanium implant functionalization with phosphate-containing polymers may favour in vivo osseointegration.* J Clin Periodontol, 2017. **44**(9): p. 950-960.
 88. Park, J.W., *Osseointegration of two different phosphate ion-containing titanium oxide surfaces in rabbit cancellous bone.* Clin Oral Implants Res, 2013. **24 Suppl A100**: p. 145-51.
 89. Gristina, A.G., et al., *Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci.* Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(6): p. 813-6.
 90. Bernthal, N.M., et al., *A mouse model of post-arthroplasty Staphylococcus aureus joint infection to evaluate in vivo the efficacy of antimicrobial implant coatings.* PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12580.
 91. Neoh, K.G. and E.T. Kang, *Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications.* ACS Appl Mater Interfaces, 2011. **3**(8): p. 2808-19.
 92. Stahelova, A., et al., *Variation in the IL1B, TNF and IL6 genes and individual susceptibility to prosthetic joint infection.* BMC Immunol, 2012. **13**: p. 25.
 93. Follmann, H.D., et al., *Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of TMC/heparin complexes.* Biomacromolecules, 2012. **13**(11): p. 3711-22.
 94. Yuan, W., et al., *A facile method to construct hybrid multilayered films as a strong and multifunctional antibacterial coating.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. **85**(2): p. 556-63.
 95. An, Y.H., et al., *Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro.* J Orthop Res, 1996. **14**(5): p. 846-9.
 96. Muszanska, A.K., et al., *Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and RGD peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration.* Biomacromolecules, 2014. **15**(6): p. 2019-26.
 97. Braem, A., et al., *Staphylococcal biofilm growth on smooth and porous titanium coatings for biomedical applications.* J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(1): p. 215-24.
 98. Ivanova, E.P., et al., *Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention.* Langmuir, 2010. **26**(3): p. 1973-82.
 99. Kao, W.K., et al., *Surface charge modification decreases Pseudomonas aeruginosa adherence in vitro and bacterial persistence in an in vivo implant model.* Laryngoscope, 2017. **127**(7): p. 1655-1661.
 100. Koseki, H., et al., *Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e107588.
 101. Shida, T., et al., *Adherence ability of Staphylococcus epidermidis on prosthetic biomaterials: an in vitro study.* Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 3955-61.
 102. Singh, A.V., et al., *Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25029.
 103. Truong, V.K., et al., *The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium.* Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3674-83.

104. Drago, L., et al., *Does implant coating with antibacterial-loaded hydrogel reduce bacterial colonization and biofilm formation in vitro?* Clin Orthop Relat Res, 2014. **472**(11): p. 3311-23.
105. Ludecke, C., et al., *Nanorough titanium surfaces reduce adhesion of Escherichia coli and Staphylococcus aureus via nano adhesion points.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2016. **145**: p. 617-625.
106. Miao, X., et al., *The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study.* Int J Nanomedicine, 2017. **12**: p. 1415-1430.
107. Pandit, V., et al., *Evaluation of multifunctional polysaccharide hydrogels with varying stiffness for bone tissue engineering.* Tissue Eng Part A, 2013. **19**(21-22): p. 2452-63.
108. Stolzoff, M., et al., *Decreased bacterial growth on titanium nanoscale topographies created by ion beam assisted evaporation.* Int J Nanomedicine, 2017. **12**: p. 1161-1169.
109. Zan, X., et al., *Covalently attached, silver-doped poly(vinyl alcohol) hydrogel films on poly(L-lactic acid).* Biomacromolecules, 2010. **11**(4): p. 1082-8.
110. Zhao, C., et al., *Dual functionality of antimicrobial and antifouling of poly(N-hydroxyethylacrylamide)/salicylate hydrogels.* Langmuir, 2013. **29**(5): p. 1517-24.
111. Arenas, M.A., et al., *Doped TiO₂ anodic layers of enhanced antibacterial properties.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2013. **105**: p. 106-12.
112. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces.* Biomaterials, 2013. **34**(34): p. 8533-54.
113. Perez-Jorge, C., et al., *In vitro assessment of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti-6Al-4V alloy.* J Biomed Mater Res A, 2012. **100**(7): p. 1696-705.
114. Popat, K.C., et al., *Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants?* Small, 2007. **3**(11): p. 1878-81.
115. Wojcieszak, D., et al., *Influence of Cu, Au and Ag on structural and surface properties of bioactive coatings based on titanium.* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **71**: p. 1115-1121.
116. Holinka, J., et al., *Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth.* Bone Joint J, 2013. **95-B**(5): p. 678-82.
117. Zhao, L., et al., *Antibacterial coatings on titanium implants.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **91**(1): p. 470-80.
118. DeJong, E.S., et al., *Antimicrobial efficacy of external fixator pins coated with a lipid stabilized hydroxyapatite/chlorhexidine complex to prevent pin tract infection in a goat model.* J Trauma, 2001. **50**(6): p. 1008-14.
119. Tan, H., et al., *Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(1): p. 1854-69.
120. Huang, Q., et al., *Comparison of the effects of human beta-defensin 3, vancomycin, and clindamycin on Staphylococcus aureus biofilm formation.* Orthopedics, 2012. **35**(1): p. e53-60.
121. Schindler, C.A. and V.T. Schuhardt, *Lysostaphin: A New Bacteriolytic Agent for the Staphylococcus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 414-21.
122. Wu, J.A., et al., *Lysostaphin disrupts Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms on artificial surfaces.*

- Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(11): p. 3407-14.
123. Ahire, J.J. and L.M. Dicks, *Antimicrobial Hyaluronic Acid-Cefoxitin Sodium Thin Films Produced by Electrospraying*. Curr Microbiol, 2016. **73**(2): p. 236-41.
 124. Makinen, T.J., et al., *Efficacy of bioabsorbable antibiotic containing bone screw in the prevention of biomaterial-related infection due to Staphylococcus aureus*. Bone, 2005. **36**(2): p. 292-9.
 125. Yao, C. and T.J. Webster, *Prolonged antibiotic delivery from anodized nanotubular titanium using a co-precipitation drug loading method*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **91**(2): p. 587-95.
 126. Feng, W., et al., *Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **62**: p. 105-12.
 127. Gulati, K., M.S. Aw, and D. Losic, *Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection*. Nanoscale Res Lett, 2011. **6**: p. 571.
 128. Lin, W.T., et al., *Inhibited bacterial biofilm formation and improved osteogenic activity on gentamicin-loaded titania nanotubes with various diameters*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1215-30.
 129. Popat, K.C., et al., *Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes*. Biomaterials, 2007. **28**(32): p. 4880-8.
 130. Antoci, V., Jr., et al., *Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface*. Clin Orthop Relat Res, 2007. **461**: p. 81-7.
 131. Boot, W., et al., *Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Coating Does Not Affect Bone Apposition at the Implant Surface in a Rabbit Model*. Clin Orthop Relat Res, 2017. **475**(7): p. 1911-1919.
 132. Edupuganti, O.P., et al., *Covalent bonding of vancomycin to Ti6Al4V alloy pins provides long-term inhibition of Staphylococcus aureus colonization*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(10): p. 2692-6.
 133. Jose, B., et al., *Vancomycin covalently bonded to titanium beads kills Staphylococcus aureus*. Chem Biol, 2005. **12**(9): p. 1041-8.
 134. Ahire, J.J., et al., *Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of Listeria monocytogenes*. Biomed Pharmacother, 2017. **86**: p. 143-148.
 135. Ter Boo, G.A., et al., *Injectable gentamicin-loaded thermo-responsive hyaluronic acid derivative prevents infection in a rabbit model*. Acta Biomater, 2016. **43**: p. 185-194.
 136. Badar, M., et al., *Controlled drug release from antibiotic-loaded layered double hydroxide coatings on porous titanium implants in a mouse model*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(6): p. 2141-9.
 137. Lin, W.-T., Zhang, Y.-Y., Tan, H.-I., Ao, H.-Y., Duan, Z.-L., He, G., Tang, T.-T., *Inhibited Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Quaternized Chitosan-Loaded Titania Nanotubes with Various Diameters*. Materials, 2016. **9**: p. 155.
 138. Doadrio, A.L., et al., *Use of anodized titanium alloy as drug carrier: Ibuprofen as model of drug releasing*. Int J Pharm, 2015. **492**(1-2): p. 207-12.
 139. Matykina, E., et al., *Morphologies of nanostructured TiO₂ doped with F on Ti-6Al-4V alloy*. Electrochimica Acta, 2011. **56**(5): p. 2221-2229.
 140. Valle, J., et al., *SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2003. **48**(4): p. 1075-87.
 141. Valle, J., et al., *sigmaB regulates IS256-mediated Staphylococcus aureus biofilm phenotypic variation*. J Bacteriol, 2007. **189**(7): p. 2886-96.
 142. Kinnari, T.J., et al., *Bacterial adherence to SiO₂-based*

- multifunctional bioceramics*. J Biomed Mater Res A, 2009. **89**(1): p. 215-23.
143. Boulos, L., et al., *LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water*. J Microbiol Methods, 1999. **37**(1): p. 77-86.
 144. Hernandez-Lopez, J.M., et al., *TiO2 nanotubes with tunable morphologies*. RSC Advances, 2014. **4**(107): p. 62576-62585.
 145. Herigstad, B., M. Hamilton, and J. Heersink, *How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria*. J Microbiol Methods, 2001. **44**(2): p. 121-9.
 146. Braud, A., et al., *The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity*. J Bacteriol, 2009. **191**(11): p. 3517-25.
 147. Lozano, D., et al., *Influence of the nanostructure of F-doped TiO2 films on osteoblast growth and function*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(6): p. 1985-90.
 148. Cordero, J., L. Munuera, and M.D. Folgueira, *Influence of bacterial strains on bone infection*. J Orthop Res, 1996. **14**(4): p. 663-7.
 149. Frutos Cabanillas, P., et al., *Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **209**(1): p. 15-26.
 150. Hernández-López, J.M., et al., *Correlation of the nanostructure of the anodic layers fabricated on Ti13Nb13Zr with the electrochemical impedance response*. Corrosion Science, 2015. **94**(Supplement C): p. 61-69.
 151. Djuricic, A.B., et al., *Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts*. Small, 2015. **11**(1): p. 26-44.
 152. Cho, M., et al., *Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO2 photocatalytic disinfection*. Water Res, 2004. **38**(4): p. 1069-77.
 153. Suckow, M.A., V. Schroeder, and F.A. Douglas, *The Laboratory Rabbit, Second Edition*. 2010: CRC Press.
 154. Shah NB, O.D., Steckelberg JM, Sierra RJ, Walker RC, Tande AJ, Berbari EF., *Pseudomonas ProstheticJointInfections: A Review of 102 Episodes*. J BoneJointInfect 2016. **1**: p. 25-30.
 155. Doadrio, A.L., et al., *Drug release from ordered mesoporous silicas*. Curr Pharm Des, 2015. **21**(42): p. 6213-819.
 156. Doadrio, A.L., et al., *Mesoporous silica nanoparticles as a new carrier methodology in the controlled release of the active components in a polypill*. Eur J Pharm Sci, 2017. **97**: p. 1-8.
 157. Doadrio, A.L., et al., *A rational explanation of the vancomycin release from SBA-15 and its derivative by molecular modelling*. Microporous and Mesoporous Materials, 2010. **132**(3): p. 559-566.
 158. Doadrio, A.L., et al., *A molecular model to explain the controlled release from SBA-15 functionalized with APTES*. Microporous and Mesoporous Materials, 2014. **195**: p. 43-49.
 159. Lewis, K., *Persister cells*. Annu Rev Microbiol, 2010. **64**: p. 357-72.
 160. Lechner, S., K. Lewis, and R. Bertram, *Staphylococcus aureus persists tolerant to bactericidal antibiotics*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2012. **22**(4): p. 235-44.
 161. Lewis, K., *Persister cells, dormancy and infectious disease*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 48-56.
 162. Boyle-Vavra, S., M. Challapalli, and R.S. Daum, *Resistance to autolysis in vancomycin-selected Staphylococcus aureus isolates precedes vancomycin-intermediate resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(6): p. 2036-9.
 163. Hsu, C.Y., et al., *Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-*

- non-susceptible Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. **63**(2): p. 236-47.
164. Kadurugamuwa, J.L., A.J. Clarke, and T.J. Beveridge, *Surface action of gentamicin on Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 1993. **175**(18): p. 5798-805.
165. Ayers, M., et al., *PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus secretin*. J Mol Biol, 2009. **394**(1): p. 128-42.
166. Giltner, C.L., et al., *The Pseudomonas aeruginosa type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces*. Mol Microbiol, 2006. **59**(4): p. 1083-96.
167. Priest, N.D., *The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update*. J Environ Monit, 2004. **6**(5): p. 375-403.
168. Swim, H.E. and R.F. Parker, *The Role of Carbon Dioxide as an Essential Nutrient for Six Permanent Strains of Fibroblasts*. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1958. **4**(5): p. 525-528.
169. Nascimento, C., et al., *Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces*. Clin Oral Implants Res, 2014. **25**(3): p. 337-43.
170. Perez-Jorge, C., et al., *Bacterial and fungal biofilm formation on anodized titanium alloys with fluorine*. J Mater Sci Mater Med, 2017. **28**(1): p. 8.
171. Pina, R.G. and C. Cervantes, *Microbial interactions with aluminium*. Biometals, 1996. **9**(3): p. 311-6.
172. Lindsay, J.A., M.A. Aravena-Roman, and T.V. Riley, *Identification of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus hominis from blood cultures by testing susceptibility to desferrioxamine*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1993. **12**(2): p. 127-31.
173. Lemire, J.A., J.J. Harrison, and R.J. Turner, *Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(6): p. 371-84.
174. Jiang, W., H. Mashayekhi, and B. Xing, *Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles*. Environmental Pollution, 2009. **157**(5): p. 1619-1625.
175. Neilands, J.B., *Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26723-6.
176. Johnstone, T.C. and E.M. Nolan, *Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores*. Dalton Trans, 2015. **44**(14): p. 6320-39.
177. Saha, M., et al., *Microbial siderophores and their potential applications: a review*. Environ Sci Pollut Res Int, 2016. **23**(5): p. 3984-99.
178. Braud, A., et al., *New insights into the metal specificity of the Pseudomonas aeruginosa pyoverdine-iron uptake pathway*. Environ Microbiol, 2009. **11**(5): p. 1079-91.
179. Hammer, N.D. and E.P. Skaar, *Molecular mechanisms of Staphylococcus aureus iron acquisition*. Annu Rev Microbiol, 2011. **65**: p. 129-47.
180. Hammer, N.D. and E.P. Skaar, *The impact of metal sequestration on Staphylococcus aureus metabolism*. Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(1): p. 10-4.
181. Courcol, R.J., et al., *Siderophore production by Staphylococcus aureus and identification of iron-regulated proteins*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1944-8.
182. Lindsay, J.A., T.V. Riley, and B.J. Mee, *Production of siderophore by coagulase-negative staphylococci and its relation to virulence*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1994. **13**(12): p. 1063-6.

183. Porcheron, G., et al., *Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2013. **3**: p. 90.
184. Cox, C.D., et al., *Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(7): p. 4256-60.
185. Peek, M.E., et al., *Pyoverdine, the Major Siderophore in Pseudomonas aeruginosa, Evades NGAL Recognition*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012. **2012**: p. 10.
186. Chhibber, S., et al., *Putative virulence characteristics of Stenotrophomonas maltophilia: a study on clinical isolates*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008. **24**(12): p. 2819-2825.
187. Garcia, C.A., et al., *Iron is a signal for Stenotrophomonas maltophilia biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 926.
188. Ryan, R.P., et al., *The versatility and adaptation of bacteria from the genus Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(7): p. 514-25.
189. Upritchard, H.G., et al., *Adsorption of enterobactin to metal oxides and the role of siderophores in bacterial adhesion to metals*. *Langmuir*, 2011. **27**(17): p. 10587-96.
190. Brown, L., et al., *Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi*. *Nat Rev Microbiol*, 2015. **13**(10): p. 620-30.
191. Brickman, T.J. and M.A. McIntosh, *Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from Escherichia coli. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(17): p. 12350-5.
192. Cornelis, P., *Unexpected interaction of a siderophore with aluminum and its receptor*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(20): p. 6541-3.
193. Baysse, C., et al., *Uptake of pyocin S3 occurs through the outer membrane ferripyoverdine type II receptor of Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(12): p. 3849-51.
194. Ankenbauer, R.G. and H.N. Quan, *FptA, the Fe(III)-pyochelin receptor of Pseudomonas aeruginosa: a phenolate siderophore receptor homologous to hydroxamate siderophore receptors*. *J Bacteriol*, 1994. **176**(2): p. 307-19.
195. Meyer, J.M., A. Stintzi, and K. Poole, *The ferripyoverdine receptor FpvA of Pseudomonas aeruginosa PAO1 recognizes the ferripyoverdines of P. aeruginosa PAO1 and P. fluorescens ATCC 13525*. *FEMS Microbiol Lett*, 1999. **170**(1): p. 145-50.
196. Greenwald, J., et al., *The metal dependence of pyoverdine interactions with its outer membrane receptor FpvA*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(20): p. 6548-58.
197. Schalk, I.J., *Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway*. *J Inorg Biochem*, 2008. **102**(5-6): p. 1159-69.
198. Schalk, I.J., M. Hannauer, and A. Braud, *New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance*. *Environ Microbiol*, 2011. **13**(11): p. 2844-54.
199. Hannauer, M., et al., *The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 2012. **14**(7): p. 1696-708.
200. Schalk, I.J. and L. Guillon, *Pyoverdine biosynthesis and secretion in Pseudomonas aeruginosa: implications for metal*

- homeostasis. *Environ Microbiol*, 2013. **15**(6): p. 1661-73.
201. Banin, E., M.L. Vasil, and E.P. Greenberg, *Iron and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(31): p. 11076-81.
 202. Yang, L., et al., *Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation*. *Mol Microbiol*, 2009. **74**(6): p. 1380-92.
 203. Deepa, P. and R. Padmalatha, *Corrosion behaviour of 6063 aluminium alloy in acidic and in alkaline media*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017. **10**: p. S2234-S2244.
 204. Jha, B.K., et al., *Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, Pseudomonas aeruginosa, P. plecoglossicida and P. mosselii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009. **25**(4): p. 573-581.
 205. Khan, M., et al., *The epidemiology of failure in total knee arthroplasty: avoiding your next revision*. *Bone Joint J*, 2016. **98-B**(1 Suppl A): p. 105-12.
 206. Panhwar, Q.A., et al., *Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice*. *African Journal of Biotechnology*, 2012. **11**(11): p. 2711-2719.
 207. Park, K.H., C.Y. Lee, and H.J. Son, *Mechanism of insoluble phosphate solubilization by Pseudomonas fluorescens RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities*. *Lett Appl Microbiol*, 2009. **49**(2): p. 222-8.
 208. Das, K., S. Bose, and A. Bandyopadhyay, *TiO₂ nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction*. *J Biomed Mater Res A*, 2009. **90**(1): p. 225-37.
 209. Lai, M., Z. Jin, and Z. Su, *Surface modification of TiO₂ nanotubes with osteogenic growth peptide to enhance osteoblast differentiation*. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. **73**: p. 490-497.
 210. Meyer, J.M., et al., *Use of siderophores to type pseudomonads: the three Pseudomonas aeruginosa pyoverdine systems*. *Microbiology*, 1997. **143** (Pt 1): p. 35-43.
 211. Oh, S., et al., *Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006. **78A**(1): p. 97-103.
 212. Peng, Z., et al., *Dual effects and mechanism of TiO₂ nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion*. *Int J Nanomedicine*, 2013. **8**: p. 3093-105.
 213. Pozio, A., et al., *Titanium nanotubes stimulate osteoblast differentiation of stem cells from pulp and adipose tissue*. *Dent Res J (Isfahan)*, 2012. **9**(Suppl 2): p. S169-74.
 214. Yu, W.-Q., et al., *Osteogenic gene expression of canine bone marrow stromal cell and bacterial adhesion on titanium with different nanotubes*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2011. **99B**(2): p. 207-216.
 215. Mavrogenis, A.F., et al., *Biology of implant osseointegration*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2009. **9**(2): p. 61-71.
 216. Murai, K., et al., *Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats*. *J Biomed Mater Res*, 1996. **30**(4): p. 523-33.
 217. Gebelein, C.G., et al., *Advances in Biomedical Polymers*. 1987: Springer.
 218. Mello, A.S.d.S., et al., *Some aspects of bone remodeling around dental implants*. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 2016.
 219. Bori, G., et al., *Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint*

- infection*. Modern Pathology, 2010. **24**: p. 579.
220. Soto-Alvaredo, J., et al., *Evaluation of the biological effect of Ti generated debris from metal implants: ions and nanoparticles*. Metallomics, 2014. **6**(9): p. 1702-8.
221. Bhola, R., et al., *Corrosion in titanium dental implants/prostheses—a review*. Trends in Biomaterials and Artificial Organs, 2011. **25**(1): p. 34-46.
222. Jacobs, J.J., et al., *Metal release and excretion from cementless titanium alloy total knee replacements*. Clin Orthop Relat Res, 1999(358): p. 173-80.
223. Jacobs, J.J., et al., *Release and excretion of metal in patients who have a total hip-replacement component made of titanium-base alloy*. J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**(10): p. 1475-86.
224. Jacobs, J.J., et al., *Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(10): p. 1447-58.
225. Bianco, P.D., P. Ducheyne, and J.M. Cuckler, *Titanium serum and urine levels in rabbits with a titanium implant in the absence of wear*. Biomaterials, 1996. **17**(20): p. 1937-42.
226. Nuevo-Ordonez, Y., et al., *Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels*. Anal Bioanal Chem, 2011. **401**(9): p. 2747-54.
227. Patton, M.S., T.D. Lyon, and G.P. Ashcroft, *Levels of systemic metal ions in patients with intramedullary nails*. Acta Orthop, 2008. **79**(6): p. 820-5.
228. Sargeant, A., T. Goswami, and M. Swank, *Ion concentrations from hip implants*. J Surg Orthop Adv, 2006. **15**(2): p. 113-4.
229. Exley, C., *Human exposure to aluminium*. Environ Sci Process Impacts, 2013. **15**(10): p. 1807-1816.
230. Laboratories, M.M. *Aluminum, 24 Hour, Urine*. 1997-2017; Available from: <https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/8828>.
231. von Schewelov, T. and L. Sanzen, *Catastrophic failure due to aggressive metallosis 4 years after hip resurfacing in a woman in her forties--a case report*. Acta Orthop, 2010. **81**(3): p. 402-4.
232. Wills, M.R. and J. Savory, *Water content of aluminum, dialysis dementia, and osteomalacia*. Environ Health Perspect, 1985. **63**: p. 141-7.
233. Meyer-Baron, M., et al., *Occupational aluminum exposure: evidence in support of its neurobehavioral impact*. Neurotoxicology, 2007. **28**(6): p. 1068-78.
234. Robertson, J.A., et al., *Animal model of aluminum-induced osteomalacia: role of chronic renal failure*. Kidney Int, 1983. **23**(2): p. 327-35.
235. Ehrman, J.D., et al., *Microbial adhesion to zirconium alloys*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006. **50**(2): p. 152-9.
236. Huber, M.L., F., *Bacterial adhesion to femoral ballhead surfaces of artificial hipjoints in vitro*. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, 1999. **9**(4): p. 245-250.
237. Yoda, I., et al., *Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion*. BMC Microbiol, 2014. **14**: p. 234.
238. Lee, B.C., et al., *Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro*. J Adv Prosthodont, 2011. **3**(2): p. 81-4.
239. Truong, V.K., et al., *Self-organised nanoarchitecture of titanium surfaces influences the attachment of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa bacteria*.

- Appl Microbiol Biotechnol, 2015. **99**(16): p. 6831-40.
240. Webb, H.K., et al., *Bacterial attachment on sub-nanometrically smooth titanium substrata*. Biofouling, 2013. **29**(2): p. 163-70.
241. Ishihara, A., et al., *Titanium-Niobium Oxides as Non-Noble Metal Cathodes for Polymer Electrolyte Fuel Cells*. Vol. 5. 2015. 1289-1303.
242. Scarano, A., et al., *Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study*. J Periodontol, 2004. **75**(2): p. 292-6.
243. Chrzanowska, N.Z.-R., M., *The impacts of aluminum and zirconium nano-oxides on planktonic and biofilm bacteria*. Desalination and Water Treatment, 2014. **52**(19-21): p. 3680-3689.
244. Gowri, S., Rajiv Gandhi, R., Sundrarajan, M., *Structural, Optical, Antibacterial and Antifungal Properties of Zirconia Nanoparticles by Biobased Protocol*. Journal of Materials Science & Technology, 2014. **30**(8): p. 782-790.
245. Jangra, S.L., et al., *Antimicrobial activity of zirconia (ZrO₂) nanoparticles and zirconium complexes*. J Nanosci Nanotechnol, 2012. **12**(9): p. 7105-12.
246. Mftah, A., et al., *Physicochemical properties, cytotoxicity, and antimicrobial activity of sulphated zirconia nanoparticles*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 765-74.
247. Masip, L., K. Veeravalli, and G. Georgiou, *The many faces of glutathione in bacteria*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(5-6): p. 753-62.
248. Jensen, P.O., et al., *Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Pathog Dis, 2014. **70**(3): p. 440-3.
249. Dwyer, D.J., et al., *Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis*. Mol Cell, 2012. **46**(5): p. 561-72.
250. Kohanski, M.A., et al., *A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics*. Cell, 2007. **130**(5): p. 797-810.
251. Davey, H.M., *Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(16): p. 5571-6.
252. Ma, H. and J.D. Bryers, *Non-invasive method to quantify local bacterial concentrations in a mixed culture biofilm*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010. **37**(10): p. 1081-9.
253. Vuong, C., et al., *Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system*. Cell Microbiol, 2004. **6**(3): p. 269-75.
254. Liu, X., et al., *Oxidation-sensing regulator AbfR regulates oxidative stress responses, bacterial aggregation, and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis*. J Biol Chem, 2013. **288**(6): p. 3739-52.
255. Liu, G.Y., et al., *Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 209-15.
256. Zona, R., Solar ,S., NikolaGetoff, N., Sehested, K., Holcman, J., *Reactivity of OH radicals with chlorobenzoic acids — A pulse radiolysis and steady-state radiolysis study*. RadiationPhysicsandChemistry, 2010. **79**(5): p. 626-636.
257. Beaussart, A., et al., *Nanoscale adhesion forces of Pseudomonas aeruginosa type IV Pili*. ACS Nano, 2014. **8**(10): p. 10723-33.
258. Ma, L., et al., *Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000354.
259. Harimawan, A. and Y.P. Ting, *Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) properties of P. aeruginosa and B. subtilis and their role in bacterial*

- adhesion*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016. **146**: p. 459-467.
260. Fischer, C.R., et al., *The coexistence of Escherichia coli serotype O157:H7 and its specific bacteriophage in continuous culture*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **241**(2): p. 171-7.
261. Kanmani, P., Taik Lim, S., *Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens*. Process Biochemistry, 2013. **48**(7): p. 1099-1106.
262. Huang, G., et al., *Dual Roles of Capsular Extracellular Polymeric Substances in Photocatalytic Inactivation of Escherichia coli: Comparison of E. coli BW25113 and Isogenic Mutants*. Appl Environ Microbiol, 2015. **81**(15): p. 5174-83.
263. Hufnagel, D.A., W.H. Depas, and M.R. Chapman, *The Biology of the Escherichia coli Extracellular Matrix*. Microbiol Spectr, 2015. **3**(3).
264. Gong, A.S., et al., *Lack of influence of extracellular polymeric substances (EPS) level on hydroxyl radical mediated disinfection of Escherichia coli*. Environ Sci Technol, 2012. **46**(1): p. 241-9.
265. Lobo, V., et al., *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. Pharmacogn Rev, 2010. **4**(8): p. 118-26.