



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Programa de Doctorado: 3139 MEDICINA

Línea de Investigación: FISIOLÓGIA

**GENERACIÓN DE IMPLANTES
BIOLÓGICOS CUSTOM-MADE PARA EL
TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS
INFECCIONES OSTEOARTICULARES**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

María Amparo Ortega Yago

DIRECTORES:

Dr. Joan Ferràs Tarragó

Dr. Pascual Medina Bessó

Valencia, 22 de Julio de 2024

D. JOAN FERRÀS TARRAGÓ, adjunto de la sección de Sépticos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València y **D. PASCUAL MEDINA BESSÓ**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:


Que la presente memoria, titulada “Generación de implantes biológicos custom-made para el tratamiento y prevención de las infecciones osteoarticulares”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. María Amparo Ortega Yago para su presentación como tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 22 de julio de 2024

Firmado por FERRAS
TARRAGO JOAN -
***8361** el día
25/07/2024 con un
certificado emitido
Fdo.:

Dr. Joan Ferràs Tarragó

PASCUAL|
MEDINA|
BESO



Firmado digitalmente
por PASCUAL|
MEDINA|BESO
Fecha: 2024.07.24
19:50:22 +02'00'

Fdo.:

Dr. Pascual Medina Bessó

A mis padres, Antonio y Amparo, y a mi abuelo Antonio.

AGRADECIMIENTOS

En primer, lugar quiero agradecer al **Dr. Joan Ferràs Tarragó**, mi director de la Tesis. Su conocimiento y entusiasmo por el mundo de las nuevas tecnologías, el mundo de la impresión 3D y la traumatología han hecho que haya podido disfrutar y aprender en el desarrollo de esta tesis. Sin él no hubiera sido posible ya que es la persona que me ha impulsado desde mi inicio de la residencia a aprender y ampliar mis conocimientos más allá de la traumatología.

Mi más profundo agradecimiento al **Dr. Pascual Medina Bessó**, codirector de mi tesis, Coordinador de UCIM y Catedrático de Fisiología de la Universitat de València. Su aportación en todo el desarrollo de la tesis doctoral ha sido imprescindible por sus conocimientos y su ayuda en todo momento. Gracias por su paciencia infinita y apoyo en todo momento, sin él tampoco hubiera sido posible realizar esta tesis.

Al **Dr. Carlos Ezquer Garín**, investigador del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA. Su aportación en el desarrollo de la tesis doctoral ha sido esencial por sus conocimientos en las técnicas HPLC y en el desarrollo de la metodología. Gracias por su apoyo, trabajo y paciencia constante.

Al **Dr. José Miguel Sahuquillo Arce**, microbiólogo del Hospital Universitari i Politècnic la Fe de Valencia. Sin su ayuda en la parte de microbiología no hubiera sido posible realizar la parte metodológica central. Gracias por su ayuda para esta fase tan importante.

De manera más personal quisiera agradecer a mis padres por ser el pilar fundamental en mi vida y a mis amigos por el soporte y los ánimos que me han dado durante todo este tiempo.

Por último, mencionar a mi abuelo, Antonio. Aunque no pueda verlo, su ejemplo, humildad e influencia en mi vida ha sido esencial para llegar a ser lo que soy.

RESUMEN

El objeto de esta tesis es estudiar la aplicación de la impresión 3D, y especialmente la impresión basada en estereolitografía, al mundo de la Traumatología, para la creación de objetos custom-made con antibióticos termolábiles. La impresión 3D lleva en el campo de la sanidad diversos años, aplicándose en distintas especialidades y áreas de la salud con gran éxito y revolucionando el concepto que se tiene hoy en día de la medicina. La medicina de precisión es una realidad en nuestra profesión y la búsqueda del diagnóstico y el tratamiento individualizado forma parte de nuestra actualidad.

La erradicación de las infecciones osteoarticulares es compleja debido a la dificultad de la llegada de los antibióticos al foco de infección, al biofilm que se genera, los defectos óseos presentes y los resultantes del tratamiento y la limitación del uso de antibióticos localmente. Por estos motivos las infecciones suponen un reto para el cirujano a la hora de plantear el tratamiento del paciente. Además, las opciones terapéuticas presentes no están exentas de efectos secundarios o de nuevas cirugías para erradicar correctamente la infección. La impresión 3D permitirá realizar modelos custom-made o incluso diferentes objetos como tornillos y placas para adaptarlos a los defectos óseos, y utilizarlos como sostén mecánico que permita al paciente una mayor independencia mientras se realiza el tratamiento de la infección. Además, permitiría la impresión de dispositivos para la liberación sostenida de antibióticos comparada con otros dispositivos o sistemas de liberación, como el cemento óseo, y finalmente permitirá la adición de antibióticos para el tratamiento profiláctico o dirigido específicamente a los microorganismos que presente el paciente.

Para la obtención de dispositivos médicos no es apto cualquier tipo de material empleado en impresión 3D. Aunque las impresoras más empleadas son las de tipo FDM con ácido poliláctico (PLA), que debe de ser biocompatible con el paciente y permitir una correcta adición de antibiótico sin que se alteren sus propiedades. Las impresoras tipo FDM basan su impresión en un extrusor que emplea temperatura, que puede alterar las propiedades de antibióticos termolábiles.

Para el desarrollo del trabajo experimental empleamos por una parte una impresora 3D de estereolitografía (SLA), la resina biocompatible Optoprint® Lumina, que ha superado las pruebas requeridas para su uso en humanos y que podría emplearse en los pacientes y la amoxicilina-ácido clavulánico, un

antibiótico termolábil, para la fabricación de diversos modelos de piezas para la elución prolongada y sostenida del antibiótico. La luz ultravioleta utilizada por las impresoras SLA para activar la polimerización de la resina no altera las propiedades de la amoxicilina-clavulánico.

Primero se estudió la compatibilidad de la mezcla entre la resina y el antibiótico. La mezcla se hizo con 10 g de resina y cantidades crecientes de amoxicilina-clavulánico. Adiciones de hasta 4 g de antibiótico permitieron la correcta impresión de piezas reproducibles, con cantidades mayores de antibiótico se obtuvieron piezas poco reproducibles. Para la impresión de las piezas se utilizaron mezclas con 1, 1,5 y 2 g de amoxicilina-clavulánico. Posteriormente se diseñaron diversas piezas cilíndricas de 10 mm de diámetro y 5 mm de altura, de mayor a menor distribución de orificios, modelos A, B y C, respectivamente. Las piezas con mayor número de orificios tenían una mayor superficie de contacto con el líquido circundante.

Las piezas se colocaron en tubos de ensayo a 37 °C con 1 mL de PBS, para estudiar la elución de la amoxicilina-clavulánico mediante HPLC. Las piezas del modelo B impresas con 10 g de resina y 2 g de amoxicilina-clavulánico fueron las que eluyeron mayor cantidad de antibiótico, alcanzando el valor máximo el primer día y disminuyendo progresivamente hasta el quinto día. La elución del antibiótico fue proporcional a la superficie de contacto con el medio y a la cantidad de antibiótico añadido a la resina. El antibiótico eluido de las piezas poseía actividad antimicrobiana, determinada por la técnica de microdilución en placa, al inhibir el crecimiento de cepas *Escherichia coli* sensibles a amoxicilina. La actividad antimicrobiana mostró un perfil similar al de la elución de amoxicilina-clavulánico, observándose actividad hasta 2 semanas después de iniciada la prueba. Finalmente, el estudio mecánico mostró que las piezas impresas con resina y antibiótico presentaban unos adecuados valores de fuerza ténsil similares a las de las piezas impresas únicamente con la resina, aunque la resistencia disminuyó cuando se había eluido el antibiótico.

En conclusión, los resultados de la tesis indican que el diseño de piezas con distintas características estructurales se puede materializar mediante impresión SLA con una resina biocompatible y la adición de fármacos, incluso antibióticos termolábiles, lo que permitirá personalizar las piezas a las necesidades del paciente y del traumatólogo.

ABSTRACT

The objective of this thesis is to investigate the application of 3D printing, specifically stereolithography-based printing, in the field of Traumatology. The focus is on creating custom-made objects with thermolabile antibiotics. 3D printing has been employed in healthcare for several years, significantly impacting various medical specialties and revolutionizing our understanding of medicine today. Precision medicine is now a tangible reality in our profession, and the pursuit of personalized diagnosis and individualized treatment is integral to our current practice.

The eradication of osteoarticular infections presents a multifaceted challenge due to factors such as antibiotic delivery to the infection site, biofilm formation, existing bone defects, and treatment-related complexities. Surgeons face formidable decisions when devising patient treatment plans. Existing therapeutic options are not without side effects or the need for additional surgeries to effectively combat infections. 3D printing offers the possibility of creating custom models and various objects, including screws and plates, tailored to adapt to bone defects. These can serve as mechanical support, granting patients greater autonomy during infection treatment. Furthermore, 3D printing enables the production of devices for sustained antibiotic release, surpassing other delivery systems like bone cement. It also facilitates the incorporation of antibiotics for prophylactic or targeted treatment based on the patient's specific microbial profile.

Not all 3D printing materials are suitable for medical devices. While the most used printers are FDM (Fused Deposition Modeling) printers with polylactic acid (PLA), biocompatibility with patients is crucial to ensure proper antibiotic integration without compromising its properties. FDM printers utilize temperature-controlled extruders, which may impact the properties of thermolabile antibiotics.

In our experimental work, we employed a stereolithography (SLA) 3D printer with the biocompatible Optoprint® Lumina resin, which has successfully passed the required tests for human use. We combined it with amoxicillin-clavulanic acid, a thermolabile antibiotic, to print various models for prolonged and sustained antibiotic elution. The ultraviolet light used by SLA printers for resin polymerization does not alter the properties of amoxicillin-clavulanic acid.

Initially, we investigated the compatibility between the resin and the antibiotic mixture. The blend consisted of 10 g of resin and increasing amounts of amoxicillin-clavulanic acid. Up to 4 g of antibiotic allowed for proper printing of reproducible pieces, while higher amounts resulted in less consistent parts. For printing purposes, we utilized mixtures containing 1, 1.5, and 2 g of amoxicillin-clavulanic acid. Subsequently, we designed cylindrical pieces with diameters of 10 mm and heights of 5 mm, labeled as models A, B, and C, respectively. Pieces with a greater number of holes had a larger surface area for interaction with the surrounding fluid.

The specimens were placed in test tubes at 37°C with 1 mL of PBS to investigate the elution of amoxicillin-clavulanic acid using high-performance liquid chromatography (HPLC). Among the model B pieces printed with 10 g of resin and 2 g of amoxicillin-clavulanic acid, those eluted the highest amount of antibiotic. The elution reached its maximum value on the first day and gradually decreased until the fifth day. Antibiotic elution was directly proportional to the surface area in contact with the medium and the amount of antibiotic incorporated into the resin. The eluted antibiotic from the pieces exhibited antimicrobial activity, as determined by the microdilution plate technique, effectively inhibiting the growth of *Escherichia coli* strains sensitive to amoxicillin. The antimicrobial activity demonstrated a profile similar to that of amoxicillin-clavulanic acid elution, remaining active for up to 2 weeks after the start of the experiment.

Finally, the mechanical study revealed that pieces printed with resin and antibiotic displayed suitable tensile strength values comparable to those of pieces printed solely with resin. However, resistance decreased once the antibiotic had been eluted.

In conclusion, the results of this thesis indicate that designing pieces with varying structural characteristics can be achieved through SLA printing using biocompatible resin and the addition of drugs, including thermolabile antibiotics. This approach allows for personalized customization of pieces to meet the needs of both patients and orthopedic surgeons.

RESUM

L'objecte d'aquesta tesi és estudiar l'aplicació de la impressió 3D, especialment la basada en estereolitografia, en el món de la Traumatologia per a la creació d'objectes personalitzats amb antibiòtics termolàbils. La impressió 3D ha estat present en el camp de la sanitat durant els últims anys, aplicant-se amb èxit en diferents especialitats i àrees de la salut, revolucionant el concepte actual de la medicina. La medicina de precisió és una realitat en la nostra professió, i la recerca del diagnòstic i el tractament individualitzat forma part del nostre dia a dia.

L'eradicació de les infeccions osteoarticulars és complexa a causa de la dificultat d'arribada dels antibiòtics al focus d'infecció, el biofilm que es genera, els defectes ossis presents i els resultants del tractament, així com la limitació de l'ús d'antibiòtics localment. Per aquests motius, les infeccions representen un repte per als cirurgians a l'hora de plantejar el tractament del pacient. A més, les opcions terapèutiques actuals no estan exemptes d'efectes secundaris o de noves cirurgies per eradicar correctament la infecció. La impressió 3D permetrà crear models personalitzats o fins i tot diferents objectes com ara cargols i plaques per adaptar-los als defectes ossis, utilitzant-los com a suport mecànic que permeti al pacient una major independència durant el tractament de la infecció. A més, possibilitaria la impressió de dispositius per a la lliberació sostenida d'antibiòtics, comparada amb altres dispositius o sistemes de lliberació com el ciment òssia, i finalment permetria l'addició d'antibiòtics per al tractament profilàctic o dirigit específicament als microorganismes presents en el pacient.

Per a l'obtenció de dispositius mèdics, no qualsevol material utilitzat en la impressió 3D és adequat. Tot i que les impressores més comunes són les de tipus FDM amb àcid polilàctic (PLA), aquest material ha de ser biocompatible amb el pacient i permetre una correcta incorporació d'antibiòtics sense alterar les seves propietats. Les impressores FDM es basen en un extrusor que utilitza temperatura, la qual cosa pot afectar les propietats dels antibiòtics termolàbils.

En el desenvolupament del treball experimental, vam utilitzar una impressora 3D d'estereolitografia (SLA), la resina biocompatible Optoprint® Lumina, que ha superat les proves requerides per al seu ús en éssers humans. A més, vam emprar amoxicil·lina-àcid clavulànic, un antibiòtic termolàbil, per a la fabricació de diversos models de peces per a l'elució prolongada i sostenida de l'antibiòtic. La

llum ultraviolada utilitzada per les impressores SLA per activar la polimerització de la resina no altera les propietats de l'amoxicil·lina-àcid clavulànic.

Primerament, es va estudiar la compatibilitat de la mescla entre la resina i l'antibiòtic. La mescla es va realitzar amb 10 g de resina i quantitats creixents d'amoxicil·lina-àcid clavulànic. Addicions de fins a 4 g d'antibiòtic van permetre la correcta impressió de peces reproduïbles, mentre que quantitats majors d'antibiòtic van donar lloc a peces poc reproduïbles. Per a la impressió de les peces, es van utilitzar mescles amb 1, 1,5 i 2 g d'amoxicil·lina-àcid clavulànic. Posteriorment, es van dissenyar diverses peces cilíndriques de 10 mm de diàmetre i 5 mm d'altura, amb una distribució d'orificis que anava de major a menor, models A, B i C, respectivament. Les peces amb major nombre d'orificis presentaven una superfície de contacte més gran amb el líquid circumdant.

Les peces es van col·locar en tubs d'assaig a 37 °C amb 1 mL de PBS per estudiar l'elució de l'amoxicil·lina-àcid clavulànic mitjançant HPLC. Les peces del model B, impreses amb 10 g de resina i 2 g d'amoxicil·lina-àcid clavulànic, van ser les que van eluir una major quantitat d'antibiòtic, arribant al valor màxim el primer dia i disminuint progressivament fins al cinquè dia. L'elució de l'antibiòtic va ser proporcional a la superfície de contacte amb el medi i a la quantitat d'antibiòtic afegit a la resina. L'antibiòtic eluït de les peces mostrava activitat antimicrobiana, determinada mitjançant la tècnica de microdilució en placa, inhibint el creixement d'*Escherichia coli* sensibles a l'amoxicil·lina. Aquesta activitat antimicrobiana va mantenir-se fins a 2 setmanes després d'iniciar la prova. Finalment, l'estudi mecànic va mostrar que les peces impreses amb resina i antibiòtic presentaven uns valors adequats de força tènsil similars a les de les peces impreses únicament amb la resina, encara que la resistència va disminuir quan s'havia eluït l'antibiòtic.

En conclusió, els resultats de la tesi indiquen que el disseny de peces amb diferents característiques estructurals es pot materialitzar mitjançant impressió SLA amb una resina biocompatible i l'addició de fàrmacs, inclús antibiòtics termolàbils, la qual cosa permetrà personalitzar les peces a les necessitats del pacient i del traumatòleg.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	17
ÍNDICE DE FIGURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	27
ABREVIATURAS	29
1 INTRODUCCIÓN	33
1.1 LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES	35
1.1.1 HISTORIA DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES	35
1.1.2 EL TEJIDO ÓSEO Y SUS PROPIEDADES	36
1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA Y MORBIMORTALIDAD de las INFECCIONES OSTEOARTICULARES	39
1.1.4 IMPACTO ACTUAL DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES	40
1.1.5 FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN OSTEOARTICULAR	41
1.1.6 TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE INFECCIONES OSTEOARTICULARES	42
1.1.6.1 ARTRITIS SÉPTICA NATIVA	42
1.1.6.2 INFECCIONES ASOCIADAS A LAS FRACTURAS	42
1.1.6.3 OSTEOMIELITIS	43
1.1.6.4 PSEUDOARTROSIS SÉPTICA	44
1.1.6.5 INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR (IPA)	44
1.1.7 MICROORGANISMOS CAUSALES	46
1.1.8 EL BIOFILM	47
1.1.9 DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES ARTICULARES.....	48
1.1.10 TRATAMIENTO	50

1.1.10.1 ANTIBIOTERAPIA DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES	50
1.1.10.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES	52
1.2 IMPRESIÓN 3D: LA REVOLUCIÓN TECNOLÓGICA	65
1.2.1 CONTEXTO E HISTORIA	65
1.2.2 MATERIALES EMPLEADOS EN LA IMPRESIÓN 3D	68
1.2.3 TIPOS DE IMPRESORAS 3D	70
1.2.3.1 IMPRESIÓN BASADA EN BOQUILLAS	71
1.2.3.2 MICROJERINGAS ASISTIDAS POR PRESIÓN (PAM)	74
1.2.3.3 IMPRESIÓN POR INYECCIÓN DE TINTA	75
1.2.3.4 IMPRESORAS LÁSER	77
1.2.4 IMPRESIÓN 3D Y ANTIBIÓTICOS	88
1.2.5 UTILIDAD IMPRESIÓN 3D EN EL MARCO ACTUAL Y PROBLEMÁTICA	88
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	91
2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO:	93
2.2 OBJETIVOS	95
2.2.1 OBJETIVO GENERAL	95
2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	95
3 MATERIAL Y MÉTODOS	97
3.1 DISEÑO DE LAS PIEZAS	99
3.2 MATERIALES PARA LA IMPRESIÓN y la FABRICACIÓN DE LAS PIEZAS	102
3.3 MEZCLA DE ANTIBIÓTICO Y RESINA PARA LA IMPRESIÓN 3D.	104
3.4 IMPRESIÓN 3D Y FABRICACIÓN DE LAS PIEZAS	105
3.5 ESTUDIO DE ELUCIÓN DE AMOXICILINA Y CLAVULÁNICO	108
3.5.1. TOMA DE MUESTRAS	108

3.5.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	108
3.5.2.1. TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	108
3.5.2.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	109
3.5.2.3. PREPARACIÓN DE CALIBRADORES Y CONTROLES	110
3.6 ESTUDIO DEL PROCESO DE ELUCIÓN	113
3.7 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	114
3.8 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS piezas	116
3.9 DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	118
4 RESULTADOS	121
4.1 IMPRESIÓN Y FABRICACIÓN DE LAS PIEZAS	123
4.1.1 FABRICACIÓN DE LOS LOTES DEL <i>MODELO B</i> Y <i>MODELO C</i>	125
4.2 ESTUDIO DE LA ELUCIÓN DE AMOXICILINA Y ÁCIDO CLAVULÁNICO.	127
4.2.1 ELUCIÓN DE AMOXICILINA.	128
4.2.2 ELUCIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO.....	134
4.2.3 ELUCIÓN DE AMOXICILINA Y ÁCIDO CLAVULÁNICO DEL <i>MODELO D</i>	139
4.3 ESTUDIO DEL PESO DE LAS PIEZAS TRAS LA ELUCIÓN.	140
4.4 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	145
4.5 ESTUDIO MECÁNICO	147
5 DISCUSIÓN	153
5.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS	167
5.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO	168
5.6 LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	169
6 CONCLUSIONES	173
7 BIBLIOGRAFÍA	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Descripción de las piezas que forman parte de la impresora FDM. Abajo, se observa la plataforma de impresión y arriba, el rollo de filamento que se funde gracias a la unidad de control de temperatura, y que es extruido en la boquilla. Imagen modificada de Konta <i>et al.</i> (184).	73
Figura 2: Partes de la impresora de sintetizado selectivo por láser. Arriba, la fuente láser con el sistema de escaneado. Gracias a calentar el lecho de polvo, se produce la polimerización de las partículas y la formación del objeto 3D. El rodillo posteriormente desplaza las partículas del lecho de polvo no impresas. Imagen modificada de Wang <i>et al.</i> (212).	78
Figura 3: Tipos de impresora SLA. A la izquierda, la impresora de “arriba a abajo” y a la derecha, la impresora de “abajo a arriba”. Imagen modificada de Billiet <i>et al.</i> (214).	80
Figura 4: Partes que conforma la impresora DLP. El proyector, que normalmente se sitúa abajo, ilumina la forma del objeto en la capa que se está imprimiendo sobre la superficie de la resina líquida en la plataforma. Imagen modificada de Pagac <i>et al.</i> (215).	85
Figura 5: Partes que forman la impresora CLIP. Emplea la proyección LED digital junto con una ventana permeable al oxígeno, y una plataforma en constante movimiento. Imagen modificada de Johnson <i>et al.</i> (229).	86
Figura 6: Diseño de la pieza del <i>modelo A</i> donde se muestran los orificios de 0,5 mm de diámetro espaciados 1 mm. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.....	99
Figura 7: Diseño de la pieza del <i>modelo B</i> donde se muestran los orificios de 1 mm de diámetro espaciados 2 mm. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.....	100
Figura 8: Diseño de la pieza del <i>modelo C</i> donde se muestran los orificios de 2 mm de diámetro espaciados 4 mm. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.....	100
Figura 9: Diseño del molde para obtener piezas del <i>modelo D</i> donde se muestran los orificios para rellenar con el cemento y obtener piezas cilíndricas de 10 mm	

de diámetro y 5 mm de alto. El molde fue generado con el programa de diseño Thinkercad® (Autodesk).	101
Figura 10: Representación de una pieza del <i>modelo D</i> fabricada con cemento donde se muestra la superficie lisa del cilindro. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.	102
Figura 11: A) Bote de resina de la marca Optiprint® Lumina (Dentona) empleada para la impresión de las piezas del <i>modelo A</i> , <i>modelo B</i> y <i>modelo C</i> . B) Cemento Palacos®LV (Haraeus) utilizado frecuentemente en reconstrucciones quirúrgicas en traumatología y para la fabricación de las piezas del <i>modelo D</i>	103
Figura 12: Fotografía de la impresora Elegoo Mars 2© empleada en el presente estudio.	106
Figura 13: Equipo modular de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) 1200 series® (Agilent Technologies) utilizado para identificar y cuantificar la amoxicilina y el ácido clavulánico.	110
Figura 14: Rectas de calibrado para la amoxicilina, A) en un rango bajo de concentraciones (1; 5; 10; 25; 50 y 100 mg/L) y B) en un rango alto de concentraciones (50; 100; 200; 400; 800 y 1600 mg/L), utilizadas para determinar la concentración de la amoxicilina eluida de las piezas. Cada gráfica muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación R^2	111
Figura 15: Rectas de calibrado para el ácido clavulánico, A) en un rango bajo de concentraciones (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/L) y B) en un rango alto de concentraciones (5; 10; 20; 40; 80 y 160 mg/L), utilizadas para determinar la concentración del ácido clavulánico eluido de las piezas. Cada gráfica muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación R^2	112
Figura 16: Fotografía de la placa de microtitulación con pocillos en U utilizada para la determinación de la CMI de la amoxicilina-clavulánico en las cepas de <i>E. Coli</i> estudiadas.	116
Figura 17: A) Dinamómetro PCE-DFG N 5K® (PCE instruments) para el monitorización y registro de la fuerza de compresión aplicada sobre la pieza. B) Máquina de ensayo motorizada PCE-MTS500® (PCE instruments) utilizada para colocar la pieza y generar la fuerza de compresión.	118
Figura 18: Pieza del <i>modelo A</i> impresa con la resina Optiprint® Lumina en la impresora Elegoo Mars 2 donde se muestran los orificios de 0,5 mm de diámetro espaciados 1 mm.	123

Figura 19: Pieza del *modelo B* impresa con la resina Optiprint® Lumina en la impresora Elegoo Mars 2 donde se muestran los orificios de 1 mm de diámetro espaciados 2 mm..... 124

Figura 20: Pieza del *modelo C* impresa con la resina Optiprint® Lumina en la impresora Elegoo Mars 2 donde se muestran los orificios de 2 mm de diámetro espaciados cada 2 mm. 124

Figura 21: Pesos medios de los 8 lotes independientes de las piezas del *modelo B* y *modelo C* impresos con la resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) o en presencia de amoxicilina-clavulánico (1, 1,5 o 2 g). * $P < 0.05$ comparado con grupo de piezas impresas con 0, 1 y 1,5 g de amoxicilina-clavulánico..... 125

Figura 22: Comparación de los pesos medios de los 8 lotes del *modelo B* y del *modelo C* impresos con 10 g de la resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) y en presencia de 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico. Los puntos representan la media de cada uno de los 8 lotes de fabricación para cada una de las condiciones experimentales. * $P < 0.05$ comparado con el *modelo B*..... 126

Figura 23: Cromatograma representativo de la detección de la amoxicilina (AMOX) y el ácido clavulánico (CLAV) eluidos durante 1 día de una pieza del *modelo B* impresa con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 2 g de amoxicilina-clavulánico. Fase móvil compuesta por tampón fosfato (KH_2PO_4) 0,02 M (pH ajustado a 3,0 con H_3PO_4)/metanol (modo de elución de gradiente). Columna de fase reversa C18 Scharlau (150 mm de longitud x 4.6 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) con un flujo de 1,0 mL min^{-1} y un volumen de inyección de 10 μL . Detección UV/Visible λ 230 nm..... 128

Figura 24: A) Elución de amoxicilina de piezas del *modelo B* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de amoxicilina en unidades arbitrarias. * $P < 0.05$ versus piezas impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus con piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico..... 129

Figura 25: A) Elución de amoxicilina de piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de amoxicilina con el tiempo. * $P < 0.05$ versus *modelo C* con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico..... 131

Figura 26: Paneles A), C), E) Comparación de la elución de amoxicilina entre las piezas del *modelo B* y *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico (Amox + Clav) cada 24 horas durante 7

días. Paneles B), D), E) Área bajo la curva de la elución de amoxicilina. * $P < 0.05$ versus el modelo B. 133

Figura 27: A) Elución de ácido clavulánico de piezas del *modelo B* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de ácido clavulánico. * $P < 0.05$ versus piezas impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico. 134

Figura 28: A) Elución de ácido clavulánico de piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de ácido clavulánico con el tiempo. * $P < 0.05$ versus piezas impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico. 136

Figura 29: Paneles A), C), E) Comparación de la elución de ácido clavulánico entre las piezas del *modelo B* y *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico (Amox + Clav) cada 24 horas durante 7 días. Paneles B), D), E) Área bajo la curva de la elución de ácido clavulánico. * $P < 0.05$ versus el modelo B. 138

Figura 30. Elución de amoxicilina de las piezas del *modelo D* cada 24 horas durante 7 días. 139

Figura 31 Elución de ácido clavulánico de las piezas del *modelo D* cada 24 horas durante 7 días. 140

Figura 32: Valores del peso medio antes (●) y después (○) de la elución de la amoxicilina-clavulánico de las piezas del *modelo B* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina y con A) 1 g, B) 1,5 g y C) 2 g de amoxicilina-clavulánico. Para cada pieza se calculó la diferencia entre el peso inicial y el peso después de la elución, indicativo de la pérdida de peso (▲) y el peso teórico de amoxicilina-clavulánico calculado a partir del peso inicial de cada pieza (Δ). 141

Figura 33: Valores del peso medio antes (●) y después (○) de la elución de la amoxicilina-clavulánico de las piezas del *modelo C* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina y con A) 1 g, B) 1,5 g y C) 2 g de amoxicilina-clavulánico. Para cada pieza se calculó la diferencia entre el peso inicial y el peso después de la elución, indicativo de la pérdida de peso (▲) y el peso teórico de amoxicilina-clavulánico calculado a partir del peso inicial de cada pieza (Δ). 142

Figura 34: Valores del peso medio antes (●) y después (○) de la elución de la amoxicilina-clavulánico de las piezas del *modelo D* fabricadas con cemento

Palacos®LV con 2 g de amoxicilina-clavulánico. Para cada pieza se calculó la diferencia entre el peso inicial y el peso después de la elución, indicativo de la pérdida de peso (▲)..... 143

Figura 35: A) Pieza del *modelo D* sumergida en una solución de azul de metileno, desecada y partida por la mitad, donde se puede observar que el azul de metileno tiñe la superficie de la pieza, pero no ha penetrado por el interior de la pieza. B) Pieza del *modelo B* sin sumergir y partida por la mitad donde se observa el color de la resina Optiprint® Lumina y C) pieza del *modelo B* sumergida en la solución de azul de metileno, desecada y partida por la mitad, donde se observa que el azul de metileno ha penetrado a través de la red polimerizada de la resina. D) Fotografía ampliada de la pieza del *modelo B* antes y después de haberse sumergido en una solución de azul de metileno. 144

Figura 36: Curva con el máximo y el mínimo de la elución de antibiótico en las colonias de *E. coli* sensible a amoxicilina-clavulánico. 146

Figura 37: Registros de la fuerza de compresión aplicada hasta la rotura de las piezas del *modelo B*, impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina, A) en ausencia (Sin Amox + Clav) o en presencia de 2 g de amoxicilina-clavulánico, B) antes (2 g Amox + Clav pre) y C) después (2 g Amox+ Clav post) de la elución de los fármacos. D) Valores medios y desviación estándar de la fuerza de rotura de las piezas del *modelo B* en las diferentes condiciones experimentales..... 148

Figura 38: Fotografía de una pieza del *modelo B* (izquierda) y *modelo D* (derecha) fabricadas con 2 g de amoxicilina-clavulánico y tras la elución de los fármacos durante 7 días a las que se les ha aplicado la fuerza de rotura..... 149

Figura 39: Registro de la fuerza de compresión desarrollada hasta la rotura de A) una pieza del *modelo B* y B) una pieza del *modelo D* fabricadas con 2 g de amoxicilina-clavulánico después de la elución de los fármacos durante 7 días. C) Valores medios de la fuerza de rotura de la pieza del *modelo B* y *modelo D* fabricadas con 2 g de amoxicilina-clavulánico después de la elución de los fármacos durante 7 días. 150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de los tipos de impresión, precisión y grosor de las capas impresas, coste de las impresoras y ventajas e inconvenientes de la impresión.87

Tabla 2: Peso medio y coeficiente de variación (CV) de las piezas del *modelo B* y del *modelo C* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) o en presencia de 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico. 127

Tabla 3: Valores de la elución de amoxicilina por las piezas del *modelo B* impresas con la mezcla de 10 g de la resina Optiprint® Lumina con 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. 129

Tabla 4: Valores de la elución de amoxicilina por las piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. 132

Tabla 5: Valores de la elución de ácido clavulánico por las piezas del *modelo B* impresas con 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. 135

Tabla 6: Valores de la elución de ácido clavulánico por las piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. 137

Tabla 7: Valores medios del peso inicial, peso final después de la elución, variación del peso y cantidad teórica de amoxicilina-clavulánico (Amox-Clav) en las piezas del *modelo B* y del *modelo C* impresos con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico. 142

Tabla 8: Valores de la equivalencia de la capacidad microbicida en las colonias de *E. coli* sensible a amoxicilina-clavulánico de las soluciones de PBS con el antibiótico eluido a los diferentes tiempos de las piezas del *modelo B* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) y en presencia de 2 g de amoxicilina-clavulánico. 146

ABREVIATURAS

ABS: Acrilonitrilo Butadieno Estireno

AMF: Additive Manufacturig File Format

ANOVA: Análisis de varianza

ANCOVA: Análisis de covarianza

CIP: Continuous inkjet Printing

CLIP: Continuous Liquid Interphase Production

DAC: Defensive Antibacterial Coating

DAIR: Desbridamiento, Antibiótico, Irrigación, Retención del polietileno

DICOM: Digital Imaging and Compmunications in Medicine

DoD: Drop on Demand

DLP: Procesamiento digital de luz

EBM: Electron Beam Melting

FDM: Modelación por Deposición Fundida

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

IMC: índice de Masa Corporal

IPA: Infección Protésica Aguda

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MPJ: Multijet Printing Polyjet

MSL: Microesterolitografía

NiTiNOL: Nickel Titanium Naval Ordnance Laboratory

PAM: Microjeringas Asistidas por Presión

PBS: Phosphate Buffer Saline (Tampón fosfato-salino)

PCR: Proteína C Reactiva

PLA: Ácido Poliláctico

PMMA: Polimetilmetacrilato

PTR: Prótesis Total de Rodilla

RNA: Ácido Ribonucleico

SLA: Estereolitografía

SLM: Selective Laser Melting

SLS: Sintetizado Selectivo por Láser

STL: Standard File Format

TC: Tomografía computerizada

RM: Resonancia magnética

VSG: Velocidad de Sedimentación Globular

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES

1.1.1 HISTORIA DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES

La infección osteoarticular no es un concepto *de novo*, sino que se remonta a hace miles de años, cuando ya en un fémur de un *Homo erectus* se observó osteomielitis. Se han descrito casos de infección osteoarticular en los Neandertales hace 50.000 años, al encontrarse hallazgos de osteomielitis en una clavícula en una región cercana a Irak (1).

Ya Celsus en la Antigua Roma describió la importancia de realizar un correcto desbridamiento óseo hasta obtener hueso vivo viable, es decir, sangrante. A esto se le conoce hoy en día como signo de sal y pimienta, y es uno de los objetivos principales del tratamiento (2).

Con la llegada de las guerras con armas de fuego, apareció el concepto de osteomielitis postraumática, consecuencia de las fracturas abiertas por los disparos de las armas. El barón Larrey, un cirujano que luchaba en el ejército de Napoleón, realizó más de 200 amputaciones de piernas en lesiones por arma de fuego como tratamiento de las fracturas, para prevenir la infección (3).

El concepto del secuestro óseo lo definió John Hunter tras realizar diversos experimentos en animales en el siglo XVIII. Posteriormente, Louis Pasteur descubrió en el siglo XIX la principal bacteria causal de la osteomielitis: el *Staphylococcus aureus* (4). La revolución definitiva llegó con Alexander Flemming en el siglo XX cuando descubrió la penicilina. Con este hallazgo consiguió que la mortalidad por osteomielitis hematógena bajara de un 20% a menos de un 3% (5).

Hans Wilhelm Buchholz, un cirujano con amplia experiencia en el campo de las prótesis articulares describió cómo había reducido la tasa de las infecciones

protésicas cuando realizaba una prótesis total de cadera, gracias a añadir gentamicina al cemento que empleaba para fijar los vástagos de las prótesis (6). Poco después, en 1972, Klaus W. Klemm creó las bolas de gentamicina junto con cemento óseo o polimetilmetacrilato (PMMA) que aplicaba en el hueso medular de los pacientes tras realizar el desbridamiento, convirtiéndose en la primera administración de antibiótico local en un defecto óseo (7).

A pesar de los grandes avances y revoluciones terapéuticas que se han ido desarrollando a lo largo de la historia, actualmente la infección osteoarticular sigue representando un reto para el cirujano debido al aumento de resistencias de los microorganismos frente a los antibióticos, la dificultad para realizar un correcto diagnóstico, los defectos óseos resultantes y la afectación de partes blandas secundaria a la infección, constituyendo un conjunto de enfermedades difíciles de erradicar.

1.1.2 EL TEJIDO ÓSEO Y SUS PROPIEDADES

El hueso es un tejido conectivo que forma la estructura del esqueleto, y que proporciona protección y soporte, dando sostén al sistema locomotor. El tejido óseo se constituye principalmente por células y matriz ósea.

- **Matriz ósea**: la matriz del tejido óseo se compone esencialmente de colágeno tipo 1 y sustancias fundamentales, que son las que proporcionan elasticidad y fuerza. Esto es importante por las propiedades mecánicas que posee el hueso y que se intenta reproducir en sustitutos óseos para mantener la resistencia en un defecto óseo(8).

Entre de las células del tejido óseo, se encuentran:

- **Células osteógenas**: son las osteoprogenitoras, y dependiendo de la concentración de oxígeno de su ambiente se diferencian en células

osteógenas cuando la concentración es alta o en células condrógenas cuando la concentración de oxígeno es baja.

- **Osteoblastos**: se sitúan en la superficie externa del hueso y son los responsables de producir la sustancia intercelular. Así mismo, depositan en el osteoide fosfato y carbonato cálcico, que constituye la matriz inorgánica.
- **Osteocitos**: son osteoblastos atrapados en la matriz ósea. El osteocito es esencial para mantener el intercambio de nutrientes entre el tejido óseo y los vasos sanguíneos.
- **Células de estirpe monocítica**: dentro de este subtipo se encuentran los osteoclastos, que se encargan de la remodelación y resorción ósea (9).

Entre las propiedades que presenta el hueso cabe destacar (10):

- **Capacidad de regeneración**: el tejido óseo es capaz de regenerarse frente a las agresiones externas (fractura) como también internas.
- **Vascularización**: el tejido óseo posee una rica vascularización, esencialmente gracias al periostio, que está sumamente vascularizado e innervado. El hueso esponjoso presenta mayor vascularización, menor porcentaje de matriz inorgánica y mayor fluido extravascular que el hueso cortical (11). Con respecto a los sistemas de Havers, se encuentran en el hueso compacto o denso, donde las laminillas óseas se disponen de forma concéntrica a los vasos de su interior. Posee escaso tejido conjuntivo, y los vasos sanguíneos de osteonas adyacentes realizan comunicaciones laterales por conductos que se denominan conductos de Volkman. Un conjunto de sistemas de Havers forma un sistema Haversiano, y son las unidades principales del hueso. La disposición de

los sistemas de Havers es uno de los motivos por los que la penetración del antibiótico dentro del tejido óseo es difícil (8).

- **Resistencia y dureza**: el hueso presenta alta resistencia gracias al calcio y fósforo que forman la parte principal de su matriz extracelular y del soporte estructural básico del cuerpo humano.

A pesar de las propiedades del tejido óseo, la penetración del antibiótico es dificultosa debido a:

- **Vascularización**: aunque el hueso posee una alta red vascular, la velocidad del flujo sanguíneo es mucho más lenta que en otros tejidos, limitando la llegada y disponibilidad del antibiótico. Esto puede observarse en antibióticos con poca penetración tisular, como la vancomicina (12).
- **pH y carga eléctrica**: el pH del hueso es ligeramente alcalino con carga eléctrica negativa en la superficie, por lo que supone una barrera para la penetración de antibióticos con carga negativa. En un medio alcalino las quinolonas tienen carga negativa (13).
- **Barrera física**: la matriz extracelular sólida del hueso está altamente mineralizada por lo que dificulta la difusión del antibiótico. Por ejemplo, la vancomicina es un antibiótico con una estructura molecular muy grande que, aunque útil para el tratamiento de las infecciones por Gram +, no llega con facilidad a la matriz ósea.
- **Actividad celular**: los osteoblastos y osteoclastos activos secretan sustancias que pueden disminuir la penetración del antibiótico dentro del hueso.
- **Secuestro óseo**: debido a la necrosis del hueso, en las infecciones osteoarticulares se forma una zona de tejido óseo muerto que perpetúa la infección y dificulta la entrada del antibiótico (14,15).

El hueso necrótico es una de las principales causas que dificultan la erradicación de la infección osteoarticular. La afectación del periostio disminuye la irrigación ósea, produciendo isquemia y necrosis del hueso. Debido a las adhesinas y las bacterias, se produce la formación de biofilm que es la principal causa de perpetuación de las infecciones crónicas. Las bacterias estacionarias acaban produciendo trombosis e isquemia ósea. Esto lleva a la activación de los osteoclastos con osteopenia secundaria, mientras que la activación osteoblástica lleva a la formación de hueso nuevo (también llamado involucro). Finalmente, se produce la cloaca, cuando el involucro acaba fistulizando con la consecuente salida de material purulento. En ocasiones es difícil realizar un correcto desbridamiento óseo y frecuentemente queda un defecto óseo, de ahí la importancia de poseer sistemas que permitan restaurar dicho defecto óseo y que permitan la liberación local de antibiótico (16,17).

1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA Y MORBIMORTALIDAD DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES

A pesar de los avances en prevención y control en la cirugía para evitar la infección, la infección quirúrgica sigue siendo una complicación catastrófica no resuelta. La mayoría de las infecciones osteoarticulares precoces son consecuencia de una contaminación intraoperatoria (18,19). La prótesis total de rodilla (PTR) tiene una tasa de infección profunda que oscila del 0,86% hasta el 2,5% (20). Se estima que en 2030, de mantenerse dichas cifras, la tasa de infección tras PTR será de entre 40.000 y 80.000 pacientes por año (21).

Los motivos principales del aumento de incidencia son la longevidad de la población, el aumento de prótesis implantadas y la resistencia a antibióticos que presentan ciertos microorganismos, como el *Staphylococcus aureus*. La bacteriemia es tanto causa como consecuencia de la propia infección osteoarticular. Cabe destacar además que existe un aumento de las revisiones de prótesis, de hasta un 35% en la última década en Estados Unidos. Esto va

asociado a un aumento, de hasta 3 veces, de la probabilidad de sufrir infección de prótesis en una cirugía de revisión comparado con la cirugía primaria de prótesis de rodilla (22–24).

Entre las estrategias principales de prevención de infección se encuentra la profilaxis antimicrobiana sistémica y local (25). Esta estrategia lleva aplicándose desde 1960 y sigue recomendándose en las guías clínicas actuales, empleándose antibióticos como la cefazolina, cuando se realiza una intervención quirúrgica. Sin embargo, a pesar de estas medidas antibióticas sistémicas y locales enfocadas a reducir la tasa de infección, la incidencia de infección sigue siendo elevada (26).

El riesgo asociado de complicaciones y riesgo de fracaso aumenta en estos pacientes, especialmente cuando la causa es séptica (27). Se ha estimado que las infecciones de PTR tras recibir un recambio en dos tiempos presentan una mortalidad de un 4,3% y a los 5 años de un 21,6% (28). En el caso del desbridamiento, antibiótico, irrigación y retención del polietileno (DAIR) la mortalidad varía entre un 2-7% (29,30), del recambio en un tiempo varía entre un 4,4-11,4% (31,32) y del recambio en dos tiempos varía entre un 3-25,7% (27,31).

Con respecto a la osteomielitis, los pacientes con osteomielitis crónica presentan una mayor mortalidad con una incidencia de 2,29/10.000 por habitante, y especialmente en pacientes mayores de 85 años (33). En el caso de la artritis séptica, los pacientes geriátricos tienen una mayor mortalidad, incrementándose un 1,5% especialmente en el caso de pacientes mayores de 85 años (34).

1.1.4 IMPACTO ACTUAL DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES

Las infecciones osteoarticulares suponen un gasto económico y de recursos hospitalarios muy importante, debido a la complejidad de realizar el diagnóstico y la dificultad de erradicación, requiriendo de más cirugías, material específico para cubrir los defectos óseos que deja la infección, mayor estancia hospitalaria

y tratamiento antibiótico prolongado (35). Según el registro de Estados Unidos, la estancia media hospitalaria para una revisión de infección de prótesis de rodilla es de 7,5 días, con un coste aproximado de 25.692 \$ (36). En el registro australiano el coste aproximado anual de las revisiones de PTR alcanza los 566 millones de dólares (37). Los costes asociados al tratamiento de la osteomielitis han excedido los 1,62 billones de dólares en 2020 (36) con un coste medio aproximado por paciente que oscila entre 17.000-150.000 \$ según el Consenso de Infecciones Musculoesqueléticas de 2018 (38). Además, el coste de la infección de PTR causado por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se ha incrementado un 60% comparado al sensible a meticilina (35). Por lo que es importante disponer de estrategias profilácticas y terapéuticas frente a las infecciones osteoarticulares.

1.1.5 FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN OSTEOARTICULAR

Entre los factores de riesgo asociados a la infección osteoarticular se encuentran las cirugías previas en la localización afecta, obesidad, insuficiencia renal crónica, tabaquismo, malnutrición, artropatía inflamatoria, inmunodeficiencia grave, y diabetes mellitus. La diabetes mellitus aumenta el riesgo en hasta 3,23 veces de sufrir infección, la obesidad, aumenta el riesgo en 1,5 veces de sufrir infección profunda (39,40) y de 2,2 veces de padecer infecciones superficiales (41). Conocer los factores de riesgo es de vital importancia para aumentar las estrategias de prevención de infección y de aplicación de dispositivos con liberación de antibiótico local para reducir la incidencia de infección, sea mediante tornillos impregnados de antibiótico con liberación local o bien implantes biológicos custom-made (42).

1.1.6 TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE INFECCIONES OSTEOARTICULARES

Existen múltiples sistemas de prevención y tratamiento de la infección osteoarticular mediante liberación de antibiótico local, siendo las infecciones de prótesis, las asociadas al tratamiento de fracturas, así como las osteomielitis, las que mayor emplean esta forma de tratamiento local. Entre las diferentes infecciones osteoarticulares que se engloban dentro de este gran grupo tenemos:

1.1.6.1 ARTRITIS SÉPTICA NATIVA

La artritis séptica es una infección de la articulación nativa. La localización más frecuente es la rodilla (50%), seguida de la cadera (25%) y el hombro (15%) (43). La vía de infección más frecuente es la hematógena. La importancia de su diagnóstico precoz radica en la alta capacidad de destrucción del cartílago articular que poseen los microorganismos. Esto es debido a la osteólisis subcondral que secundariamente predispone a la artrosis (44). El tratamiento de las artritis sépticas requiere de antibioterapia intravenosa de larga duración. Sin embargo, debido a la baja penetrancia articular del antibiótico, se requiere desbridamientos seriados en muchas ocasiones para conseguir resolver la infección. A pesar de un correcto tratamiento, un 25-50% de los pacientes tendrán algún tipo de secuelas, entre las que se encuentran rigidez y artrosis precoz, requiriendo de cirugías posteriores para solucionar dicha complicación (45).

1.1.6.2 INFECCIONES ASOCIADAS A LAS FRACTURAS

Las infecciones asociadas a las fracturas engloban dos subgrupos: las infecciones de las fracturas abiertas y las infecciones de material de osteosíntesis (46). La incidencia es variable, yendo desde un 1% hasta un 30%. Entre los principales factores de riesgo se encuentra la afectación de partes blandas, las fracturas abiertas (mayor riesgo cuanto mayor sea el grado de fractura abierta según Gustilo y Anderson), la localización en la tibia, la lesión vascular asociada y las

fracturas por alta energía (47,48). La infección asociada a fractura se da esencialmente por vía exógena.

Con respecto a las infecciones de material de osteosíntesis cabe destacar la capacidad de los microorganismos de adherirse al propio material de osteosíntesis (clavo intramedular, placas, tornillos, etc.), produciendo el inicio de la infección. Su tratamiento y las secuelas postoperatorias varían de la fase en la que se encuentre la infección y el defecto óseo residual. En muchas ocasiones, dependerá de si la fractura está curada, y si el implante es estable, para tomar una decisión con respecto al tratamiento(49). Debido a la afectación de partes blandas y la facilidad de colonización por patógenos habituales de los microorganismos, es de utilidad desarrollar estrategias de sistemas de liberación antibiótico *in situ*, como tornillos y placas para el tratamiento de estas fracturas, para disminuir la incidencia de estas complicaciones.

1.1.6.3 OSTEOMIELITIS

La osteomielitis es la infección del tejido óseo, y se clasifica dependiendo del inicio de la clínica en aguda, subaguda y crónica (50). La osteomielitis crónica tiene presencia de biofilm maduro y además tiene hueso necrótico asociado (también llamado secuestro). Los problemas esenciales de las osteomielitis crónicas es el defecto óseo residual consecuente de la reabsorción ósea y tras el tratamiento quirúrgico y la presencia de hueso necrótico (17).

En las osteomielitis es de vital importancia el estado local de las partes blandas y las comorbilidades sistémicas asociadas. En estos pacientes es esencial una estrategia más agresiva dado que las probabilidades de curación disminuyen, a pesar de los dispositivos con liberación de antibiótico local existentes hoy en día (51,52).

1.1.6.4 PSEUDOARTROSIS SÉPTICA

Definimos como pseudoartrosis cuando no existe una unión de la fractura después de 9 meses de evolución, o bien si tras 3 meses se asocia dolor en el foco de fractura o pérdida de funcionalidad. A parte del retraso de consolidación existe también infección asociada (53). La tasa de pseudoartrosis séptica supone hasta el 20% del total de las pseudoartrosis, subestimándose en muchas ocasiones la infección subyacente (54). La localización más frecuente es la tibia, con una incidencia de 55 por cada 1000 pseudoartrosis (55) y presenta un pico de edad de 25-44 años. Para su correcto tratamiento se requiere de desbridamientos radicales de los tejidos óseos, junto con una correcta estabilización del defecto óseo resultante, un tratamiento antibiótico intravenoso, una correcta cobertura cutánea y posteriormente la reconstrucción del defecto óseo. Actualmente se emplean fijadores externos y otras estrategias terapéuticas para tratar esta compleja enfermedad, pero no están exentas de alta tasa de complicaciones y morbilidad elevada (54).

1.1.6.5 INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR (IPA)

La infección de prótesis supone una complicación grave y la más temida en las cirugías de reemplazo articular. Se estima que la IPA es la complicación más frecuente en las prótesis de rodilla en los 2 primeros años, con una incidencia de aproximadamente un 10-22% (56). Esta probabilidad se dispara en las cirugías de revisión de prótesis, llegando hasta un 10% en las prótesis de cadera que se recambian (57,58).

Existen diferentes vías de infección de prótesis, entre las que se incluye la inoculación directa, la transmisión por continuidad y la siembra hematógena. La inoculación directa durante la intervención quirúrgica es una causa a tener en cuenta, a pesar de las medidas estrictas de esterilidad y de asepsia. La inoculación

por siembra hematógena es la causa principal de las infecciones hematógenas agudas, y se puede dar incluso años después de la cirugía.

Normalmente los microorganismos asociados a las infecciones hematógenas poseen alta virulencia y en pocas ocasiones son polimicrobianas (59). El foco principal de las infecciones hematógenas suele ser el sistema cardiovascular (30%) seguido de las partes blandas y la piel (22%) y la cavidad oral (22%) (60).

Una de las clasificaciones más empleadas de las infecciones de prótesis es la de Tsukayama, que las divide en:

- **Infección postquirúrgica precoz**: supone aproximadamente el 35% de todas las IPA. Se manifiesta en el primer mes tras la cirugía, pudiendo dar una clínica muy llamativa, con fiebre y dolor articular, o bien insidiosa, con drenaje constante de la herida quirúrgica. Se asocia a infección intraoperatoria, es por ello, que las estrategias de prevención de la infección del sitio quirúrgico son esenciales (18).
- **Infección crónica tardía**: supone aproximadamente el 50% del total de las IPA. Se da a partir del segundo mes de la cirugía, con clínica insidiosa, siendo difícil de diagnosticar. El principal problema es el defecto óseo resultante junto con la infección.
- **Infección hematógena aguda**: está asociada a bacteriemia con foco infeccioso. Supone aproximadamente el 10% de las IPA (56). En este caso, la baja penetración del antibiótico sistémico donde está implantada la prótesis supone el mayor desafío.
- **Cultivos intraoperatorios positivos**: un 5% del total de las IPA se diagnostican con cultivos positivos (61).

Las opciones de tratamiento en las IPA son variables dependiendo de la evolución, la clínica y el tiempo. En las formas agudas el tratamiento consiste en un desbridamiento, retención de los componentes implantados y lavado

exhaustivo (llamado DAIR), y en las formas crónicas o tardías, se puede realizar un recambio en un tiempo (en un mismo acto quirúrgico se retira la prótesis y se coloca una nueva) o bien en dos tiempos (se retira la prótesis, se mantiene un tiempo el “espacio” sin la prótesis y posteriormente se implanta una nueva prótesis) (62).

En líneas generales, el DAIR se emplea en los primeros 3 meses tras la implantación de la prótesis o bien cuando los síntomas de la infección protésica aguda son menores a 4 semanas, dado que se ha observado que a partir de este tiempo la tasa de fracaso del DAIR es extremadamente elevada. El éxito del DAIR va en un rango desde un 20% hasta un 82% (29). Esta variabilidad supone la necesidad de desarrollar dispositivos que permitan aumentar de forma local la liberación de antibiótico mientras se resuelve el proceso infeccioso (30,63).

En el caso de que no se pueda realizar el DAIR se requerirá realizar una cirugía en un tiempo o en dos tiempos (64). En el recambio en un tiempo, las tasas de éxito varían entre un 75% y 95% dependiendo del estudio consultado (65,66). La tasa de fracaso se asocia a infección polimicrobiana, a infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y por el *Staphylococcus epidermidis* (67). En el caso de recambio en dos tiempos la tasa de éxito del recambio en dos tiempos varía entre un 70-100% (32,67,68).

Como en otras infecciones osteoarticulares, la infección crónica puede producir pérdida de stock óseo o defectos óseos que deben ser reconstituidos. A pesar de realizar un correcto tratamiento de las infecciones de prótesis, las tasas de reinfección suelen ser elevadas, llegando en algunas series hasta un 40% (38).

1.1.7 MICROORGANISMOS CAUSALES

Entre los microorganismos causales que producen infección osteoarticular más frecuentemente se encuentran los del género *Staphylococcus*, que son el agente causal del 60% de las infecciones osteoarticulares. Los gérmenes más

frecuentemente encontrados dentro de los *Staphylococcus* son los coagulasa negativo (40%), seguidos de cerca por el *Staphylococcus aureus* (25%). Les siguen los *Enterococcus*, *Streptococcus* y los bacilos gram negativos, que suponen un 10%. Menos frecuentes son las infecciones osteoarticulares causadas por hongos y micobacterias. (69,70). Debido a los microorganismos existentes y a la limitación de antibióticos aplicables en un espaciador, son necesarios otros materiales y sistemas que permitan mantener el espacio articular mediante el uso de antibióticos dirigidos a los patógenos (71).

1.1.8 EL BIOFILM

La principal dificultad para erradicar las infecciones osteoarticulares reside en el biofilm, presente en las fases subagudas y crónicas (11). El biofilm está compuesto por microorganismos, que crecen gracias a una matriz extracelular de polisacáridos (que supone aproximadamente el 90% del biofilm) y que se adhiere a superficies vivas o inertes (72). El biofilm se adhiere con facilidad al material inerte, como por ejemplo prótesis, material de osteosíntesis o también al hueso muerto (73). Este proceso puede desarrollarse y completarse en 18 horas. El tiempo de evolución de la infección puede determinar la maduración del biofilm, estando muy desarrollado en enfermedades crónicas (74).

El biofilm posee diferentes etapas de crecimiento, que se subdividen esencialmente en 4: la adherencia primaria, la formación temprana del biofilm, la etapa de maduración y la dispersión. Dentro de la estructura de biofilm existen dos tipos de bacterias: las planctónicas o en crecimiento activo, y las estacionarias, sin crecimiento y en un estado de reposo (11,75).

El biofilm es una barrera contra los antibióticos, por lo que se requieren mayores dosis para ser efectivos contra la infección (72). La tolerancia antibiótica sucede porque el antibiótico tiene mayor actividad sobre las bacterias en estado planctónico, y una actividad baja o incluso nula en las bacterias en estado

estacionario. Parte de la tolerancia a los antibióticos, con la posterior resistencia secundaria, es consecuencia del intercambio del material genético entre las bacterias (74). Existe una capacidad de siembra a distancia de las bacterias del biofilm, con expansión y cronicidad dentro del mismo, ya que las bacterias poseen enzimas proteolíticas en su interior que degradan al antibiótico. Se ha demostrado que se requiere incluso concentraciones 100 veces mayores de antibiótico para que tenga actividad antimicrobiana contra el biofilm (76). Para erradicar el biofilm, se requieren de antibióticos específicos contra el biofilm, como son la rifampicina (77) y las quinolonas, especialmente el ciprofloxacino (78). Sin embargo, el proceso madurativo del biofilm depende del factor tiempo, por ello la prevención de su formación es clave durante sus primeros días mediante estrategias de profilaxis antibiótica local dirigidas (79).

1.1.9 DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES ARTICULARES

Las infecciones osteoarticulares suponen un reto diagnóstico para el traumatólogo, debido a que en muchas ocasiones suelen ser infecciones causadas por gérmenes de baja virulencia como el *Staphylococcus epidermidis* o el *Cutibacterium acnes* (80). Hay ciertos puntos en común en el diagnóstico de la infección, como la necesidad de tomar como mínimo 4-5 muestras del tejido intraoperatorio para realizar un correcto diagnóstico. Cuando exista material de osteosíntesis o bien una prótesis, la sonicación ayudará a aumentar la rentabilidad diagnóstica (11).

Con respecto a los criterios diagnósticos dependiendo del tipo de infección osteoarticular tenemos:

- **Artritis séptica**: La presencia de más de 20.000 leucocitos/ μ L es sugestivo de infección. La probabilidad de infección aumentará en más de un 70% si hay más de 50.000 leucocitos/ μ L en el líquido (44).

- **Osteomielitis**: El diagnóstico de las osteomielitis crónicas es complejo. Se requiere combinar los hallazgos de la clínica, como los radiológicos, histológicos y de laboratorio. La fistula es un hallazgo frecuente y recurrente en las osteomielitis crónicas (53).
- **Infección asociada al tratamiento de las fracturas**: Entre los criterios mayores se encuentra la presencia de trayecto fistuloso, dehiscencia de herida quirúrgica, exposición de material de osteosíntesis o secreción purulenta (81).
- **Pseudoartrosis séptica**: Se requiere, por una parte más de 9 meses de ausencia de consolidación para definirlo como pseudoartrosis, y posteriormente, uno de los criterios mayores que son trayecto fistuloso o exposición de la fractura/material de osteosíntesis, drenaje purulento de la herida o presencia de pus durante la cirugía, aislamiento de un microorganismo en dos o más muestras de los tejidos profundos, o presencia de microorganismos en tejido profundo (54).
- **Infecciones de prótesis articulares**: El diagnóstico de la infección crónica se vuelve un reto debido a la dificultad de diferenciarlo de un aflojamiento aséptico. Tendremos en cuenta si el paciente cumple uno de los criterios mayores, como la presencia de fistula o drenaje purulento (82). El cultivo solo detecta las bacterias planctónicas, a diferencia de lo que ocurre en el biofilm, donde la mayoría de las bacterias se encuentran en estado estacionario. Cuando se realice una artrocentesis en una infección crónica un recuento de más de 1.000 leucocitos/ μ L nos darán una probabilidad baja de tener IPA crónica, a diferencia del recuento de más de 3.000 leucocitos/ μ L, en el cual aumentarán las probabilidades notablemente (56).

1.1.10 TRATAMIENTO

1.1.10.1 ANTIBIOTERAPIA DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES

A la problemática previamente descrita se le añade el limitado número de antibióticos que se pueden emplear. En muchas ocasiones la antibioterapia requiere de un tratamiento mínimo de 6 semanas con una duración variable, dependiendo del germen, la infección osteoarticular y las resistencias (68). El éxito del tratamiento antibiótico frente a una infección osteoarticular se concreta por la actividad antimicrobiana y la capacidad de penetración dentro del hueso, siendo fundamental para que las concentraciones de antibiótico tengan acción frente a los patógenos y, a ser posible, frente al biofilm presente (49). Para ello, se emplea la combinación de antibioterapia sistémica junto con tratamiento quirúrgico. La antibioterapia no se emplea únicamente como tratamiento de las infecciones osteoarticulares, sino también como prevención de la infección quirúrgica (83).

Un correcto tratamiento sistémico dirigido a la erradicación de la infección osteoarticular debe de tener buena penetración tisular, alta ratio de concentraciones locales, baja tasa de resistencias, actividad antibiofilm y buena tolerancia (15).

Debido a la dificultad del antibiótico para penetrar en el tejido óseo, el aumento de resistencias bacterianas a los tratamientos antibióticos, la poca efectividad de la mayoría de los antibióticos frente a bacterias planctónicas/biofilm y que además el antibiótico sea bien tolerado, el tratamiento de las infecciones osteoarticulares es complejo. De hecho, se requiere de altas dosis de antibiótico de forma local para permitir que las concentraciones *in situ* sean terapéuticas.

Entre los antibióticos locales que se emplean con más frecuencia se encuentran:

- **Sulfato de gentamicina**: es un aminoglucósido con actividad bactericida. Principalmente tiene actividad frente a bacterias gram + y gram - (*Staphylococcus spec*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Proteus*) (7).
- **Sulfato de tobramicina**: es un aminoglucósido con actividad bactericida. Tiene actividad frente a bacterias gram + y gram - (tiene actividad frente a las mismas bacterias que la gentamicina) (12).
- **Hidrocloruro de clindamicina**: es una lincosamida con actividad bacterostática y bactericida. Tiene actividad frente a bacterias gram + y gram - (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, y *anaerobios*) (84).
- **Hidrocloruro de vancomicina**: es un glucopéptido bactericida. Tiene actividad frente a bacterias gram + (*Staphylococcus spec*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina) (12).
- **Eritromicina**: es de la familia de los macrólidos con efecto bacteriostático. Tiene actividad frente a bacterias gram + (*Streptococcus* y *Staphylococcus*) y anaerobios (*Corynebacterium*) (85).
- **Sulfato de colistina**: es de la familia de los polipéptidos, es bactericida, al cambiar la permeabilidad citoplasmática de las membranas bacterianas y es activo frente a bacterias gram - (como por ejemplo *Pseudomonas*) (86).

Existen antibióticos que son empleados de forma intravenosa para la infección osteoarticular pero no pueden emplearse de forma local, como la amoxicilina-ácido clavulánico. Ésta se emplea en múltiples ocasiones como tratamiento de la espondilodiscitis, osteomielitis o artritis en niños, en aquellos microorganismos sensibles, pudiendo secuenciarse posteriormente a tratamiento oral (87), e incluso como línea inicial de tratamiento en el caso de artritis séptica del adulto (88). Sin embargo, no puede emplearse de forma local (89), debido a que es un antibiótico termolábil (16).

1.1.10.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LAS INFECCIONES OSTEOARTICULARES

El tratamiento de todas las infecciones osteoarticulares tiene en común que existe déficit óseo debido a la necrosis del tejido, a la necesidad de eliminar el tejido muerto para la erradicación de la infección y también a la pérdida de stock óseo causado por la propia cirugía, requiriendo en ocasiones de múltiples intervenciones para suplir el déficit óseo. Cuando existe carencia ósea, el traumatólogo tiene grandes limitaciones a la hora de aplicar las distintas armas terapéuticas, dificultando en muchas ocasiones el tratamiento. Entre los problemas existentes se encuentra el tamaño de hueso a suplir, la ausencia de consolidación y la tasa de infecciones (49). En general, existen diferentes opciones para intentar erradicar la infección y solventar el déficit de stock óseo, que se irán desarrollando en los siguientes apartados.

TRATAMIENTO “*IN SITU*” DE LA INFECCIÓN

- SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICO

Con respecto a los sistemas de liberación de antibiótico, existen diferentes opciones para inhibir el crecimiento de microorganismos localmente. El sistema ideal de liberación de antibiótico no ha sido aún descrito, dado que existen múltiples factores a tener en cuenta en la liberación del medicamento, entre los que se encuentra la tasa de elución del antibiótico. Los materiales empleados para la liberación local del antibiótico deben de ser fáciles de retirar y manipulables, además de no producir toxicidad ni reacción inmunológica (85).

- SUPERFICIES Y RECUBRIMIENTOS

RECUBRIMIENTO DE PRÓTESIS: MATERIALES

La plata es un recubrimiento prometedor debido a su gran espectro frente a bacterias planctónicas, tanto gram + como gram - (90). La capacidad

antibacteriana de la plata dependerá de la cantidad de cationes de plata que interfieran con la membrana de las bacterias. Los cationes de plata en un medio acuoso contribuyen a formar radicales de oxígeno que son dañinos para las bacterias. La mezcla de hidroxiapatita y plata ha demostrado inhibir la adhesión de bacterias como *Pseudomona aeruginosa* o *Staphylococcus epidermidis* (79,91). Estos recubrimientos se han estudiado en pacientes con megaprótesis y se han comparado con recubrimientos únicamente de titanio, observándose menor tasa de infección en las prótesis en las que había un recubrimiento conjunto con plata (17% *versus* 9%) (92). A pesar de estos resultados prometedores, se desconocen los efectos de estos recubrimientos frente al biofilm, la cinética de liberación, la posible toxicidad sobre las células del hueso o las reacciones alérgicas/efectos secundarios sobre el paciente (93).

RECUBRIMIENTO CON HIDROGEL

El recubrimiento antibacteriano defensivo (del inglés defensive antibacterial coating [DAC]), es un recubrimiento altamente reabsorbible de hidrogel que se compone de ácido hialurónico y de poli(D,L-lactida), y que está específicamente diseñado para proteger los biomateriales que se implantan en los pacientes. El ácido hialurónico disminuye la formación del biofilm en superficies con riesgo de infección, que están expuestas a la contaminación bacteriana. El DAC se coloca encima de las superficies de las prótesis para reducir la adherencia bacteriana hasta un 86,8% (94). Se ha demostrado que el DAC puede tener actividad similar o incluso superior a la vancomicina y la gentamicina. Además, no se han encontrado efectos secundarios locales ni sistémicos relacionados con el DAC (95). A pesar de los resultados prometedores, los efectos del DAC se producen a corto plazo, por lo que la protección no cubriría las infecciones hematógenas (96).

- POLIMETILMETACRILATO O CEMENTO ÓSEO

Entre las estrategias que se han desarrollado para tratar la infección osteoarticular tanto de forma local como sistémica, se encuentran el polimetilmetacrilato (PMMA) o cemento óseo. Desde la década de los 80 del siglo pasado, se utilizaba para crear cadenas de rosario de PMMA con gentamicina (llamadas perlas de gentamicina) (7). Actualmente el cemento óseo se utiliza con gentamicina u otros antibióticos en polvo para fijar las prótesis, rellenar los defectos óseos o crear espaciadores para tratar las infecciones protésicas con antibiótico integrado (97).

El PMMA es el polímero termoplástico más empleado en traumatología. Su uso se inició en la década de 1940, cuando fue desarrollado por primera vez por Sir Walter Watson y Sir Alan Thomas, dos químicos británicos (98). En 1964, Sir John Charnley publicó su primer estudio sobre prótesis cementadas (99) tras emplear el cemento para la fijación de prótesis articulares y para el relleno temporal de defectos óseos (100).

En el pasado se utilizó el cemento con las bolas de gentamicina, que se añadían al defecto que presentaba el paciente, manteniéndose en muchas ocasiones en su interior hasta la retirada posterior del mismo. Esta técnica está actualmente en desuso. Aunque tiene una mayor superficie para la difusión de la gentamicina no aporta ningún tipo de soporte mecánico (101). En las prótesis primarias de rodilla, el uso de antibiótico y cemento ha demostrado reducir hasta un 81% el riesgo relativo de sufrir infección (102). Así mismo, en las revisiones de prótesis, el cemento con antibiótico es un tratamiento superior respecto al cemento sin antibiótico (103). El PMMA se emplea además para crear los espaciadores, muy utilizados en los recambios en dos tiempos y para el tratamiento de las infecciones no protésicas, bien en la técnica de Masquelet, o en el relleno de defectos óseos en osteomielitis. También se puede utilizar para recubrir los clavos intramedulares, dado que permite añadir antibiótico en toda la longitud del

material para así evitar la adherencia de las bacterias y la formación de biofilm (104).

El PMMA tiene propiedades óptimas para su utilización, dado que es rígido a temperatura ambiente, pudiendo ocupar el espacio o ser un buen sostén para el tejido óseo, si bien es cierto que a altas temperaturas es más frágil mientras se produce la polimerización. La composición del cemento óseo acrílico difiere dependiendo de la casa comercial, pero en general suele tener dos componentes principales: el monómero o líquido y el polímero o polvo (105). El componente líquido se compone de metilmetacrilato (MMA), que es el componente principal, dimetil-para-toluidina que es el activador principal del cemento, la hidroquinona que previene la polimerización prematura y el agente colorante que normalmente suele ser la clorofilina (106). El componente en polvo (107) se compone de las esferas de polímeros de PMMA (108), el peróxido de benzoilo que es el iniciador de la polimerización radical, las sustancias radiopacas y el antibiótico.

En líneas generales, la proporción de los componentes polvo-líquido suele ser 2:1. En lo que respecta a las fases de polimerización se distinguen 4 etapas principales. La primera fase es el mezclado, donde se produce la polimerización y el cemento está completamente líquido y con una viscosidad muy baja (109). El cemento puede mezclarse a mano, o bien con la ayuda de diferentes sistemas con vacío o molinillo (110). La segunda fase es la espera, en la que empieza a “hincharse” el cemento mientras se polimeriza, se incrementa la viscosidad y es algo menos manejable. La tercera fase es la del trabajo y cuando se aplica el cemento al paciente, con una movilidad menor, aumento de viscosidad e incremento notable de temperatura. Por último, está la fase de endurecimiento, en la que acaba la polimerización y donde no es posible manipular el cemento, con el pico máximo de temperatura (111).

Los cementos óseos se clasifican en cementos de baja, media y alta viscosidad, siendo diferentes las propiedades de cada uno de ellos (105,108,112). El cemento de baja viscosidad contiene un líquido que presenta una polimerización más lenta en la fase inicial. El cemento de viscosidad media posee una fase de mezclado menor que el cemento de baja viscosidad. Por último, el cemento de alta viscosidad presenta una fase de mezclado breve porque rápidamente pierde su adherencia.

Al cemento se le suelen añadir altas cantidades de antibiótico cuando se desea un mayor efecto terapéutico local, pasando de dosis profilácticas de 1 o 1,5 g de antibiótico por 40 g de cemento, a dosis terapéuticas de hasta 6-8 g de antibiótico por 40 g de cemento (113). En líneas generales se emplean dosis bajas de antibiótico (<2,5%) como profilaxis, dosis medias en casos de revisión de prótesis séptica o aséptica (7%) y altas dosis en el caso de espaciadores (10%) (114). Sin embargo, es importante no superar el 10% de antibiótico, exceptuando en los espaciadores, dado que afecta a las propiedades mecánicas del PMMA (115).

La liberación del antibiótico del propio cemento depende de la porosidad y de la superficie total del cemento, ya que el antibiótico solamente se libera de la superficie de la estructura reconstruida con cemento. También dependerá de las características hidrofílicas que posean los antibióticos, ya que la elución de estos depende de sus propiedades fisicoquímicas. Las características del polvo y del monómero líquido, que forman parte de la composición del cemento, afectan a la liberación de antibiótico. La adición del antibiótico en forma líquida causa una pérdida importante de la resistencia del PMMA comparado con la adición de antibióticos en polvo (116). Se ha visto que las propiedades mecánicas y de elución de los cementos ya preformados comercialmente pueden ser superiores a las mezclas hechas a mano (115,117). Además, los cementos que poseen alta viscosidad con copolímeros de MMA poseen mejores perfiles de elución de los antibióticos (118).

Entre los factores que influyen en las propiedades del PMMA se encuentra la humedad, la ratio líquido-polvo, la temperatura y la forma de mezclar el cemento. La ratio líquido-polvo debe mantenerse constante para no influir en la viscosidad. La polimerización depende de la temperatura. Además, conforme aumenta la viscosidad del cemento aumenta de forma progresiva la temperatura. Cuando acaba la polimerización, la temperatura que alcanza el cemento es la máxima. El pico máximo de temperatura está influido por el componente líquido donde se encuentra el MMA (119). Por último, la forma de mezclar el cemento influye en sus propiedades, sea con molinillo o de forma manual. Se ha comprobado que si la mezcla se realiza con vacío se alarga la fase de espera, pero si se mezcla el cemento con movimientos rápidos se puede aplicar antes (120).

La utilización del PMMA en el tratamiento local de la infección posee diferentes limitaciones. Una de ellas es debida a las altas temperaturas que alcanza (130 °C) durante la fase de polimerización, por lo que no pueden emplearse antibióticos termosensibles, como la amoxicilina-clavulánico (89), empleándose en la mayoría de las ocasiones los aminoglucósidos (gentamicina) y los glucopéptidos (vancomicina), al ser muchos de ellos termoestables (121). Además, existe el riesgo de que se produzca necrosis térmica en el lugar del hueso donde se aplica el cemento. Por otra parte, la liberación de los antibióticos más empleados (vancomicina y gentamicina) con el PMMA es errática, realizándose por difusión, y observándose un pico inicial en las primeras 24-48 horas, que decae de forma brusca a partir del tercer día, hasta hacerse casi indetectable al quinto día (118). Cabe destacar además que hay un patrón errático de liberación del antibiótico, por lo cual no se puede predecir su elución (122).

La manipulación del cemento no es sencilla. Se precisa de una mezcla homogénea para que el antibiótico pueda liberarse de los poros y las grietas que se forman de la mezcla cemento-antibiótico. Requiere que la mezcla se manipule en su fase tardía de polimerización, y luego ha de fijarse al hueso, para impedir la

interdigitación excesiva de los polímeros. La fase de mezclado y el tipo de mecanismo empleado para realizar la mezcla influye en la liberación del antibiótico (116,118).

No todos los antibióticos pueden ser utilizados con el PMMA (123). El antibiótico que se emplee junto con el cemento no ha de producir efectos adversos o reacciones alérgicas, ser de amplio espectro, ser estable a altas temperaturas y soluble en agua (107), tener efecto bactericida local, liberación progresiva durante un periodo determinado de tiempo y que se encuentre disponible en forma de polvo (las formas líquidas reducen a la mitad la resistencia del cemento a la tracción y compresión (124).

Además de los antibióticos previamente mencionados que pueden mezclarse con el cemento se encuentran la cefuroxima, piperacilina-tazobactam y clindamicina. De estos antibióticos los que presentan mejor elución en el hueso son la clindamicina, vancomicina y tobramicina (12). La rifampicina y el metronidazol son antibióticos que no se pueden emplear con el cemento dado que actúan como radicales e interfieren en la polimerización (77). Es raro que existan efectos secundarios por su aplicación local, pero es importante monitorizar los niveles en sangre de vancomicina y gentamicina en pacientes con enfermedad renal para asegurar que no deterioren el filtrado glomerular (117). Entre otros efectos secundarios, se encuentra el embolismo pulmonar producido por rotura de pequeños trozos de cemento, necrosis térmica, reacciones alérgicas e incluso infarto de miocardio (125).

Las propiedades mecánicas *in vivo* del cemento son la elasticidad, viscosidad y la deformación plástica, que se mantienen correctamente bajo carga. En el paciente, el cemento actúa como un medio elástico, evitando así las concentraciones de estrés en el hueso (112). La resistencia a la compresión del cemento es mayor a la resistencia de flexión y aún mayor que la resistencia a la

tracción. Esta es una propiedad común de todos los polímeros, y es la propia tracción la que suele tener mayor riesgo de rotura.

Entre los factores que influyen en la fatiga del cemento se encuentra la esterilización con radiación gamma o beta, ya que disminuye el peso molecular del polímero, a diferencia del óxido de etileno, que no tiene influencia en el peso molecular (126). Otro factor que influye es la porosidad ya que es una de las causas de reducción de la fatiga. Los poros concentran el estrés en el material, produciéndose grietas en las zonas de fatiga, que al final llevan al fracaso del cemento. Los cementos mezclados a mano tienen menor aguante a la fatiga comparado con aquellos en los que se utilizó el mezclador de vacío. Por último, mencionar que una excesiva cantidad de antibiótico puede alterar la capacidad de fatiga del cemento, teniendo menor resistencia al estrés (127).

El cemento en muchas ocasiones va combinado con los espaciadores, que permiten mantener durante el tiempo deseado el defecto presente (128). Con respecto a los espaciadores existen dos tipos principales: los conformados y los preformados (129,130). En muchas ocasiones el traumatólogo debe crear un espaciador conformado dado que los preformados no son de utilidad o no se adaptan a las necesidades del paciente. Los espaciadores (tanto conformados como preformados) permiten la adicción de antibiótico, proporcionándoles actividad antimicrobiana *in situ*, a la vez que mantienen el espacio deseado por el cirujano. En la mayoría de las ocasiones se aconseja combinar dos o más antibióticos para que actúen sinérgicamente, añadiendo una alta cantidad de antibiótico de hasta el 20% de la masa total. (129).

Los espaciadores no están exentos de limitaciones y complicaciones ya que los espaciadores no siempre se adaptan de forma adecuada al defecto que se desea rellenar. Solo en algunos casos, los espaciadores permiten la carga parcial, por el aumento de la erosión con el hueso y la poca capacidad de resistencia de los

misimos a la carga axial, debiendo estar el paciente en descarga en la mayoría de las ocasiones (131). Esto supone que, además de las múltiples comorbilidades, presenten sarcopenia y por consiguiente mayores dificultades para deambular, a pesar de estar libres de enfermedad y de la rehabilitación a la que se someten. Entre las complicaciones del uso de los espaciadores cabe destacar el dolor, las luxaciones del espaciador e incluso su rotura. Finalmente, cabe destacar que si el espaciador se mantiene en el interior del paciente más de 6-8 semanas existe riesgo de que se comporte como un “cuerpo extraño” y que aumente la probabilidad de adhesión bacteriana (132).

- SUSTITUTOS ÓSEOS

Una opción cada vez más empleada son los sustitutos óseos. Entre las diferentes opciones se encuentran el sulfato cálcico, la hidroxiapatita, el fosfato tricálcico y el fosfato cálcico. Todos ellos tienen en común que son materiales osteoconductores y promueven la regeneración ósea (133). Tienen la ventaja de que no tienen potencial de transmisión de enfermedades, y además se disponen de forma ilimitada, a diferencia del injerto óseo. Sin embargo, uno de sus principales inconvenientes es que el antibiótico se libera de forma poco controlada y rápida. En muchas ocasiones se produce un drenaje seroso postoperatorio que, aun siendo normal y limitado, puede confundir al cirujano y enmascarar una infección mal tratada (134). Además no aportan soporte estructural al defecto óseo presente (133).

El sustituto óseo más empleado es el sulfato cálcico ($\text{CaSO}_4 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$). El sulfato cálcico es una cerámica biodegradable que fue introducida en 1892 por Dreesman *et al.* (135), y se le suele añadir gentamicina o vancomicina (136). Normalmente se emplean cantidades de 1 o 1,2 g de antibiótico por cada 25 g de sulfato cálcico. Con respecto al PMMA, posee como ventaja que no requiere de una nueva intervención quirúrgica para su retirada y que pueden añadirse múltiples antibióticos debido a que no presenta un aumento de la temperatura. Además, no

es inmunogénico y es biocompatible, aunque en ocasiones produce reacciones inflamatorias no infecciosas (137).

El sulfato cálcico es empleado tanto en presencia de infección osteoarticular como en pseudoartrosis y en pérdida de stock óseo o en técnicas como el DAPRI, técnica similar al DAIR pero que incluye las perlas de antibiótico en el procedimiento quirúrgico (138).

- BIOVIDRIO

Cada vez más se emplean biomateriales en los que no hay adición de antibiótico, como es el biovidrio. El biovidrio fue descubierto por Larry Hench en 1969, tras observar las uniones químicas del material con el hueso del paciente (139). Se compone por un 53% por dióxido de silicio, un 23% de óxido de sodio, un 20% de óxido de calcio y un 4% de anhídrido fosfórico (140). El biovidrio es una sustancia que es osteoconductora y osteoestimuladora. El papel osteoconductor se presenta gracias a dar soporte a los osteoblastos, creciendo así el hueso sobre el biovidrio y estimulando el reclutamiento de las células osteogénicas (141). La bioactividad se debe en parte por la formación de una capa de hidroxiapatita, facilitando la integración del biovidrio en el tejido óseo. Tiene un perfil de remodelación y resorción ósea, proporcionando un excelente soporte mecánico temporal, hasta que posteriormente se reabsorbe del hueso con el paso de los meses y finalmente se sustituye por tejido óseo *de novo*. Impide el crecimiento de los microorganismos gracias a la liberación del sodio de la superficie del biovidrio, aumentando el pH al formar un ambiente alcalino al formar NaOH, y aumentando la presión osmótica, produciendo un medio hostil para los microorganismos (142).

Se puede emplear frente a múltiples microorganismos y no precisa la adición de antibiótico para realizar su acción antimicrobiana (143). Además, a diferencia del sulfato cálcico, el biovidrio se mantiene dentro del hueso, proporcionando un

soporte estructural, que puede durar hasta dos años, pudiéndose ver en las radiografías (140). Como inconveniente produce drenaje seroso, aunque en menor cantidad que el sulfato cálcico. Su alto coste económico lo hace de difícil acceso para muchos traumatólogos (136).

TÉCNICAS BIOLÓGICAS PARA RECONSTRUCCIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS

- REEMPLAZO DE HUESO

Las técnicas de reemplazo de hueso permiten rellenar el defecto bien sea con tejido óseo del paciente o bien con alternativas exógenas.

AUTOINJERTO Y ALOINJERTO

Los autoinjertos y aloinjerto son una de las opciones más empleadas por el traumatólogo para reemplazar el hueso o recubrir defectos. Es un trasplante de tejido óseo que puede ser propio (autoinjerto) o bien de otro humano (aloinjerto).

El aloinjerto puede proceder de donante cadáver o bien de bancos de tejidos. Requiere un exhaustivo control para prevenir la transmisión de enfermedades y evitar una reacción inmunogénica en el paciente. Entre las ventajas que posee el aloinjerto se encuentran el proporcionar el soporte deseado y el relleno del defecto óseo, sin que exista el limitante del tejido óseo del propio paciente. Sin embargo, existe riesgo de rechazo inmunológico y transmisión de enfermedades infecciosas (144).

En el caso del autoinjerto permite, mediante tejido propio del paciente, cubrir un defecto óseo, siendo rico en vascularización y sin que presenten los efectos secundarios que supone un aloinjerto (145). La cresta iliaca es la más empleada por ser osteoconductora, osteoinductora y osteoformadora (146).

La gran limitación para la realización de los autoinjertos es la disponibilidad limitada de tejido a injertar, no pudiéndose reconstruir defectos mayores de 3 cm debido a hidrólisis del mismo, y además presenta efectos secundarios en la zona donante del paciente. Es por ello que se requiere desarrollar diferentes estrategias terapéuticas para cubrir el defecto óseo existente y permitir un tratamiento *in situ* con antibiótico para las infecciones (146,147).

TÉCNICA DE MASQUELET

Es también conocida como la “técnica de doble membrana” y consiste en la inducción de una membrana en la reconstrucción de defectos óseos (148).

La técnica de Masquelet requiere de dos tiempos para la reconstrucción que se desea realizar. En la primera fase, se realiza la creación de la membrana inducida, precisando estabilizar el defecto óseo mediante material de osteosíntesis para la creación de la membrana. A continuación, se desbrida la zona afectada para retirar todo el tejido óseo necrótico, y se coloca el injerto óseo con una matriz que actúa como una barrera física, y que puede estar impregnada por diferentes sustancias osteoinductoras (149).

En la segunda fase se realiza la reconstrucción y consolidación ósea. Tras un periodo de unas 6-8 semanas se realiza una nueva cirugía, para exponer la membrana que se ha formado alrededor del tejido óseo y la matriz extracelular. Ha de preservarse la matriz, dado que actúa como soporte para la reconstrucción ósea, y se rellena con injerto óseo adicional en contacto con la membrana para que así se produzca la consolidación del tejido óseo (150).

- TÉCNICAS QUE REGENERAN EL HUESO

Por último, existen dos técnicas muy utilizadas en traumatología para la reconstrucción de grandes defectos óseos. Estas técnicas permiten rellenar el

defecto óseo del paciente gracias a la formación de un nuevo tejido a partir del suyo propio, aunque no están exentas de limitaciones.

ACORTAMIENTO ALARGAMIENTO

El acortamiento alargamiento es una técnica bastante empleada en aquellos casos en los que se presenta un defecto óseo de hasta 3-4 cm. Primero se realiza un desbridamiento, retirando el tejido necrótico, y posteriormente se juntan ambos extremos óseos para cubrir el defecto óseo restante, resultando en el acortamiento, que es la primera fase. Se realiza una osteotomía en otro nivel del hueso, siendo este tejido sano, para producir un foco de hematoma con factores de crecimiento que permitirán la formación de nuevo hueso. Posteriormente, y con este foco de osteotomía se realiza osteogénesis por distracción (151). Se va realizando distracción a diferentes velocidades y con un tiempo variable, dependiendo de la localización del hueso o de las características del paciente. Esta técnica no puede emplearse en defectos mayores a 4 cm por riesgo de necrosis de las partes blandas (152).

TRANSPORTE ÓSEO

El transporte óseo es una técnica que permite el regenerado óseo, pero a diferencia del acortamiento óseo, se mantiene la longitud de la extremidad. En esta técnica se realiza primero la exéresis del tejido necrótico óseo, quedando un defecto al retirar el tejido no viable. Posteriormente, se realiza una osteotomía en otro nivel, formándose el hematoma para estimular la formación del nuevo tejido óseo en el espacio creado. El fragmento óseo, formado donde se ha realizado la osteotomía, será “trasladado” mediante distracción hasta que finalmente contacte con el extremo del tejido donde había quedado dicho defecto (153).

Una de las desventajas que posee es que se trata de una técnica compleja de realizar y que en ocasiones se da un retardo de consolidación o una no-uni6n del

“punto de atraque”, precisando de desbridamiento en la zona y posterior aporte de injerto para permitir y estimular la formación de hueso *de novo* (154).

1.2 IMPRESIÓN 3D: LA REVOLUCIÓN TECNOLÓGICA

1.2.1 CONTEXTO E HISTORIA

La impresión 3D ha revolucionado diversos campos del conocimiento y está adquiriendo un papel de gran importancia en diferentes áreas de la medicina. La impresión 3D permite, mediante diferentes materiales y formas de impresión, crear modelos y objetos personalizados para su aplicación al paciente, además de ser una técnica accesible, rápida, y económica. En este sentido, el uso de la impresión 3D permite realizar una medicina personalizada a las necesidades terapéuticas del paciente. Por ello, la utilización de las impresoras 3D está adquiriendo cada vez más un papel importante en traumatología (155).

La impresión 3D surgió por primera vez en los años 70, gracias a Hideo Komada que fue el que creó el enfoque de fabricación de objetos y modelos por la adición de capas sucesivas (156). La impresión por estereolitografía (SLA) la empleó por primera vez Charles W Hull, que fue el que patentó esta tecnología en 1986 y creó la empresa 3D Systems para poder comercializar sus productos. Fue Hull el descriptor del método de impresión tridimensional mediante sucesivas capas de un material fotosensible que polimerizaba por luz ultravioleta (UV) (157).

Formlabs adaptó esta tecnología en 2011 y surgieron las primeras impresoras de escritorio, de pequeño tamaño. La impresión 3D previamente estaba limitada a las grandes industrias por los enormes tamaños que poseían las impresoras y los altos costes que implicaban su adquisición. Así, la impresión 3D se volvió accesible al público general, permitiendo su aplicación en múltiples sectores entre

los que destaca la ingeniería, la fabricación de productos, la joyería y la odontología (158).

En general, la impresión 3D ha transformado el campo de la sanidad al permitir la creación de soluciones innovadoras en múltiples áreas. Los modelos se crean gracias a las imágenes médicas, como la tomografía computerizada (TC) o la resonancia magnética (RM). Se genera una imagen que se guarda como información en el archivo DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine). El DICOM es el formato en el que más frecuentemente se almacena y se comparten las imágenes médicas obtenidas. Las impresoras 3D no son capaces de procesar los archivos con formato DICOM, por lo que se requiere una transformación del archivo con la imagen 3D para luego poder imprimirla (159). Estos archivos tienen un formato estándar que define el objeto 3D denominado STL. El STL es el tipo de archivo que generalmente usan las impresoras 3D, y que define las superficies del objeto como un conjunto de triángulos o facetas que se juntan sin crear espacios entre ellas. Por tanto, para poder imprimir el modelo 3D definitivo se suelen realizar las siguientes etapas (160):

- **Mejora de la imagen**: primero, la imagen obtenida por TC no tiene suficiente resolución y requiere mejorar su calidad con diferentes filtros.
- **Segmentación**: se realizan modificaciones para agrupar los píxeles en cada una de las imágenes DICOM para que así se junten en lo que corresponde de las diferentes capas (músculo, piel, hueso ...).
- **Extracción del modelo y eliminación del ruido**: de forma semiautomática se suelen conectar los píxeles del mismo grupo y se elimina el exceso de ruido, generando el modelo 3D final.
- **“Slicing” o deconstruir en capas**: en esta fase el modelo 3D se vuelve a procesar y se deconstruye en capas 2D, con el software Slicer, que procesa las imágenes obtenidas en TC y en RM, y que permite modelar, modificar y

transformar la imagen creada tridimensionalmente hasta obtener el objeto deseado.

- **Impresión 3D**: Posteriormente, y tras obtener la imagen en 3D, se prepara el objeto que se desea imprimir en el programa de la impresora (161).

El formato STL tiene ciertas limitaciones. Primero, no permite imprimir un objeto con diferentes transiciones, por lo que no se puede obtener diferentes “texturas” del mismo objeto. Estas características podrían ser útiles para observar la transición entre un tejido sano y maligno. Otra limitación es que no se puede predeterminar el color o las propiedades de material, por lo que el software específico de cada impresora 3D asignará estas propiedades a cada uno de los archivos STL que se carguen para imprimir (162).

Entre el amplio abanico de aplicaciones médicas de la impresión 3D se encuentran la planificación quirúrgica y la creación de modelos anatómicos, al permitir la creación de objetos personalizados únicos, la obtención de dispositivos y prótesis médicas, para reemplazo de extremidades o bien ortesis. Además, la bioimpresión de tejidos y órganos biológicos puede tener múltiples aplicaciones en los trasplantes de órganos o medicina regenerativa al permitir el reemplazo con células y biomateriales (155).

En el campo de la traumatología, la impresión 3D ha ayudado mucho al traumatólogo y cirujano ortopeda (163), ya que permite al cirujano adquirir destrezas y habilidades quirúrgicas en un medio simulado y ser una alternativa válida a los cadáveres (164). La impresión 3D permite también anticiparse a la complejidad de ciertas cirugías, facilitando el entendimiento de las relaciones anatómicas y vasculonerviosas asociadas a las mismas. Previamente, la planificación quirúrgica se realizaba con radiografías, y actualmente con la ayuda de la impresión 3D se obtiene un modelo 3D a partir de las imágenes de TC. En muchas ocasiones, al imprimir el modelo 3D se puede mejorar la planificación

quirúrgica de patologías complejas. Esta es una aplicación de la impresión 3D que aporta un beneficio directo al paciente, dado que mejora la comprensión de la enfermedad y permite una correcta planificación quirúrgica, el cirujano puede realizar la cirugía con mayores garantías de éxito (159).

El diseño y la impresión 3D no solo se utilizan para la planificación quirúrgica, sino que también se están empleando para la fabricación de prótesis y material de osteosíntesis a medida, pudiendo personalizarlos a las necesidades de cada paciente. Estas aplicaciones tienen una utilización cada vez mayor en el campo de la cirugía tumoral, donde la cirugía erradicadora produce un defecto óseo y de partes blandas, que puede ser cubierto por prótesis fabricadas por impresión 3D totalmente personalizadas, que de otra forma hubiera sido difícil de cubrir (165). La tecnología 3D está expandiéndose con gran rapidez, aportando grandes beneficios como reducción del tiempo quirúrgico, disminución de la pérdida sanguínea, disminución de los costes generales y mejorando la calidad asistencial al paciente. Además, en muchas ocasiones puede ayudar al cirujano a precisar una menor utilización de la fluoroscopia, siendo un beneficio en cuanto a la reducción de radiación recibida por el paciente (166,167).

1.2.2 MATERIALES EMPLEADOS EN LA IMPRESIÓN 3D

Existe una amplia gama de materiales empleados en la impresión 3D, cada uno con propiedades, características y utilidades diferentes (168), entre los que se incluyen:

- **Resinas**: las impresiones basadas en SLA emplean resinas fotosensibles que solidifican con la exposición de la luz. Ofrecen alta flexibilidad y resistencia a altas temperaturas.
- **Plásticos**: los filamentos termoplásticos, como el ácido poliláctico (PLA) o el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) son ampliamente empleados en las impresoras 3D.

- **Metales:** existen algunas impresoras 3D que emplean polvos metálicos como el aluminio, titanio o acero inoxidable para crear diferentes capas y formar el objeto deseado. Se emplea mucho este tipo de material en la industria aeroespacial e ingeniería, y utilizan las impresoras tipo “*selective laser melting*” (SLM) o “*electron beam melting*” (EBM). Pueden combinarse diferentes tipos de metales para modificar sus propiedades y adaptarlas a las necesidades. Los metales pueden clasificarse en tres tipos (169,170):
 - **Metales convencionales:** son bio-inertes, ya que no producen reacciones indeseadas. Entre los materiales más empleados se encuentran el titanio, el acero inoxidable y el cobalto (171).
 - **Aleaciones:** estos materiales pueden soportar deformaciones pseudoelásticas a la vez que pueden recobrar su forma original cuando cesa el estímulo externo. Más del 90% de las aplicaciones que utilizan aleaciones están basadas en la aleación níquel-titanio como, por ejemplo, el NiTiNOL (Nickel Titanium Naval Ordnance Laboratory). Entre las aplicaciones que utilizan el NiTiNOL se encuentran las agujas, grapas o arpones (172,173).
 - **Metales biodegradables:** están diseñados para degradarse en el cuerpo mientras ejercen su función o tras finalizarla. Normalmente, se utilizan como soporte del tejido circundante para permitir su crecimiento (174). Los materiales más empleados son los basados en el hierro junto con el magnesio (175).

Entre los materiales más empleados en traumatología para la impresión 3D encontramos (176) los polímeros térmicos de polipropileno poliéter éter cetona o poliéter cetona, metales de acero inoxidable o titanio, materiales similares al hueso, como biocerámicas (hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato cálcico) y los plásticos (polietileno acetato) (165).

Cabe destacar que el material empleado en la impresión 3D que se aplicará al paciente debe de ser biocompatible. Los biomateriales son materiales utilizados en medicina para su empleo en el cuerpo humano. Entre los biomateriales utilizados se encuentran las siliconas, el poliuretano, el NiTiNOL y los fosfatos cálcicos, entre otros. Para emplear los biomateriales hay que tener en cuenta diversos factores, entre los que se encuentra la biocompatibilidad. La biocompatibilidad de un material, como define David F Williams, se alcanzaría cuando “el material empleado produzca la función deseada sistémica y local pero sin producir efectos adversos indeseados y respetando el tejido celular circundante” (177).

Una de las ventajas de los materiales empleados hoy en día para su uso en la impresión 3D es que, además, pueden esterilizarse para su uso intraquirúrgico, aunque dependiendo del material empleado, los procesos de esterilización serán diferentes (178).

1.2.3 TIPOS DE IMPRESORAS 3D

Existen distintos tipos de impresoras 3D que suelen clasificarse en 7 grandes grupos según la clasificación de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) de 2015 (número 17295-2:2015) (162,179):

- Fotopolimerización.
- Extrusión de material.
- Inyección de aglutinante.
- Inyección de material.
- Fusión de lecho de polvo.
- Laminación de hojas.
- Deposición directa de energía.

Para un enfoque más práctico, nos centraremos en las impresoras que se utilizan en medicina y que se dividen en 3 grandes categorías. Entre las que se incluyen

la impresión por boquillas, la impresión basada en inyección de tintas y la impresión por láser (180).

- **Impresión por boquillas**: se basa en un material que sale de un extrusor que calienta el material para poder extruirlo.
 - Modelación por deposición fundida (FDM).
 - Microjeringas asistidas por presión (PAM).
- **Impresión por inyección de tinta**: lo que hace es inyectar el material deseado (normalmente un fotopolímero).
 - Continuous inkjet Printing (CIP)
 - Drop on Demand (DoD)
 - Gota en sólido (Binder Jetting)
 - Gota a gota (Material Jetting)
- **Impresión por láser**: la alta temperatura del láser que se proyecta mientras se mueve el eje en sentido ascendente o descendente y el material se añade capa a capa progresivamente conforme se va polimerizando.
 - Sintetizado selectivo por láser (SLS).
 - Estereolitografía (SLA).
 - Procesamiento digital de luz (DLP).
 - Microestereolitografía (MSL).

1.2.3.1 IMPRESIÓN BASADA EN BOQUILLAS

MODELACIÓN POR DEPOSICIÓN FUNDIDA (FDM)

La impresora de filamento tipo FDM es una de las “más antiguas” y que ha popularizado el uso de esta nueva tecnología. Su función es ir depositando un plástico que está a alta temperatura y que se va extruyendo capa por capa en una base de impresión caliente. Mediante el proceso de extrusión por fusión caliente se combinan la temperatura y la presión adecuadas para obtener un producto

homogéneo. Existe un tanque de alimentación donde entran el principio activo y el polímero deseado, que pasan a la zona de mezclado donde se aplica temperatura y se forma el filamento. Dependiendo de la velocidad a la que se mueva el motor el filamento cambiará de grosor y consistencia (181). Se van añadiendo capas sucesivas hasta obtener el objeto deseado, y posteriormente al enfriarse la pieza termina de solidificar. Son las impresoras 3D más económicas y tienen un mantenimiento sencillo, a diferencia de otras impresoras, pero los tiempos de impresión son mucho más largos (182).

Esta impresora presenta gran variedad en el tipo de material que puede emplearse. Además del PLA encontramos el ABS, PG, PTU, TP, Nylon y otros materiales combinados y compuestos. Los dos materiales más empleados en impresoras tipo FDM son el PLA y el ABS, que suponen hasta el 95% de los filamentos empleados. Una de las desventajas que poseen estas impresoras es que el proceso de extrusión depende de la temperatura, siendo un factor limitante (182,183).

El ABS es un polímero termoplástico que presenta alta resistencia a los impactos, al calor y a los productos químicos. Fue de los primeros plásticos empleados en la impresión 3D a inicio de los años 90. Una desventaja que posee el ABS es que desprende gases nocivos en altas concentraciones (185).

El PLA es uno de los materiales más empleados en impresión 3D por las propiedades que posee. Es altamente resistente tanto a la grasa como a la humedad, elástico y con un nivel de inflamabilidad bajo (186). Además, puede polimerizar con otro tipo de materiales y es estable, siendo resistente a las acetonas o al alcohol. Entre las ventajas que posee frente al ABS se encuentran que es más rígido y más difícil de deformar y los objetos impresos presentan una mayor calidad (187).

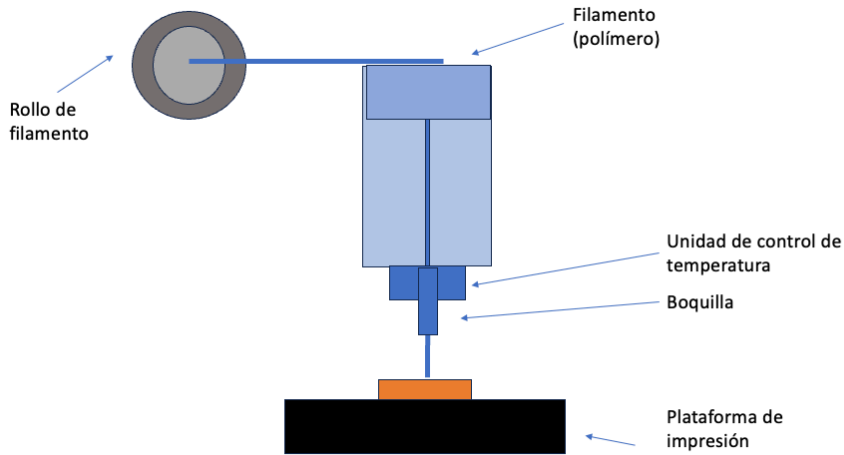


Figura 1: Descripción de las piezas que forman parte de la impresora FDM. Abajo, se observa la plataforma de impresión y arriba, el rollo de filamento que se funde gracias a la unidad de control de temperatura, y que es extruido en la boquilla. Imagen modificada de Konta *et al.* (184).

El PLA es una sustancia que se puede mezclar con fármacos gracias a las propiedades que posee. Para hacer la mezcla del PLA con el principio activo existen dos métodos la extrusión por fusión caliente (*Hot Melting Extrusion*) o la impregnación (188). Algunos de los materiales que también emplearse en el *Hot Melting* son el poliéter éter cetona (PEEK) o el poliéter imida (PEI), que son termoplásticos con alto nivel de fusión (189).

La impregnación consiste en sumergir el filamento durante un tiempo en una solución que contiene el principio activo. Requiere altas concentraciones del principio activo dado que el método de impregnación se basa en la difusión pasiva. Por ello, muchas veces las concentraciones obtenidas del principio activo son bajas y no existe un adecuado control de su liberación (190,191).

La fabricación de filamento de PLA con principio activo se realiza mediante la utilización de una máquina específicamente diseñada, que extruye PLA y principio activo a un flujo constante que produce un filamento de un grosor de 1,7 mm y con ayuda de un tornillo sin fin, mezcla de los componentes que provienen de una tolva. Finalmente, se obtiene un filamento con propiedades biomecánicas óptimas para el paciente, con características similares al hueso sano y con la posibilidad de la adición de sustancias osteoconductoras y osteoinductoras. Sin embargo, una de las principales limitaciones del uso de este tipo de impresoras en traumatología es la alta temperatura, dado que al igual que el cemento, altera las propiedades de los antibióticos termolábiles (192).

APLICACIONES DE LA IMPRESIÓN FDM

Existen múltiples aplicaciones médicas de la impresión FDM, como por ejemplo un novedoso sistema para el tratamiento del *Helicobacter pylori* mediante un dispositivo flotante que recubre la cápsula de amoxicilina y así obtener un comprimido gastrorresistente, que permite una liberación sostenida del medicamento a lo largo del tiempo. Otra aplicación es la obtención de implantes sanitarios personalizados, como por ejemplo los implantes con liberación de progesterona (193).

1.2.3.2 MICROJERINGAS ASISTIDAS POR PRESIÓN (PAM)

Otro tipo de impresión es la basada en PAM en la cual se crean las estructuras gracias a una sustancia semisólida que incluye el principio activo y que posee una viscosidad adecuada para ser impresa por las jeringas con aire a presión, un tornillo sin fin o un pistón aplica la presión necesaria (190,194). En este método de impresión no se requieren altas temperaturas, por ello requiere de un procesamiento posterior para la solidificación completa y obtener la estructura final (195). Una de las desventajas que posee esta técnica es que depende de la viscoelasticidad del material a la hora de obtener la matriz deseada.

APLICACIONES DE LA IMPRESIÓN PAM

En medicina se ha empleado para la impresión de hidrogeles con o sin células (181,196), o incluso para imprimir tabletas masticables personalizadas para su administración en población pediátrica (197).

1.2.3.3 IMPRESIÓN POR INYECCIÓN DE TINTA

La impresión por inyección de tinta se basa en la eyección de una tinta a través de una boquilla. La tinta impacta sobre un sustrato que puede ser flexible o rígido y que está encima de una base móvil. La base se calienta para permitir la evaporación (198,199). Existen diferentes tipos de propulsores, aunque los más empleados son el térmico, el electrodinámico y el piezoeléctrico (200).

Los propulsores térmicos promueven la generación de las gotas de tinta por expansión térmica. Los piezoeléctricos generan las gotas de tinta por deformación del depósito de tinta mediante voltaje, y los electrodinámicos aplican la gota mediante un campo eléctrico que genera una diferencia de voltaje entre el extrusor y el sustrato, que provocará el depósito de la tinta.

La impresión por inyección de tinta tiene dos tipos de impresoras: la impresión continua (*Continuous Inkjet Printing*, CIP) o bien con inyección a demanda (*Drop on Demand*, DoD) (181). La CIP genera un flujo constante de tinta que se deposita encima del sustrato, y forma la gota gracias a un generador piezoeléctrico (201,202).

La DoD tiene un tanque con tinta directamente conectado y equipado con un propulsor. El cabezal de extrusión de la tinta puede ser térmico, aplicando la temperatura a la tinta mediante una resistencia, o bien presenta un cabezal con un elemento piezoeléctrico que mediante voltaje se deforma y empuja para formar la gota de tinta. Dentro de la impresión por DoD existen dos tipos de impresoras: la gota en sólido, también llamada *Binder jetting*, en la cual existe un reservorio

aglutinante y una plataforma móvil que baja para cubrirse de polvo, donde se crea la estructura, o el método gota a gota o material *jetting* (*Multiject Printing Polyjet*, MPJ) (184), utilizado para imprimir estructuras microscópicas donde se coloca una gota con el principio activo y el polímero deseado, y gracias a la temperatura se elimina el solvente por evaporación solidificando la gota (203).

Dentro de esta categoría se encuentra la bioimpresión. La impresión por inyección de tinta está recibiendo cada vez más atención porque mediante la liberación gota a gota se está realizando la bioimpresión de tejidos, organoides y pequeños órganos, mediante la suspensión de células en una biotinta como el hidrogel (204). Por tanto, son las impresoras idóneas para su aplicación en ingeniería biomédica.

La principal desventaja de las impresoras basadas en inyección de tinta, a pesar de ser muy precisas y tener alta resolución, es su limitada disponibilidad debido a que únicamente unas pocas empresas las comercializan. Su precio es elevado, por lo que su utilidad está indicada en el caso de que se requiera una producción a gran escala (205).

APLICACIONES DE LA IMPRESIÓN POR INYECCIÓN DE TINTA

La impresión por inyección de tinta tiene una amplia utilidad en el campo de la medicina (198,204,205). Entre las diferentes utilidades se encuentra la liberación controlada de medicamentos, la creación de sensores y dispositivos médicos, la fabricación de medicamentos o la bioimpresión de tejidos. Gracias a estos métodos se han podido crear medicamentos como el Spritam® (levetiracetam) mediante la técnica gota en sólido, aprobado en 2015 por la Food and Drug Administration (FDA) (206), o aerogeles para administración pulmonar de salbutamol (207).

1.2.3.4 IMPRESORAS LÁSER

Las impresoras láser se basan en la solidificación de la resina utilizada mediante la polimerización tras la aplicación de la luz. La fotopolimerización tiene ventajas comparada con la polimerización dependiente de la temperatura, entre las que se encuentra una solidificación más rápida. Además, ofrece control espacial y temporal de la polimerización, ya que la reacción ocurre principalmente en las zonas iluminadas y en el momento que la luz está presente (155).

Muchos de los monómeros de las resinas empleadas en las impresoras láser no son fotosensibles, y requieren de un fotoiniciador que normalmente se añade a la resina. Consiste en un compuesto químico que permite transformar la energía fotolítica y producir los reactivos precisos. Cualquier fotoiniciador se desarrolla para asegurar que la concentración de los radicales sea elevada. La radiación UV es la que se utiliza principalmente (208). Tras la formación de los radicales, la propagación de la reacción en cadena se produce con la poliadicción, en la que se consume un monómero del líquido de la resina, y acaba produciendo un polímero sólido de forma rápida. Por tanto, la luz solo afecta al principio de la reacción, con la absorción de un fotón y consumo de muchos monómeros (209,210). En cuanto a la fotopolimerización, muchos factores controlan las características de la radiación, entre las que se encuentra el tipo de luz o la intensidad de la radiación empleada.

IMPRESIÓN POR SINTETIZADO SELECTIVO POR LÁSER (SLS)

Entre las impresoras que utilizan el láser como método de polimerización se encuentra la impresora SLS. Estas impresoras utilizan un láser de alta potencia, para fusionar polvos de metal, plástico u otro tipo de materiales. Presenta un lecho en polvo, donde el láser va calentando progresivamente las partículas, creando puntos en los cuales se unan, y permitir la formación de la capa deseada (211). Posteriormente, la plataforma baja para que el rodillo desplace el lecho de polvo

y así pueda formarse la nueva capa. Este tipo de impresión es útil cuando se desea producir piezas de alta calidad y que sean duraderas, creando así objetos complejos. Otra de las ventajas es que el polvo sobrante puede reutilizarse, si bien es cierto que en ocasiones cuesta eliminar el sobrante de la pieza resultante. Entre las desventajas de esta impresión es que existen errores a la hora de la fusión de las partículas, con la consecuente unión de capas no deseada y la formación de otras nuevas (181).

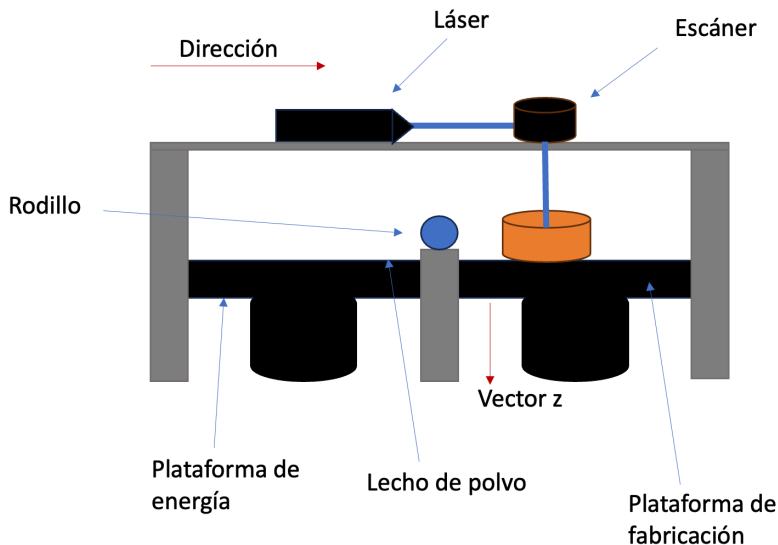


Figura 2: Partes de la impresora de sintetizado selectivo por láser. Arriba, la fuente láser con el sistema de escaneado. Gracias a calentar el lecho de polvo, se produce la polimerización de las partículas y la formación del objeto 3D. El rodillo posteriormente desplaza las partículas del lecho de polvo no impresas. Imagen modificada de Wang *et al.* (212).

APLICACIONES DE LA IMPRESIÓN SLS

Una de las mayores utilidades médicas que presenta es la fabricación de implantes personalizados, especialmente en cirugías complejas u oncológicas o guías

quirúrgicas a medida para la cirugía traumatológica. También se pueden utilizar impresoras SLS en el campo farmacéutico, por ejemplo, para la fabricación de implantes con ibuprofeno para regenerar tejido ocular (213).

IMPRESIÓN POR ESTEROLITOGRAFÍA (SLA)

La impresión mediante tecnología SLA, que es el tipo de impresión que se utilizará en la presente tesis doctoral, se basa en la exposición de la resina líquida a una fuente de luz, normalmente UV-A o UV-B, y que permite formar capas sólidas de plástico hasta crear el objeto (214).

La impresión por SLA funciona gracias a la radiación UV que atraviesa la resina fotosensible y que permite la polimerización. La radiación de baja intensidad solidifica una capa fina de resina de la superficie. El objeto 3D se forma gracias a un tanque de resina líquida donde está inmersa la base principal, controlada por un ordenador. La base móvil se desplaza hasta el tanque donde se encuentra la resina líquida (215). Posteriormente se realiza un ciclo de láser y se forma la capa de fotopolímeros, formándose la siguiente capa mientras sigue bajando la plataforma. El objeto 3D se forma por tratamiento láser en cada capa. Tras la realización del objeto, se requiere un tratamiento para eliminar el exceso de resina, mediante alcohol isopropílico o agua (184,216,217).

En estas impresoras influye la intensidad de la luz UV aplicada y el tiempo de exposición al que se somete la resina, los monómeros y los fotoiniciadores que se incluyen en la resina, que son los que permiten que la reacción de polimerización se desencadene. Existen diferentes sustancias que pueden añadirse a la resina que absorben la luz UV para modular la polimerización de la misma (211,218).

Hay dos tipos principales de impresoras que emplean la SLA: las que imprimen de arriba a abajo y las que imprimen de abajo a arriba. Las impresoras que

imprimen de arriba a abajo son las más populares, y funcionan mediante un láser justo arriba del tanque de resina. Para la formación del objeto, la plataforma empieza arriba del todo y se mueve hacia abajo en cada capa de polimerización (208). La plataforma está en el tanque con la resina líquida fotosensible. El tiempo que tarde en producir una capa depende de la rapidez del láser (219). Tras la polimerización de la capa, la plataforma se mueve hacia abajo y una nueva capa de resina líquida se deposita sobre la capa polimerizada. Conforme se van formando las capas, van polimerizando las nuevas sobre las antiguas hasta que finalmente se obtiene el objeto 3D (220).

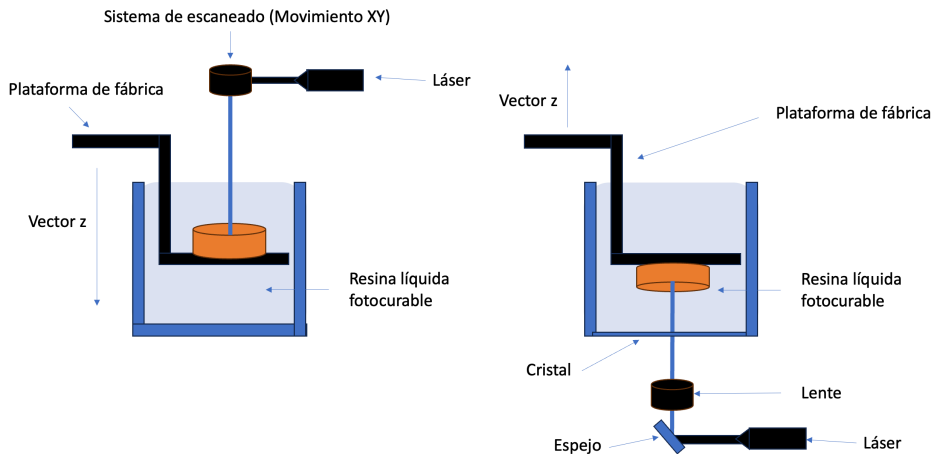


Figura 3: Tipos de impresora SLA. A la izquierda, la impresora de “arriba a abajo” y a la derecha, la impresora de “abajo a arriba”. Imagen modificada de Billiet *et al.* (214).

En las impresoras de abajo a arriba, que principalmente se utilizan para uso personal, el láser está debajo del tanque de la resina y la plataforma se va desplazando hacia arriba. El fondo del tanque es transparente para permitir el paso de la luz UV. La plataforma baja al fondo del tanque y se forma la primera capa. Posteriormente, se desplaza la plataforma levemente hacia arriba y vuelve

a aplicarse luz UV, y para cada capa polimerizada la plataforma vuelve a subir, moviendo el líquido del tanque y aplicando luz UV, formando una nueva capa polimerizada. La plataforma se desplaza de forma progresiva hacia arriba hasta que el objeto 3D está formado por completo. Esta configuración permite una menor influencia de la inhibición de la polimerización inducida por el oxígeno a diferencia de la impresora de arriba-abajo. Los objetos 3D son fáciles de imprimir, pero existe la limitación del tamaño de los objetos que se pueden imprimir (218,221).

Las impresoras que emplean SLA requieren de un soporte estructural. En las impresoras de arriba a abajo los soportes deben de ser precisos para crear los puentes, siendo el ángulo crítico de 30°, y en las impresoras de abajo a arriba los soportes pueden ser más complejos, ya que el momento más crítico es cuando se eleva la plataforma del tanque, que es cuando se corre el riesgo de que el objeto se suelte de la plataforma (179,221).

La polimerización depende del tiempo de exposición a la luz UV, y se considera que las impresoras SLA son de las que tienen mayor precisión, gracias a la alta resolución de la fuente de luz, con una resolución vertical que corresponde a la altura de la capa y que varía entre 25 y 150 micras. La altura de la capa (*layer height*) es una de las pocas cosas que el usuario de las impresoras 3D SLA puede modificar, ya que el resto de parámetros vienen definidos por el fabricante. Cuando se fabrica un objeto 3D con capas más delgadas la precisión aumenta a costa de un mayor tiempo de impresión. Las impresoras SLA permiten fabricar partes altamente complejas y detalladas, por lo que son idóneas para aplicaciones en medicina y odontología. Como desventaja, el tiempo que precisan para crear el objeto 3D es grande, ya que la velocidad media estándar del eje vertical es de 10-20 mm h⁻¹ (221,222).

Las impresoras que emplean la técnica SLA permiten utilizar sustancias que son sensibles a altas temperaturas, dado que el aumento de la temperatura es mínimo, a diferencia de las impresoras FDM. Otra ventaja es la impermeabilidad, y uniformidad con respecto a otros objetos creados en impresoras 3D. Las impresoras FDM imprimen capas del eje Z con una altura seleccionable de entre 100 y 300 micras, pero una capa impresa a 100 micras tiene menor calidad comparada a capa de 100 micras impresa en SLA. Además, se pueden imprimir capas de menor grosor comparado con las impresoras FDM, yendo desde 20 a 200 micras, siendo los grosores de capa más utilizados los de 100 y 200 micras. La impresión SLA tiene como desventaja los fotopolímeros que pueden emplearse en el mundo sanitario, son escasos debido a la necesidad de la aprobación para su uso en humanos por parte de los organismos reguladores, como la FDA (181,184).

TIPOS DE RESINAS EMPLEADAS EN IMPRESORAS SLA

Las resinas son materiales fluidos que gracias a la temperatura o a la luz láser solidifican formando un objeto sólido. Las resinas para SLA tienen diferentes formulaciones y configuraciones, que pueden ser blandas o duras, y hasta contener materiales como el vidrio. Existen diferentes tipos de resinas:

Resinas fotosensibles: se caracterizan por solidificarse cuando exponen a la luz UV, permitiendo una curación precisa y rápida.

- Resinas de poliamida: la más conocida es el nylon, que tiene una excelente durabilidad y resistencia mecánica. Son útiles para piezas que requieran de resistencia.
- Resinas acrílicas: son conocidas por su gran precisión y el acabado de superficie de los objetos impresos con estas resinas. Se utilizan con frecuencia en la industria dental y médica. Están compuestas de

elementos libres de toxinas, para que puedan aplicarse al paciente sin que exista riesgo para su salud (216,223).

Resinas termoendurecibles: es la categoría de resinas más utilizadas en la impresión 3D. Son resinas líquidas que se endurecen tras la aplicación de luz UV o calor (224). Entre los tipos más frecuentemente utilizados se encuentran:

- **Resinas de poliéster:** presentan bajo coste y son fáciles de manipular. Son utilizadas en muchos campos, desde la creación de joyería hasta maquetas. Son resinas muy versátiles.
- **Resinas epoxi:** presentan una excelente resistencia mecánica, siendo idóneas cuando se requiere máxima durabilidad y precisión. Pueden ser además transparentes, lo que las hace aún más aplicables en diferentes campos, como la medicina o la joyería.
- **Resinas de uretano:** presentan una excelente resistencia a los impactos, además de flexibilidad. Se utilizan para la industria del entretenimiento, como en la fabricación de máquinas para videojuegos.

Resinas flexibles: tienen una gran capacidad para crear objetos deformables a la vez que elásticos. Presentan una gran aplicación en sectores como la ingeniería, moda o robótica (221).

La ventaja de la resina frente al PLA (que se utiliza en las impresoras FDM), es que presenta un proceso de impresión más fiable dado que las capas resultantes del líquido fotocurable son más precisas (225). El tiempo necesario para realizar el objeto es menor que el de las impresoras FDM, y existen muchos tipos diferentes de resinas que pueden emplearse, con mayor calidad y nivel de detalle (215). Así mismo, no requiere de temperatura para su fotopolimerización, por lo que a la hora de aplicar antibióticos no existe el factor limitante de los fármacos termosensibles.

Las desventajas que presenta las impresoras de resina frente a las de PLA son que tienen un precio más elevado, aunque en la actualidad son igualmente asequibles económicamente. Además, los objetos impresos requieren un proceso de curado tras la finalización de la impresión 3D y la impresora precisa de unos cuidados más exigentes que la impresora de filamento para su cuidado y mantenimiento. En ocasiones, se requiere trabajar con mascarilla por los gases que emiten ciertos tipos de resina y el uso de guantes de nitrilo para manipular los objetos impresos (221).

IMPRESIÓN POR PROCESAMIENTO DIGITAL DE LA LUZ (DLP)

La diferencia principal entre la impresión por SLA y DLP es esencialmente la fuente de luz y cómo se controla para iluminar selectivamente y polimerizar la resina. En las impresoras DLP existe un proyector que instantáneamente ilumina la forma del objeto en la capa que se está imprimiendo sobre la superficie de la resina líquida, por tanto, cura una capa a la vez. Normalmente la luz viene desde la parte de abajo, y la polimerización no se ve tan afectada por la inhibición del oxígeno. Existen tres tipos principales de iluminación utilizados en las impresoras DLP: las lámparas clásicas, las LEDs y láseres que abarcan un amplio abanico del espectro desde luz UV hasta luz visible. La luz visible tiene la ventaja de que es menos dañina para el ojo y las células vivas (223).

Las impresoras DLP suelen requerir menos tiempo para imprimir comparado con las impresoras SLA. La SLA realiza capas a velocidades de mm h^{-1} y DLP a velocidades de cm h^{-1}), ya que cada capa no requiere volver a ser escaneada, si bien la resolución es menor que la SLA, ya que depende del proyector y el tipo de píxeles disponibles (226). Al aumentar la resolución se sacrifica parte del volumen del objeto impreso, por ello, existen impresoras 3D con un volumen menor de impresión para obtener mayor resolución. Las aplicaciones de la impresora DLP son similares a las SLA (227).

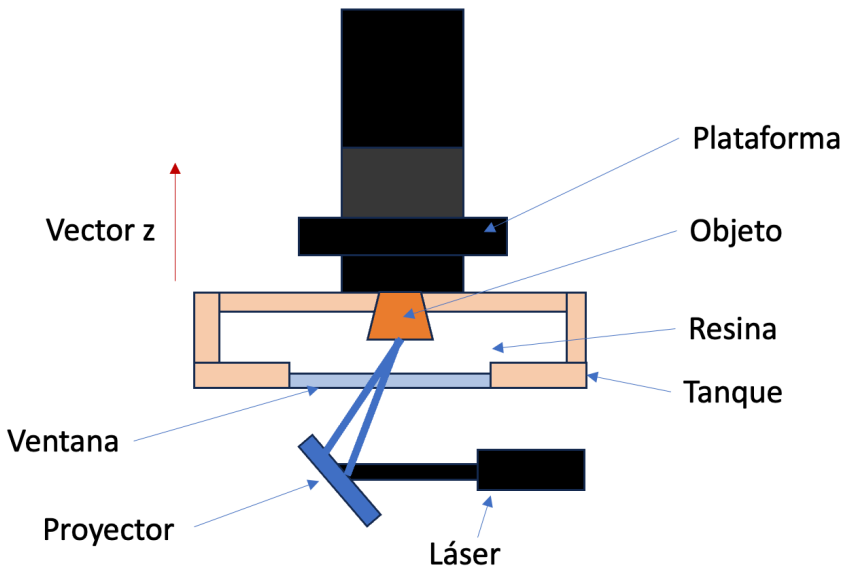


Figura 4: Partes que conforma la impresora DLP. El proyector, que normalmente se sitúa abajo, ilumina la forma del objeto en la capa que se está imprimiendo sobre la superficie de la resina líquida en la plataforma. Imagen modificada de Pagac *et al.* (215).

Dentro de las impresoras DLP se encuentran las impresoras de producción continua de interfase líquida (*Continuous Liquid Interphase Production*, CLIP), que utiliza la proyección LED digital junto con una ventana que permite el paso al oxígeno, y una plataforma en constante movimiento. Requiere proyectar una secuencia continua de imágenes a través de la ventana permeable al oxígeno y transparente a la luz UV (228).

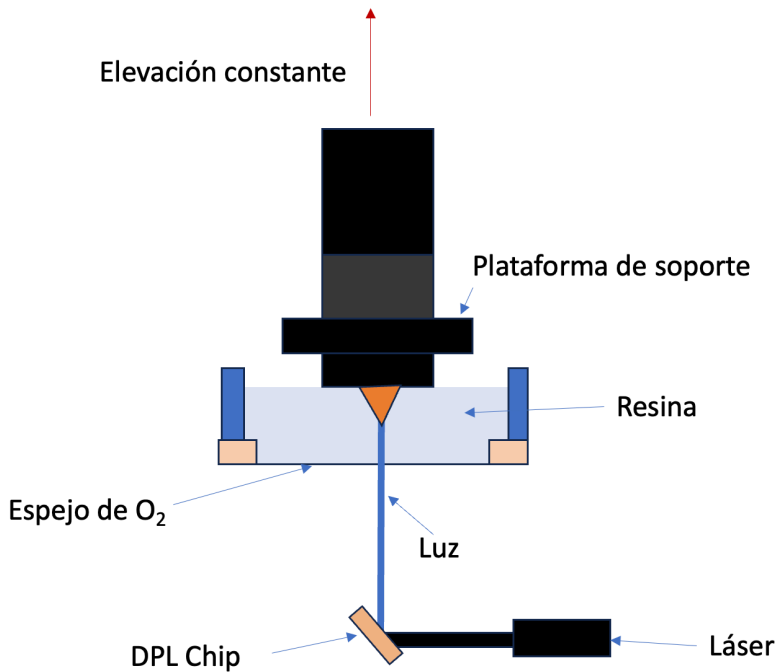


Figura 5: Partes que forman la impresora CLIP. Emplea la proyección LED digital junto con una ventana permeable al oxígeno, y una plataforma en constante movimiento. Imagen modificada de Johnson *et al.* (229).

IMPRESIÓN POR MICROESTEREOLITOGRAFÍA (MSL)

La impresión MSL está basada en el láser y fue creada para conseguir grosores menores de 10 μm con una velocidad de producción más rápida que la SLA. Gracias a la proyección, se crea un patrón dinámico utilizando un monitor de cristal líquido o mediante un microespejo digital, junto con un chip y un emisor de luz que pasa a través de la resina fotopolimerizable, creando una capa (230). El MSL se ha empleado para crear nanopolvo que lleva hidroxiapatita a microescala para la regeneración de tejido óseo (231).

Tabla 1: Resumen de los tipos de impresión, precisión y grosor de las capas impresas, coste de las impresoras y ventajas e inconvenientes de la impresión.

	Impresión en tinta	Impresión con boquillas	Impresión por láser
Tipos de impresión	Continuous inkjet printing (CIJ) Drop on Demand (DoD): Binder Jetting Material Jetting	Modelación por deposición fundida (FDM) Microjeringas asistidas por presión (PAM)	Estereolitografía (SLA) Sintetizado selectivo por láser (SLS) Procesamiento digital de luz (DLP) Microestereolitografía (MSL)
Precisión y grosor capas	Binder Jetting + Material Jetting +++ Material jetting: 16 μ Binder Jetting: 0.05 – 0.1 mm	+ FDM: 0.1-0.4 mm	SLA +++ SLS ++ DLP +++ 0.02-0.2 mm
Coste	Binder Jetting \$ Material Jetting \$\$	\$	SLA \$\$ DPL \$\$ SLS \$\$\$
Ventajas	Binder Jetting: velocidad, variedad de materiales, no requiere de soportes. Material Jetting: precisión, variedad de los materiales. Biocompatibilidad a corto plazo.	Bajo coste, materiales duraderos	Precisión Biocompatibilidad Puede realizarse microimpresión En el caso del SLS, no se requiere siempre de soporte estructural. Variedad de materiales, gran resistencia.
Desventajas Inconvenientes	Binder Jetting: poca resistencia Material Jetting: resistencia moderada.	Poca precisión Las superficies de los modelos tienen muchas rugosidades.	Resistencia media Los modelos suelen ser de un solo material, colores limitados. Medianamente frágiles.

1.2.4 IMPRESIÓN 3D Y ANTIBIÓTICOS

La aplicación médica de la impresión 3D y especialmente en traumatología, en algunas ocasiones requiere que el filamento o la resina se imprima junto con fármacos que eviten o erradiquen el crecimiento de los microorganismos, alrededor del objeto impreso, mediante la liberación progresivamente del antibiótico deseado (165). Como se ha descrito previamente, los diferentes tipos de impresión 3D con antibioterapia suponen parte de la revolución tecnológica actual. La impresión de objetos que contienen antibióticos y que los incorporan en el material utilizado para la impresión tendría múltiples aplicaciones en el campo de la traumatología (195).

1.2.5 UTILIDAD IMPRESIÓN 3D EN EL MARCO ACTUAL Y PROBLEMÁTICA

A pesar de todos los avances que se han realizado en lo que respecta a la impresión 3D, actualmente apenas existen estudios que hayan analizado el comportamiento de la resina y el antibiótico en el terreno de la medicina. Las ventajas de la impresión SLA es que permite imprimir piezas personalizadas a las necesidades del paciente y con la posibilidad de añadir antibióticos para el tratamiento de infecciones tan complejas como la osteoarticular, y la accesibilidad y sencillez de estas técnicas personalizadas en un panorama en el que la impresora 3D cada vez más tiene un papel clave en la traumatología. Además, disponer de esta tecnología con la opción de liberar antibiótico permitiría una adaptación a las necesidades del cirujano en respuesta al enfoque terapéutico que desee realizar (232).

En muchas ocasiones en traumatología se requiere de “dos tiempos” para permitir así la correcta erradicación de la infección osteoarticular. Por ello, la pieza de resina personaliza con el antibiótico permitiría mantener el espacio deseado y adaptar el espacio o la pérdida ósea que presenta el paciente con un material biocompatible y resistente, que además facilite la carga, con todas las ventajas

que ello supone. Así mismo, se produciría una liberación del antibiótico deseado sobre la zona circundante. Cabe destacar que no solo se podría diseñar espaciadores, sino también otro tipo de material, como tornillos o placas adaptadas a las necesidades del paciente (233).

La generación de objetos 3D que combinen la impresión de una pieza personalizada y la presencia de antibiótico puede suponer un avance en el mundo de la medicina, y especialmente en la traumatología.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO:

La impresión SLA pueden ser de utilidad a la hora fabricar implantes con resina y diferentes cantidades de antibióticos. Estos implantes podrían ser una nueva herramienta terapéutica, dado que permitiría la fabricación de piezas 3D personalizadas al paciente, con un material que posee propiedades antibióticas, permitiendo la prevención y el tratamiento de las infecciones osteoarticulares. Así mismo, solucionaría el problema de la impregnación con antibiótico del filamento que se emplea para la impresión tipo FDM de una forma asequible y económica para el médico, ampliando las opciones terapéuticas existentes.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general ha consistido en diseñar piezas personalizables para su impresión 3D mediante SLA con resinas biocompatibles y antibióticos termolábiles, que den soporte estructural y permitan la elución del fármaco a lo largo del tiempo, sin alterar sus propiedades y su actividad antimicrobiana, para su posible traslación a la práctica clínica e incrementar las opciones terapéuticas del facultativo.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar piezas cilíndricas del mismo tamaño, pero con distinta superficie de contacto con el medio, mediante la formación de orificios cilíndricos de distinto tamaño y distribución en la superficie de la pieza.
2. Obtener las piezas diseñadas mediante impresión 3D por SLA con la resina biocompatible Optiprint® Lumina y el antibiótico termolábil amoxicilina-clavulánico.
3. Evaluar la reproducibilidad del proceso de impresión y la fabricación de las piezas.
4. Valorar la elución de amoxicilina-clavulánico de las piezas impresas en un medio que simule el medio interno del paciente a lo largo de 7 días.
5. Determinar la actividad antimicrobiana de la amoxicilina-clavulánico eluidos de las piezas impresas.
6. Determinar las características mecánicas que poseen las piezas impresas con resina-antibiótico.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DE LAS PIEZAS

Para la realización de los diversos estudios se diseñaron piezas cilíndricas de 10 mm de diámetro y 5 mm de altura con ayuda del software informático Thinkercad© (Autodesk). Se utilizaron estas dimensiones dado que dicho tamaño era idóneo para permitir las siguientes fases del estudio y para la impresión 3D con la mezcla de resina-antibiótico.

Se crearon diferentes modelos 3D para estudiar la capacidad de elución de las piezas fabricadas. El **modelo A**, que simula el tamaño de las osteonas del tejido óseo, las piezas cilíndricas incluían orificios de 0,5 mm de diámetro cada 1 mm de la superficie y de la pared lateral de la pieza (**Figura 6**).

Modelo A

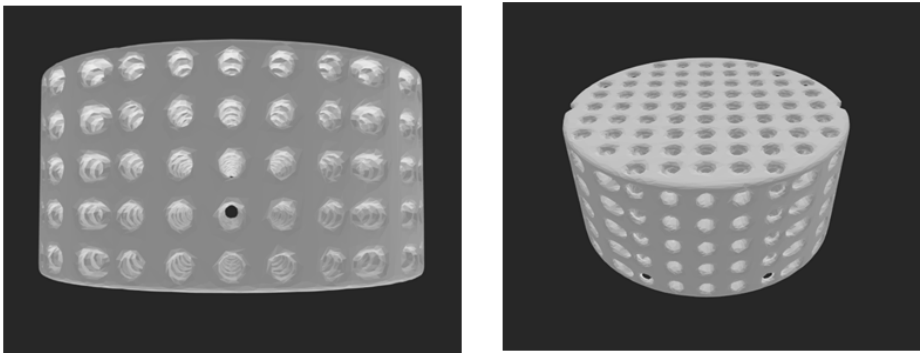


Figura 6: Diseño de la pieza del *modelo A* donde se muestran los orificios de 0,5 mm de diámetro espaciados 1 mm. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.

Además, se diseñaron otros dos modelos para estudiar el proceso de elución del antibiótico. El **modelo B** con orificios de 1 mm de diámetro cada 2 mm (**Figura 7**) y el **modelo C** con orificios de 2 mm de diámetro cada 4 mm (**Figura 8**).

Modelo B

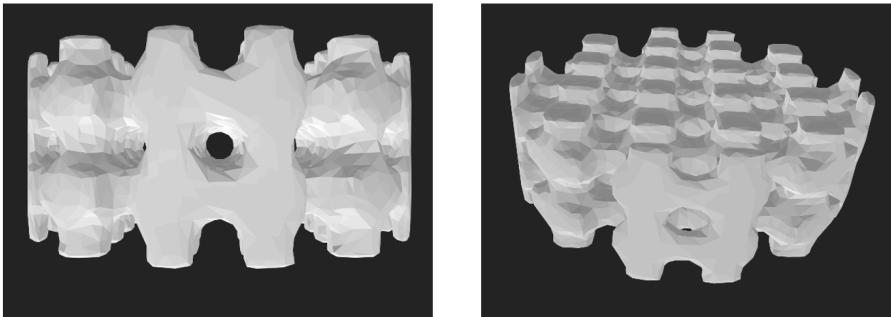


Figura 7: Diseño de la pieza del *modelo B* donde se muestran los orificios de 1 mm de diámetro espaciados 2 mm. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.

Modelo C

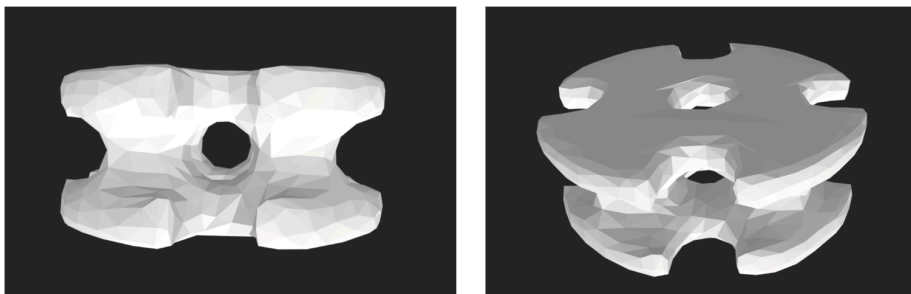


Figura 8: Diseño de la pieza del *modelo C* donde se muestran los orificios de 2 mm de diámetro espaciados 4 mm. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.

Además de los modelos destinados a la impresión 3D se diseñó otro modelo para ser fabricado con cemento (polimetilmetacrilato), material que se utiliza ampliamente en traumatología. Para fabricar las piezas de cemento con el tamaño deseado, se diseñó un molde con orificios cilíndricos de 10 mm de diámetro y 5 mm de altura mediante el software Thinkercad© (**Figura 9**).

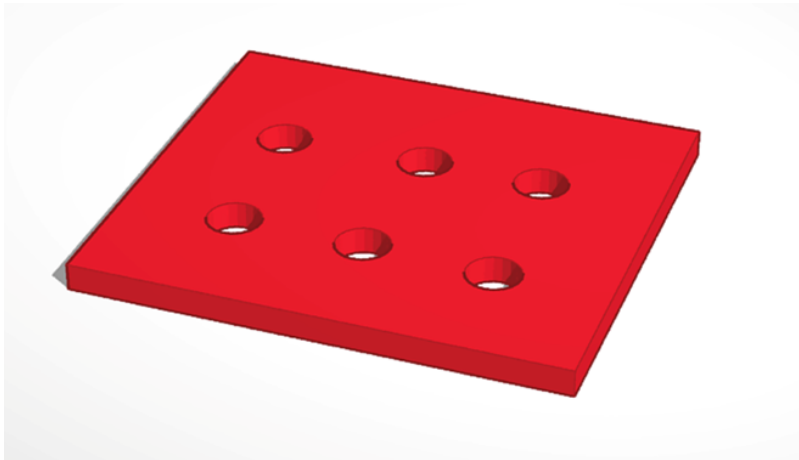


Figura 9: Diseño del molde para obtener piezas del *modelo D* donde se muestran los orificios para rellenar con el cemento y obtener piezas cilíndricas de 10 mm de diámetro y 5 mm de alto. El molde fue generado con el programa de diseño Thinkercad® (Autodesk).

A partir del diseño, con ayuda de la impresora 3D Creality Ender-3© se obtuvo el molde de PLA para la obtención de las piezas del *modelo D*, en este caso las piezas obtenidas son macizas y no tienen orificios cilíndricos en su interior (**Figura 10**).

Modelo D

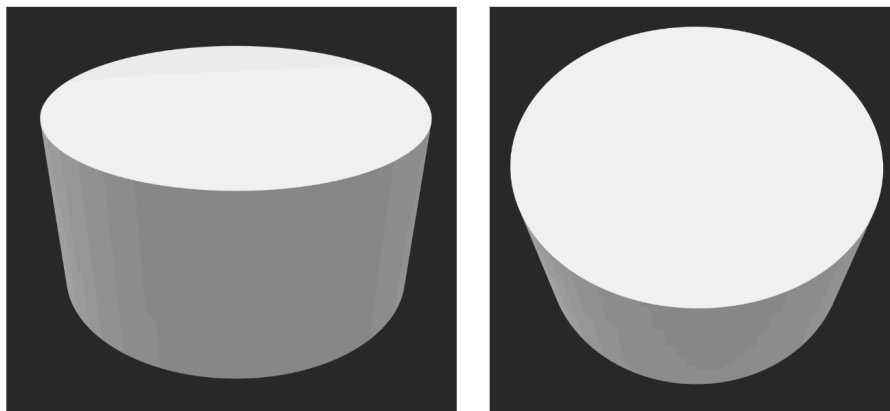


Figura 10: Representación de una pieza del *modelo D* fabricada con cemento donde se muestra la superficie lisa del cilindro. Imagen frontal y superior generada en el programa de diseño Thinkercad®.

3.2 MATERIALES PARA LA IMPRESIÓN Y LA FABRICACIÓN DE LAS PIEZAS

Para la generación de las piezas del *modelo A*, *modelo B* y *modelo C* mediante impresión 3D se utilizó como base la resina Optiprint® Lumina 500 mg/400 mL (Dentona) por tratarse de una resina biocompatible, aprobada para su uso en humanos (**Figura 11A**). Esta resina tiene base de metacrilato y se emplea en la impresión 3D fotopolimerizable. Es idónea para impresoras 3D con fuente de luz en el rango de 385 nm a 405 nm y se engloba dentro de los dispositivos médicos clase IIa. Entre los componentes que presenta, se encuentra el 7,7,9(o 7,9,9)-trimetil- 4,13-dioxo-3,14-dioxa- 5,12-diazahexadecano-1,16 -dilbismetacrilato, cristobalita, trietileno glicol dimetacrilato, ácido 2-propenoico y óxido de difenil (2,4,6-trimetilbenzoil) fosfina.

Para la obtención de las piezas del **modelo D** se utilizó el cemento Palacos®LV (Heraeus; **Figura 11B**). La caja de Palacos®LV contiene un paquete con 40 g de los ingredientes en polvo (polimetilmetacrilato, dióxido de circonio, peróxido de benzoílo y el colorante E141) y una ampolla con 20 mL de los componentes líquidos (metacrilato de metilo, N,N-dimetil-p-toluidina, hidroquinona y el colorante E141). El cemento se preparó mezclando el polvo y el líquido. El cemento utilizado es radiopaco y de baja viscosidad para permitir su fácil manipulación.

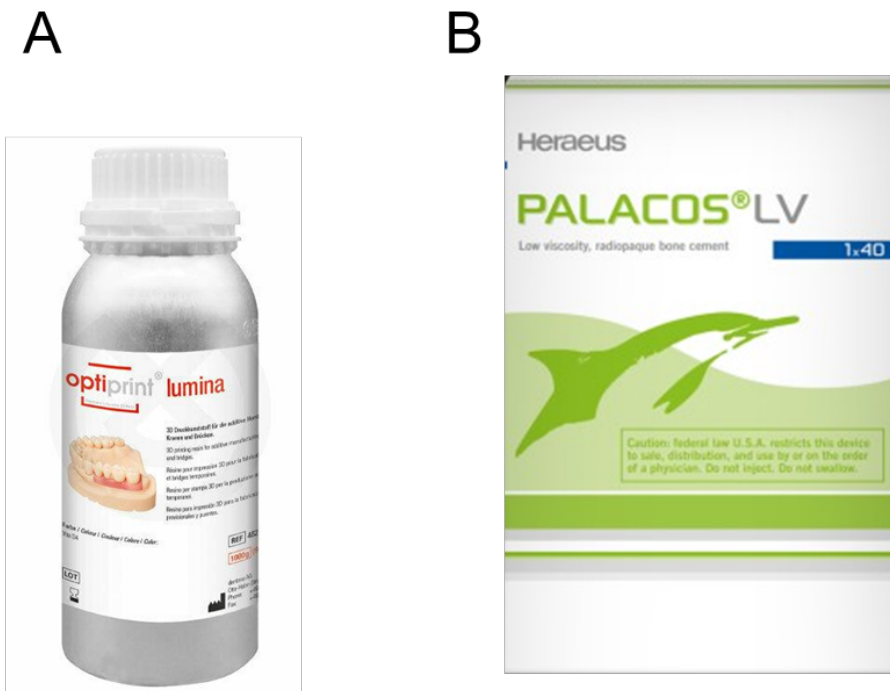


Figura 11: A) Bote de resina de la marca Optiprint® Lumina (Dentona) empleada para la impresión de las piezas del *modelo A*, *modelo B* y *modelo C*. B) Cemento Palacos®LV (Heraeus) utilizado frecuentemente en reconstrucciones quirúrgicas en traumatología y para la fabricación de las piezas del *modelo D*.

3.3 MEZCLA DE ANTIBIÓTICO Y RESINA PARA LA IMPRESIÓN 3D.

En la presente tesis se propone mezclar diferentes antibióticos con la resina Optiprint® Lumina para la impresión de piezas 3D. Para determinar si la mezcla antibiótico-resina era homogénea y apta de ser utilizada para la impresión 3D, a 10 g de la resina se le añadieron progresivamente cantidades crecientes de antibiótico para determinar la homogeneidad de la mezcla.

Para ello, en la balanza de precisión ABJ 220-4NM© (Kern) se introdujo un vaso de precipitados y tras la tara, se pesaron 10 g de resina Optiprint® Lumina. Posteriormente se añadieron cantidades crecientes de antibiótico. Los antibióticos testados fueron la gentamicina (Gentamicina Braun® 3 mg/mL solución para perfusión), levofloxacino (Levofloxacino Normon® 5 mg/mL solución para perfusión), tobramicina (Tobramicina Normon® 100 mg/2 mL solución inyectable) y amoxicilina-clavulánico (amoxicilina/ácido clavulánico Normon® 2000/200 mg polvo para solución para perfusión).

La gentamicina, levofloxacino y tobramicina, al tratarse de antibióticos en solución para perfusión, para añadir la cantidad requerida se utilizaron pipetas monocanal mecánicas, de volumen variable de 10 a 100 µL o de 100 a 1000 µL (Eppendorf). Para la gentamicina y levofloxacino el estudio se inició añadiendo 10 mg de antibiótico a 10 g de resina, para lo cual se le añadieron 3.333 µL de Gentamicina Braun® 3mg/mL o 2.000 µL de Levofloxacino Normon® 5 mg/mL, posteriormente con ayuda de una varilla de vidrio se mezclaron y se dejó reposar durante 5 min. Transcurrido el tiempo las mezclas se separaron en dos fases, no siendo aptas para su impresión 3D.

Resultados similares se obtuvieron con la tobramicina, en este caso el estudio se inició añadiendo 50 mg de tobramicina a 10 g de resina, para lo cual se le añadieron 1.000 µL de Tobramicina Normon® 100 mg/2 mL, posteriormente se procedió a la mezcla con una varilla de vidrio y después de reposar durante 5 min,

se observó que la mezcla se había separado en dos fases, no siendo apta para su impresión 3D.

En el caso de la amoxicilina-clavulánico 2000/200 mg en polvo, a los 10 g de resina se le añadieron 100 mg amoxicilina-clavulánico, se mezcló con la ayuda de una varilla de vidrio, se esperó durante 5 min y transcurrido este tiempo se comprobó la homogeneidad de la mezcla. Se repitió el proceso y se comprobó que se obtenían mezclas homogéneas hasta llegar a añadir 9.200 mg de amoxicilina-clavulánico. Sin embargo, esta mezcla no fue adecuada para imprimir.

3.4 IMPRESIÓN 3D Y FABRICACIÓN DE LAS PIEZAS

Para la impresión de las piezas utilizadas se utilizó la impresora 3D Elegoo Mars 2© (*Figura 12*). Se trata de un modelo de impresora de SLA que sigue el método de impresión “abajo a arriba”. Este equipo se distingue por su gran resolución de capa, que permite la reproducción de pequeños detalles en las estructuras impresas. Con un espesor de capa ajustable entre 0,01 mm y 0,2 mm, adaptándose este espesor a la calidad de impresión según las necesidades específicas. Además, la resolución XY es de 0,05 mm lo que garantiza una reproducción fiel de los diseños.

Otra característica relevante es la precisión del eje Z, que alcanza un valor de 0,00125 mm. Esto asegura que las capas se superpongan con una alineación excepcional, lo que es crucial para obtener resultados precisos y detallados en objetos 3D. Se utilizó una impresora de SLA porque el proceso de polimerización de la resina es independiente del calor, permitiendo así el empleo de antibióticos termosensibles.



Figura 12: Fotografía de la impresora Elegoo Mars 2© empleada en el presente estudio.

En un segundo grupo de experimentos a 10 g de resina se le añadieron de forma progresiva 100 mg de amoxicilina-clavulánico y se procedió a comprobar si la mezcla era apta para la impresión de piezas del **modelo B** y del **modelo C** en la impresora Elagoo Mars 2. Se observó que la adición de cantidades superiores a 4.000 mg de amoxicilina-clavulánico a la resina producía cambios significativos en la viscosidad de la mezcla, que al ser utilizada en la impresión se obtenían piezas con consistencia y dureza no apropiadas. Se comprobó que el límite para la impresión de los modelos 3D era 4 g de amoxicilina-clavulánico por cada 10 g de resina. En la presente tesis se han utilizado mezclas intermedias en las que a 10 g de resina Optiprint® Lumina se les ha añadido 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico. Una vez obtenidas las piezas, estas se trataron siguiendo las instrucciones del fabricante de la resina para su curado y limpieza. Concretamente, una vez finalizada la impresión de las piezas, se lavaron con una

solución de alcohol isopropílico para eliminar los productos de deshecho. Se imprimieron 8 lotes independientes en 8 días diferentes del **modelo B** y del **modelo C**. Cada modelo se imprimió con 10 g de resina Optiprint® Lumina a la que se adicionaron diferentes cantidades de amoxicilina-clavulánico (1, 1,5 o 2 g).

La fabricación de las piezas del **modelo D** se realizó de forma estandarizada de acuerdo con la normativa ISO 5833 (Anexo E) y las instrucciones del fabricante del cemento Palacos®LV (Haraeus). Brevemente, en un recipiente se depositaron los 40 g del componente sólido y se añadieron 2 g de amoxicilina-clavulánico en polvo siguiendo el método de dilución geométrica, obteniendo una mezcla homogénea. A la mezcla se le añadieron los 20 mL del componente líquido y con una espátula se removió vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se dejó reposar 30 segundos para el escape del aire atrapado en su interior y se amasó durante unos dos min hasta obtener una mezcla pastosa que se introdujo en los moldes de PLA. El exceso de cemento alrededor del molde se eliminó con la ayuda de una espátula. Se dejó secar durante 30 min y posteriormente se extrajeron las piezas del **modelo D** de los moldes de PLA. Las piezas del **modelo D** sin amoxicilina-clavulánico se fabricaron de igual manera, excepto que no se le añadió amoxicilina-clavulánico al componente sólido del cemento. Se fabricaron 4 lotes independientes en 4 días diferentes del **modelo C**, en ausencia (0 g) y en presencia de 2 g de amoxicilina clavulánico.

Las piezas impresas con resina (**modelo A**, **modelo B** y **modelo C**) y las fabricadas con cemento (**modelo D**) se pesaron con la balanza de precisión ABJ 220-4NM© (Kern). El peso se registró como el **peso inicial** y se utilizó como un índice de calidad del proceso de fabricación, no se utilizaron aquellas piezas con una desviación del 10% del valor medio. El peso inicial de cada pieza de un mismo lote se promedió para compararlo con el de otros lotes.

3.5 ESTUDIO DE ELUCIÓN DE AMOXICILINA Y CLAVULÁNICO

Para la realización del estudio de elución se siguió el siguiente protocolo. Cada pieza fabricada se depositó en un tubo de 10 mL de vidrio borosilicato Pyrex® (Merck Millipore), al que se le adicionó 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS, acrónimo de phosphate buffer saline; P4417, Merck Millipore). Tras ello, el tubo fue incubado en un baño termostatzado Precistern® (J. P. Selecta) a una temperatura controlada de 37 °C.

3.5.1. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras para el estudio de elución fue realizada a tiempos prefijados de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días. Para ello, en cada tiempo de muestreo se extrajo la totalidad del volumen de PBS inicialmente adicionado, que se almacenó en un tubo Eppendorf® estándar hasta su posterior análisis cromatográfico. Tras ello, se repuso 1 mL de PBS en el tubo de vidrio borosilicato Pyrex® que contenía la pieza. Este procedimiento se repitió para cada tiempo de muestreo, hasta finalizar el protocolo del estudio de elución.

3.5.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.5.2.1. TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Las soluciones almacenadas en los tubos Eppendorf® se sometieron a un proceso de filtración mediante filtros desechables de Nylon® (Agilent Technologies) con un diámetro de poro de 0,45 µm y acoplables a una jeringa de vidrio de 1 mL. Dada la naturaleza de la matriz a medir, la disolución filtrada fue sometida a un minucioso examen macroscópico visual con el objetivo de localizar posibles

impurezas o partículas en suspensión que pudieran haber quedado tras el proceso de filtración.

3.5.2.2. **CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS**

Para la determinación de la amoxicilina y del ácido clavulánico se utilizó el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, acrónimo de *high-performance liquid chromatography*) de módulos integrados Agilent modelo 1200 series (Agilent Technologies) (**Figura 13**). Se empleó una columna C18 Scharlau (150 mm de longitud \times 4,6 mm de diámetro interno y 5 μ m de diámetro de partícula) con una elución por gradiente con una fase móvil A compuesta por tampón fosfato 0,02 M (pH 3,50) y una fase móvil B compuesta por metanol. El porcentaje de fase móvil B fue mantenido en un 5 % durante los 7,5 min iniciales, tras ello se incrementó gradualmente durante 1 min este porcentaje hasta alcanzar un 45 %, manteniéndose así durante 7 min. Finalmente, la columna fue reacondicionada a las condiciones cromatográficas iniciales durante 5 min. Así pues, el tiempo final de análisis cromatográfico fue de 20,5 min. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de la muestra de 10 μ L. Las separaciones se realizaron a una temperatura controlada de 25 °C. La detección espectrofotométrica se efectuó en el detector UV-visible a 230 nm que corresponden al máximo de absorción de ambos analitos.

Para la preparación de las fases móviles se empleó metanol grado HPLC (Multisolvant®, Scharlau) y ácido acético, ácido fosfórico y dihidrogenofosfato de potasio de calidad para análisis (Panreac Química). La disolución de tampón fosfato 0,02 M utilizada para la elaboración de las fases móviles, se preparó por disolución de la cantidad adecuada de dihidrogenofosfato de potasio en agua ultrapura obtenida con el sistema ELGA-PURELAB flex (ELGA Lab. Water). Para el ajuste del pH de las fases móviles y disoluciones tampón se utilizó un pH-

metro (modelo GLP22, Crison Instruments). Las fases móviles se filtraron con filtros desechables de Nylon® de un diámetro de poro de 0,45 µm (Micron Separations).



Figura 13: Equipo modular de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) 1200 series® (Agilent Technologies) utilizado para identificar y cuantificar la amoxicilina y el ácido clavulánico.

3.5.2.3. PREPARACIÓN DE CALIBRADORES Y CONTROLES

Para la preparación de las disoluciones de amoxicilina y ácido clavulánico se empleó la especialidad farmacéutica genérica de uso intravenoso amoxicilina/ácido clavulánico Normon® 2000/200 mg polvo para solución para

perfusión. Se preparó diariamente una disolución de trabajo a una concentración de 20 mg/mL por disolución de la cantidad adecuada de polvo en agua ultrapura. Esta disolución se almacenó a 4° C en la oscuridad.

A partir de esta disolución de trabajo, y empleando PBS como diluyente, se prepararon los respectivos controles para la validación (calibradores y controles). Los calibradores se prepararon para la elaboración de dos rectas de calibrado para cada analito, una de ellas empleada para un rango bajo de concentraciones (1; 5; 10; 25; 50 y 100 mg/L para amoxicilina, y 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/L para ácido clavulánico) y otra para un rango alto (50; 100; 200; 400; 800 y 1600 mg/L para amoxicilina, y 5; 10; 20; 40; 80 y 160 mg/L para ácido clavulánico) (**Figura 14** y **15**). Los controles se prepararon para el rango bajo de concentraciones (1; 5; 50 y 100 mg/L para AMOX, y 0,1; 0,5; 5 y 10 mg/L para CLAV) y para el rango alto (50; 100; 800 y 1600 mg/L para AMOX, y 5; 10; 80 y 160 mg/L para CLAV).

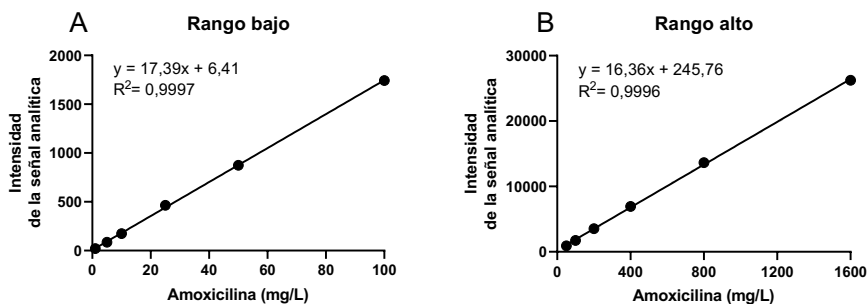


Figura 14: Rectas de calibrado para la amoxicilina, A) en un rango bajo de concentraciones (1; 5; 10; 25; 50 y 100 mg/L) y B) en un rango alto de concentraciones (50; 100; 200; 400; 800 y 1600 mg/L), utilizadas para determinar la concentración de la amoxicilina eluida de las piezas. Cada gráfica muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación R^2 .

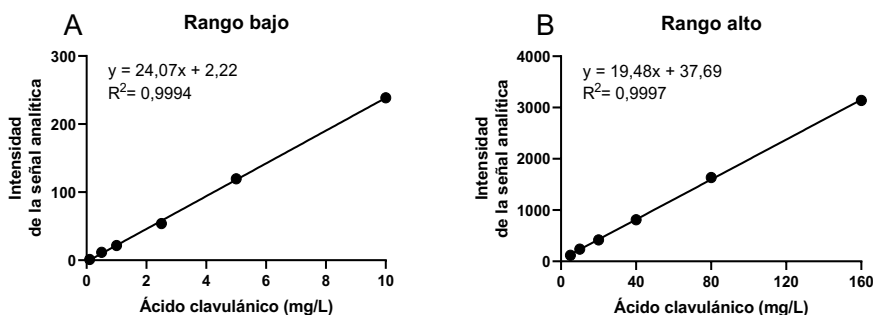


Figura 15: Rectas de calibrado para el ácido clavulánico, A) en un rango bajo de concentraciones (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/L) y B) en un rango alto de concentraciones (5; 10; 20; 40; 80 y 160 mg/L), utilizadas para determinar la concentración del ácido clavulánico eluido de las piezas. Cada gráfica muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación R^2 .

Para la validación de la linealidad se examinó el valor del coeficiente de determinación (R^2) y se utilizó el criterio $R^2 > 0.995$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017 (*Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y calibración*).

Para evaluar la estabilidad del proceso de calibración, se compararon los valores de las ordenadas en el origen (b_0) y de las pendientes (b_1) obtenidos en cada una de las sesiones de trabajo. Diferencias entre los valores obtenidos para b_1 inferiores al 10% se consideraron indicativas de una estabilidad satisfactoria.

Para el control del equipo de HPLC, la adquisición y el tratamiento de los cromatogramas se utilizó el software Chemstation (Versión LC B.04.03, Agilent Technologies). Para los cálculos relativos a la validación de los métodos analíticos desarrollados, la obtención de los estadísticos relacionados con esta, así como para el aseguramiento interno de la calidad, se empleó Microsoft® Excel.

3.6 ESTUDIO DEL PROCESO DE ELUCIÓN

Tras la finalización del estudio de elución de la amoxicilina-clavulánico, las piezas se sacaron de los tubos de vidrio y con ayuda de papel secante se eliminó el líquido de la superficie. Posteriormente las piezas se introdujeron en una estufa de secado Conterm® (J. P. Selecta) y se dejaron 12 h a 60 °C. Una vez transcurrido este tiempo, las piezas se sacaron de la estufa y se pesaron con la ayuda de la balanza de precisión ABJ 220-4NM© (Kern) obteniendo el ***peso de la pieza después de la elución*** de sustancias. La pérdida de peso de cada una de las piezas se determinó restándole al peso inicial de la pieza, el peso de la pieza después de la elución. Esta diferencia fue indicativa de la pérdida de sustancias al colocar la pieza en contacto con el PBS.

Además, para las piezas del ***modelo B*** y ***modelo C*** se calculó la cantidad teórica de amoxicilina-clavulánico que contenían a partir de la fórmula:

$$\text{Amox} - \text{Clav (mg)} = \frac{(\text{Peso inicial pieza [mg]} \times \text{AB añadido a resina [mg]})}{(\text{Resina [mg]} + \text{AB añadido a resina [mg]})}$$

Donde: ***Amox-Clav (mg)***, es la cantidad teórica de amoxicilina-clavulánico que hay en la pieza; ***Peso inicial pieza [mg]***, es el peso en mg de la pieza después de ser impresa; ***Resina [mg]***, son los mg de resina Optiprint® Lumina que se utilizaron para imprimir las piezas, en todos los casos 10.000 mg (10 g) y ***AB añadido a resina [mg]***, son los mg de amoxicilina-clavulánico añadidos a la resina para imprimir la pieza, dependiendo del caso se añadieron 1.000, 1.500 o 2.000 mg.

En el caso de las piezas del ***modelo D*** no fue posible calcular la cantidad de amoxicilina-clavulánico que poseían las piezas, puesto que en el proceso de

fabricación se mezcló un sólido con un líquido y durante el proceso de polimerización podrían perderse un volumen de líquido que no es posible determinar. Para las piezas del **modelo D** no se determinó de forma teórica la cantidad de amoxicilina-clavulánico que poseía la pieza.

Finalmente, para determinar el grado de penetración de un colorante básico en la estructura de las piezas del **modelo B** y del **modelo D** fabricadas con 2 g de amoxicilina-clavulánico, las piezas se sumergieron durante 1 h en un tubo de vidrio borosilicato Pyrex[®] (Merck Millipore), al que se le adicionó 1 mL de solución de azul de metileno al 1% (p/v en agua destilada). Transcurrido este tiempo las piezas se sacaron del tubo, se eliminó el líquido de la superficie con papel secante y se introdujeron en una estufa de secado Conterm[®] (J. P. Selecta) durante 12 h a 60 °C. Una vez transcurrido este tiempo, las piezas se sacaron de la estufa y con la ayuda de una sierra se partieron por la mitad para observar el grado de penetración del colorante.

3.7 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

El estudio microbiológico se realizó en colaboración con el servicio de Microbiología del Hospital Universitario la Fe de Valencia. Se fabricaron piezas del **modelo B** en ausencia (0 g) y en presencia de amoxicilina-clavulánico (2 g). Posteriormente, cada pieza se introdujo en un tubo de vidrio borosilicato Pyrex[®] (Merck Millipore) con 4 mL PBS. A los tiempos prefijados de 12 horas, 1, 2, 3, 5, 7 y 14 días, el PBS se extrajo y se sustituyó por otros 4 mL de PBS. El PBS extraído se utilizó para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las sustancias eluidas de las piezas. Como control se utilizaron las piezas impresas sin amoxicilina-clavulánico.

Para ello se testó con dos cepas de *E. coli* sensible a amoxicilina-clavulánico procedentes de la colección de microorganismos del servicio de Microbiología

que habían sido identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF VITEK®MS (bioMérieux). La sensibilidad a amoxicilina-clavulánico de ambas cepas fue determinada mediante el panel de sensibilidad Microscan® BGN MDR (Beckman Coulter Diagnostics) y mediante la técnica de E-Test en placas de agar Muller-Hinton.

Posteriormente, mediante la técnica de microdilución en placa se calculó la concentración de amoxicilina-clavulánico que poseía cada muestra de PBS y se realizó una curva de elución de la amoxicilina-clavulánico. La técnica de microdilución en placa se realizó en placas de microtitulación con pocillos de fondo en U con una capacidad de 200 µL. En estas placas se determinó la CMI de la amoxicilina-clavulánico contenidos en las muestras de PBS y eluidos de las piezas, y se comparó con el valor de la CMI de las cepas de *E. coli* estudiadas. Así, se obtuvo el valor de la concentración de amoxicilina-clavulánico de las muestras de PBS. Los experimentos se realizaron por duplicado, usando caldo de triptisoja como medio de cultivo. Se realizaron 24 diluciones dobles de la concentración original de la muestra. El experimento se realizó con los correspondientes controles por duplicado de crecimiento para comprobar que la cepa utilizada era viable y comparar su crecimiento con los pocillos con antibiótico, y de esterilidad para comprobar que no hubo contaminaciones durante la preparación del ensayo.

El inóculo bacteriano se preparó a partir de colonias de 20-24 horas de crecimiento, unos 15 min antes de ser usado, con una concentración de microorganismos de 5×10^5 UFC/mL, evitando así un aumento de su concentración por multiplicación bacteriana. Posteriormente, los microorganismos se inocularon a los pocillos de la placa mediante una pipeta multicanal y se incubaron durante 16-20 horas a una temperatura de 36 °C en atmósfera ambiente. La CMI de las cepas se comprobó observando el crecimiento de *E. coli* en el fondo de los pocillos de la placa de microtitulación (**Figura 16**).

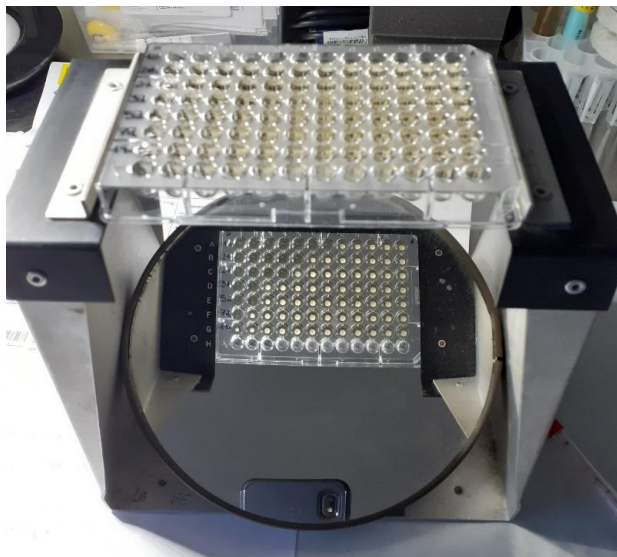


Figura 16: Fotografía de la placa de microtitulación con pocillos en U utilizada para la determinación de la CMI de la amoxicilina-clavulánico en las cepas de *E. Coli* estudiadas.

3.8 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS PIEZAS

Finalmente se procedió a la determinación de la fuerza de compresión que hay que aplicar hasta la rotura de las piezas del **modelo B** impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) y en presencia de 2 g de amoxicilina-clavulánico. Las piezas impresas únicamente con resina (0 g) sirvieron de control para determinar la fuerza de rotura de la resina Optiprint® Lumina polimerizada, fuerza que se comparó con la fuerza de rotura que había que aplicar a las piezas del **modelo B** impresas con 2 g de amoxicilina-clavulánico. En este caso se estudiaron dos grupos de piezas, un grupo en el que las piezas conservaban la amoxicilina-clavulánico, se estudiaron una vez finalizada la impresión (previamente a la elución), para determinar cómo afecta la presencia del antibiótico a la dureza de la resina y otro grupo en el que las piezas se estudiaron

después de la elución durante 7 días, para determinar la fuerza de rotura de la pieza una vez se ha producido la elución de las sustancias.

La fuerza de rotura de las piezas del **modelo B** una vez se produjo la elución se comparó con aquellas piezas fabricadas con cemento, **modelo D** con 2 g de amoxicilina-clavulánico después de la elución del antibiótico, debido a que el cemento es ampliamente utilizado en intervenciones quirúrgicas en traumatología y su eficacia ha sido ampliamente probada.

Para determinar la resistencia mecánica, cada pieza se colocó sobre el carro de desplazamiento inferior de la máquina de ensayo motorizada PCE-MTS500® (PCE instruments) y la fuerza aplicada fue continuamente monitorizada con el dinamómetro PDE-DFG N 5K (PCE instruments) a través del software EDMS v3.0 para Windows (**Figura 17**). El dinamómetro mide la fuerza de compresión que ejerce la máquina de ensayo sobre la pieza, desde 0 a 5.000 N con una precisión del 0,1% en el rango completo de la escala de medición. Además, la máquina de ensayo puede ejercer fuerzas hasta un máximo de 5.000 N con una velocidad de avance del carro de desplazamiento que va desde 30 mm/min hasta 230 mm/min.

Cada una de las piezas se colocó en la máquina de ensayo y se determinó la fuerza de compresión en el cual se producía la rotura de la pieza. Posteriormente, los datos registrados y almacenados en el ordenador se trataron con el programa Microsoft® Excel para obtener las gráficas de fuerza de compresión aplicada hasta la rotura de la pieza en función del tiempo.

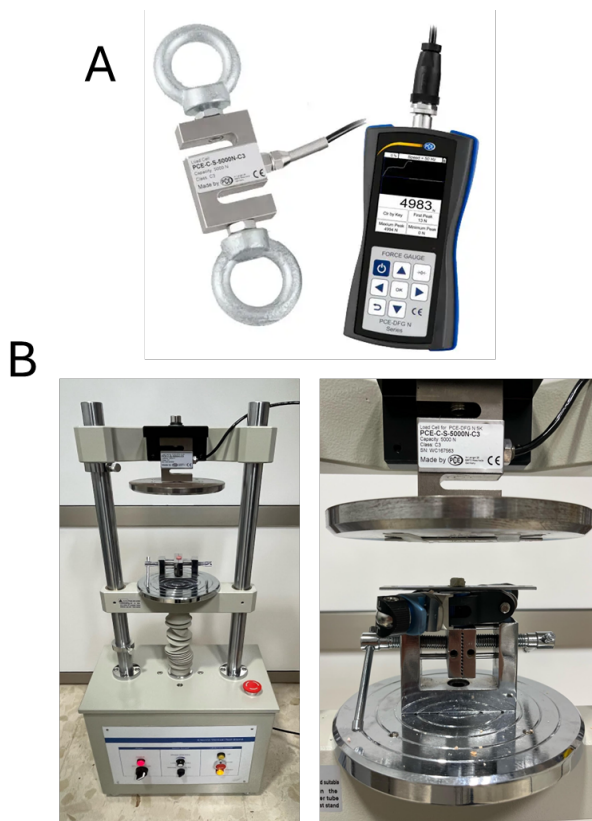


Figura 17: A) Dinamómetro PCE-DFG N 5K® (PCE instruments) para el monitorización y registro de la fuerza de compresión aplicada sobre la pieza. B) Máquina de ensayo motorizada PCE-MTS500® (PCE instruments) utilizada para colocar la pieza y generar la fuerza de compresión.

3.9 DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

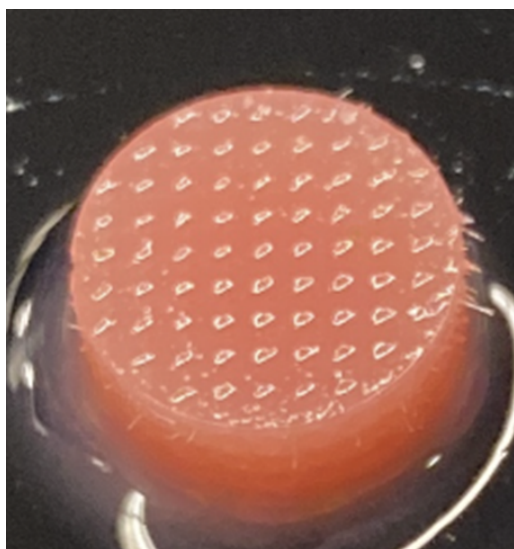
Los datos obtenidos se expresaron como media \pm error estándar de la media. En los experimentos en los que se determinó la elución de amoxicilina o ácido clavulánico en función del tiempo se calculó el área bajo la curva en unidades arbitrarias en las diferentes condiciones experimentales. Para determinar las diferencias de las medias entre 2 grupos se utilizó una prueba *t-student*. Para determinar las diferencias entre 3 grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test de Bonferroni. En todos los casos una

probabilidad menor de 0,05 ($P < 0,05$) se consideró significativa. El análisis estadístico se realizó con el software Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 IMPRESIÓN Y FABRICACIÓN DE LAS PIEZAS

Se obtuvieron piezas cilíndricas de 10 mm de diámetro y 5 mm de altura. Inicialmente, se diseñó un modelo con orificios cilíndricos de 0,5 mm de diámetro separados por 1 mm, en la base y la superficie lateral, *modelo A*. En la **Figura 18** se observa una pieza impresa del *modelo A*.



Sin antibiótico

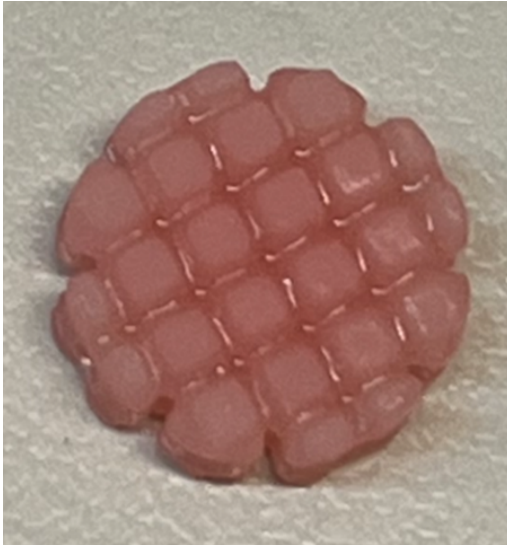
Con 1 g de Amox + Clav

Con 1,5 g de Amox + Clav

Con 2 g de Amox + Clav

Figura 18: Pieza del *modelo A* impresa con la resina Optiprint® Lumina en la impresora Elegoo Mars 2 donde se muestran los orificios de 0,5 mm de diámetro espaciados 1 mm.

El *modelo A* se descartó debido a la obliteración de los orificios tras su impresión, por el pequeño tamaño de estos. Para evitar este problema se diseñaron otros dos modelos con orificios más grandes. El *modelo B* con orificios cilíndricos de 1 mm de diámetro espaciados cada 2 mm, tanto en la base como en la superficie lateral (**Figura 19**) y el *modelo C* con orificios cilindros de 2 mm de diámetro espaciados cada 4 mm, en la base y la superficie lateral (**Figura 19**). Los orificios de estas piezas impresas no se obliteraban durante la impresión y permitieron analizar la elución de la amoxicilina-clavulánico a partir de estas estructuras.



Sin antibiótico

Con 1 g de Amox + Clav

Con 1,5 g de Amox + Clav

Con 2 g de Amox + Clav

Figura 19: Pieza del *modelo B* impresa con la resina Optiprint® Lumina en la impresora Elegoo Mars 2 donde se muestran los orificios de 1 mm de diámetro espaciados 2 mm.



Sin antibiótico

Con 1 g de Amox + Clav

Con 1,5 g de Amox + Clav

Con 2 g de Amox + Clav

Figura 20: Pieza del *modelo C* impresa con la resina Optiprint® Lumina en la impresora Elegoo Mars 2 donde se muestran los orificios de 2 mm de diámetro espaciados cada 2 mm.

4.1.1 FABRICACIÓN DE LOS LOTES DEL *MODELO B* Y *MODELO C*.

Las piezas del *modelo B* impresas sin adicionar amoxicilina-clavulánico (0 g) tuvieron un peso medio de 337 ± 18 mg y un coeficiente de variación del 5,3% (*Figura 21, Tabla 2*). Las piezas impresas con 1 g, 1,5 g o 2 g de amoxicilina-clavulánico tuvieron pesos y coeficientes de variación similares ($P > 0,05$) a las piezas que no tenían fármacos, lo que sugiere que la adición de amoxicilina-clavulánico en las cantidades indicadas no modificó significativamente el peso promedio de las piezas.

Las piezas del *modelo C* impresas únicamente con la resina Optiprint® Lumina tuvieron un peso medio de 328 ± 15 mg y un coeficiente de variación del 4,6 % (*Figura 21*). La impresión del *modelo C* con 1 o 1,5 g de amoxicilina-clavulánico no modificó significativamente el peso de las piezas. Sin embargo, la impresión con 2 g incrementó significativamente el peso medio de las piezas y aumentó el coeficiente de variación, sugiriendo que el incremento del porcentaje de amoxicilina-clavulánico en la resina produce mayor heterogeneidad en el peso.

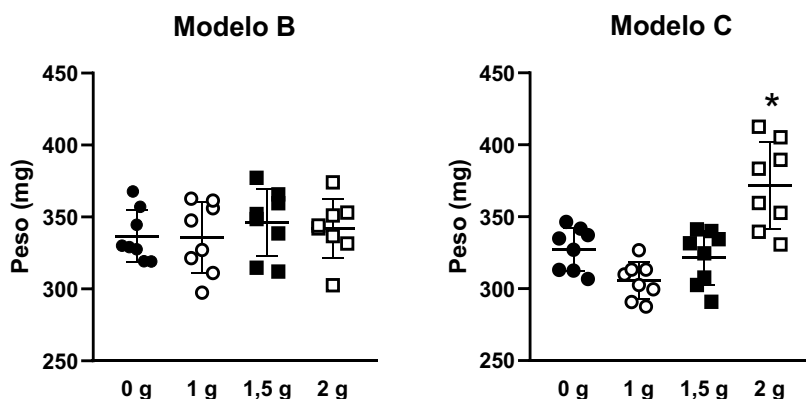


Figura 21: Pesos medios de los 8 lotes independientes de las piezas del *modelo B* y *modelo C* impresos con la resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) o en presencia de amoxicilina-clavulánico (1, 1,5 o 2 g). * $P < 0,05$ comparado con grupo de piezas impresas con 0, 1 y 1,5 g de amoxicilina-clavulánico.

La comparación de los pesos medios del **modelo B** con los del **modelo C** sin antibiótico (0 g) no mostró diferencias estadísticamente significativas en los pesos de las piezas (337 ± 8 mg vs 328 ± 15 mg, respectivamente). Cuando se comparó el peso las piezas del **modelo B** y del **modelo C** impresas con 1 o 1,5 g de amoxicilina-clavulánico se observó una disminución significativa en el peso de las piezas del **modelo C**. Sin embargo, cuando se imprimió con 2 g de amoxicilina-clavulánico el peso medio de las piezas del **modelo C** se incrementó significativamente, indicando que la cantidad de amoxicilina-clavulánico añadido a 10 g de resina cambia las características de las piezas impresas, efecto que es más notable en las piezas del **modelo C** (Figura 22 y Tabla 2).

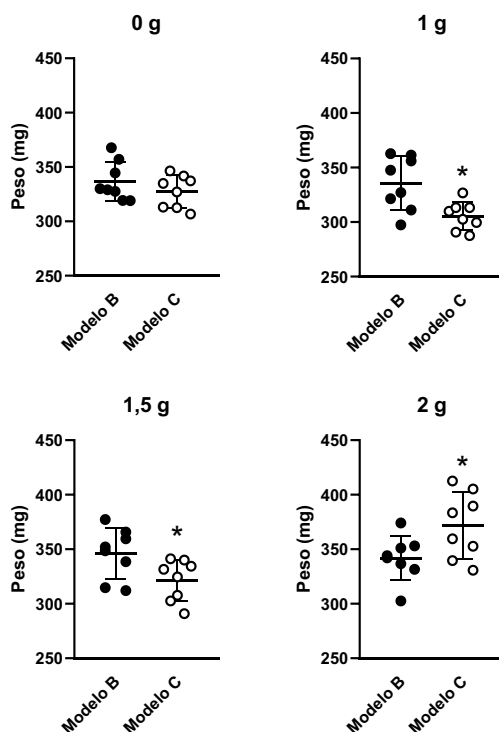


Figura 22: Comparación de los pesos medios de los 8 lotes del **modelo B** y del **modelo C** impresos con 10 g de la resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) y en presencia de 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico. Los puntos representan la media de cada uno de los 8 lotes de fabricación para cada una de las condiciones experimentales. * $P < 0.05$ comparado con el **modelo B**.

Tabla 2: Peso medio y coeficiente de variación (CV) de las piezas del *modelo B* y del *modelo C* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) o en presencia de 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico.

Amoxi-Clav		<i>Modelo B</i>	<i>Modelo C</i>
0 g	Peso (mg)	337±18	328±15
	CV (%)	5,3	4,6
1 g	Peso (mg)	336±25	306±13#
	CV (%)	7,4	4,2
1,5 g	Peso (mg)	346±23	322±19#
	CV (%)	6,7	5,9
2 g	Peso (mg)	342±20	372±30*#
	CV (%)	6,0	8,2

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar. * $P < 0,05$ versus piezas impresas en ausencia (0 g) y en presencia de amoxicilina-clavulánico 1 g y 1,5 g; # $P < 0,05$ versus piezas del *modelo B* impresas con la misma cantidad de amoxicilina-clavulánico.

4.2 ESTUDIO DE LA ELUCIÓN DE AMOXICILINA Y ÁCIDO CLAVULÁNICO.

Tras obtener las piezas de cada uno de los modelos, se procedió al análisis de elución de amoxicilina y ácido clavulánico. Se estudiaron 5 piezas de cada modelo impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina con 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico. Se determinó la concentración de amoxicilina y ácido clavulánico eluidos por cada pieza cada 24 horas durante 7 días. La **Figura 23** muestra un ejemplo de cromatograma de las sustancias eluidas de una pieza del *modelo B* impresa con 10 g de resina con 2 g de amoxicilina-clavulánico durante las primeras 24 horas.

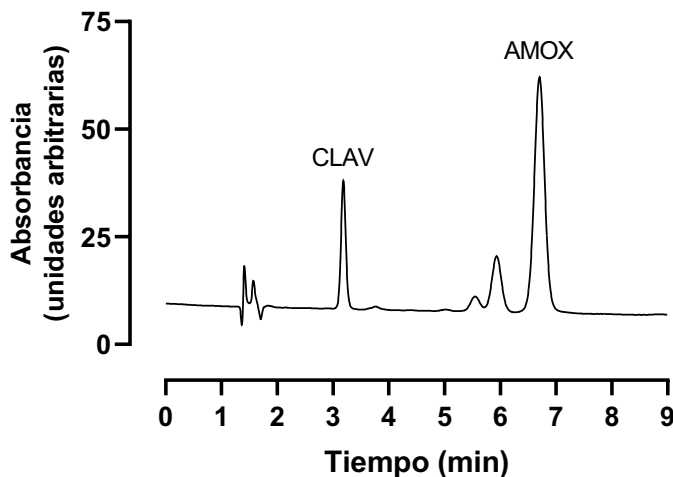


Figura 23: Cromatograma representativo de la detección de la amoxicilina (AMOX) y el ácido clavulánico (CLAV) eluidos durante 1 día de una pieza del *modelo B* impresa con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 2 g de amoxicilina-clavulánico. Fase móvil compuesta por tampón fosfato (KH_2PO_4) 0,02 M (pH ajustado a 3,0 con H_3PO_4)/metanol (modo de elución de gradiente). Columna de fase reversa C18 Scharlau (150 mm de longitud x 4,6 mm diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula) con un flujo de 1,0 mL min^{-1} y un volumen de inyección de 10 μL . Detección UV/Visible λ 230 nm.

4.2.1 ELUCIÓN DE AMOXICILINA.

El *modelo B* impreso con 1 g de amoxicilina-clavulánico a las 24 horas eluyó 122 ± 17 mg/L de amoxicilina. Esta cantidad disminuyó de forma importante a los 2 días ($9,4 \pm 1,6$ mg/L) y continuó disminuyendo los siguientes días hasta alcanzar un estado estacionario a partir del quinto día (*Figura 24* y *Tabla 3*). Como control se utilizaron 5 piezas del *modelo B* impresas únicamente con la resina Optiprint® Lumina sin amoxicilina-clavulánico (0 g). En todos los casos la liberación de amoxicilina fue indetectable (*Datos no mostrados*).

La *Figura 24* recoge los valores de elución y el área bajo la curva, índice de la elución total de amoxicilina durante los 7 días, indicando que el *modelo B* con 2 g de amoxicilina-clavulánico liberó más amoxicilina que el de 1,5 g y este más que el de 1 g.

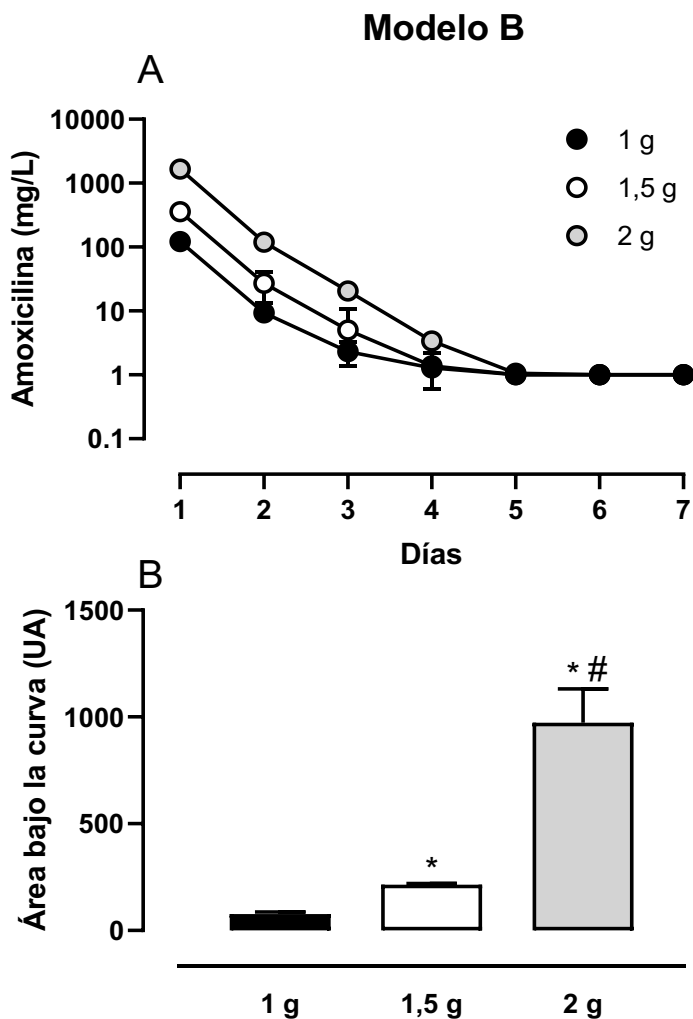


Figura 24: A) Elución de amoxicilina de piezas del *modelo B* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de amoxicilina en unidades arbitrarias. * $P < 0.05$ versus piezas impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus con piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico.

Tabla 3: Valores de la elución de amoxicilina por las piezas del *modelo B* impresas con la mezcla de 10 g de la resina Optiprint® Lumina con 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días.

Modelo B	Liberación de amoxicilina (mg/L)		
	1 g	1,5 g	2 g
1 ^{er} día	122 ± 17	356 ± 31	1655 ± 118
2 ^o día	9,4 ± 1,6	27 ± 8,0	119 ± 12
3 ^{er} día	2,3 ± 0,9	5,0 ± 2,1	21 ± 2,0
4 ^o día	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,7	3,4 ± 0,4
5 ^o día	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,1 ± 0,2
6 ^o día	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
7 ^o día	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de la media de 5 piezas diferentes en cada condición experimental.

Se realizaron experimentos similares con el **modelo C**. En las piezas impresas con 10 g de resina y 1 g de amoxicilina-clavulánico, se obtuvo una elución a las 24 horas de 31±5 mg/L. la cantidad disminuyó de forma importante a los 2 días 5,8±0,6 mg/L y a partir del cuarto día se alcanzó el estado estacionario (**Figura 25 y Tabla 4**). La **Figura 4-9** recoge los valores de elución y el área bajo la curva, como índice de la elución total de amoxicilina durante los 7 días, y al igual que ocurrió con el **modelo B**, el **modelo C** con 2 g liberó más amoxicilina que el de 1,5 g y este más que el de 1 g.

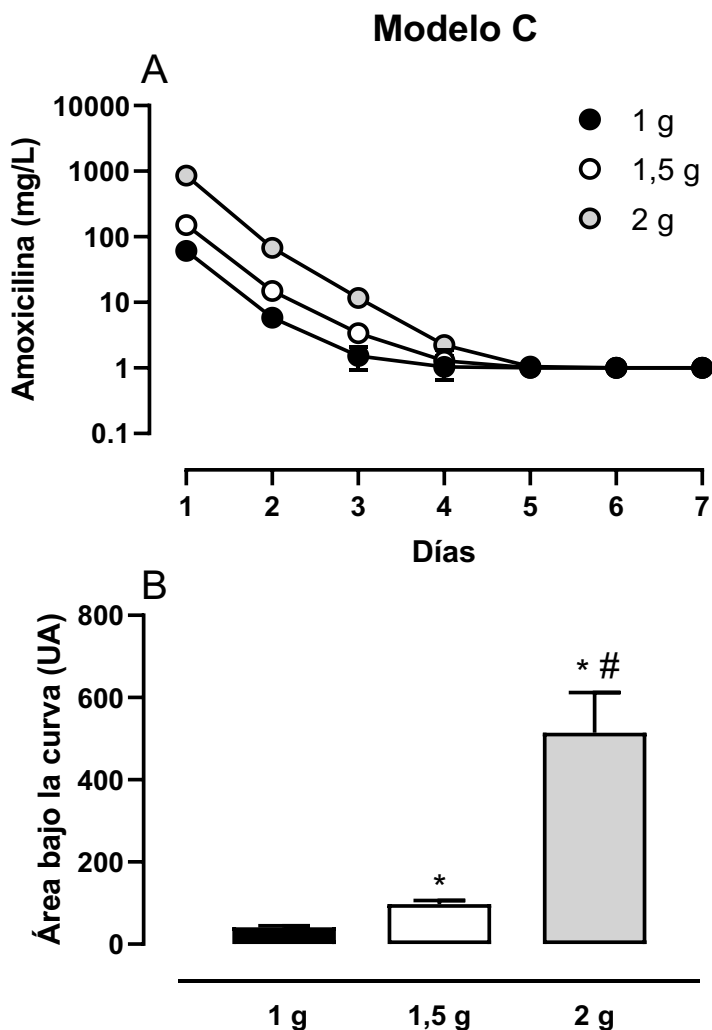


Figura 25: A) Elución de amoxicilina de piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de amoxicilina con el tiempo. * $P < 0.05$ versus *modelo C* con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico.

Tabla 4: Valores de la elución de amoxicilina por las piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días.

<i>Modelo C</i>	Elución de amoxicilina (mg/L)		
	1 g	1,5 g	2 g
1 ^{er} día	31 ± 5	151 ± 10	860 ± 174
2 ^o día	5,8 ± 0,6	15 ± 4	68 ± 13
3 ^{er} día	1,5 ± 0,6	3,4 ± 0,6	12 ± 1
4 ^o día	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,6	2,2 ± 0,7
5 ^o día	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
6 ^o día	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
7 ^o día	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de la media de 5 piezas diferentes en cada condición experimental.

La comparación de la liberación de amoxicilina entre el *modelo B* y el *modelo C* se muestra en la **Figura 26**. En todos los casos las piezas del *modelo B* eluyeron más amoxicilina que las del *modelo C* hasta llegar al estado estacionario. En las piezas del *modelo B* el estado estacionario se alcanzó alrededor del quinto día de elución mientras que en las piezas del *modelo C* ocurrió alrededor del cuarto día.

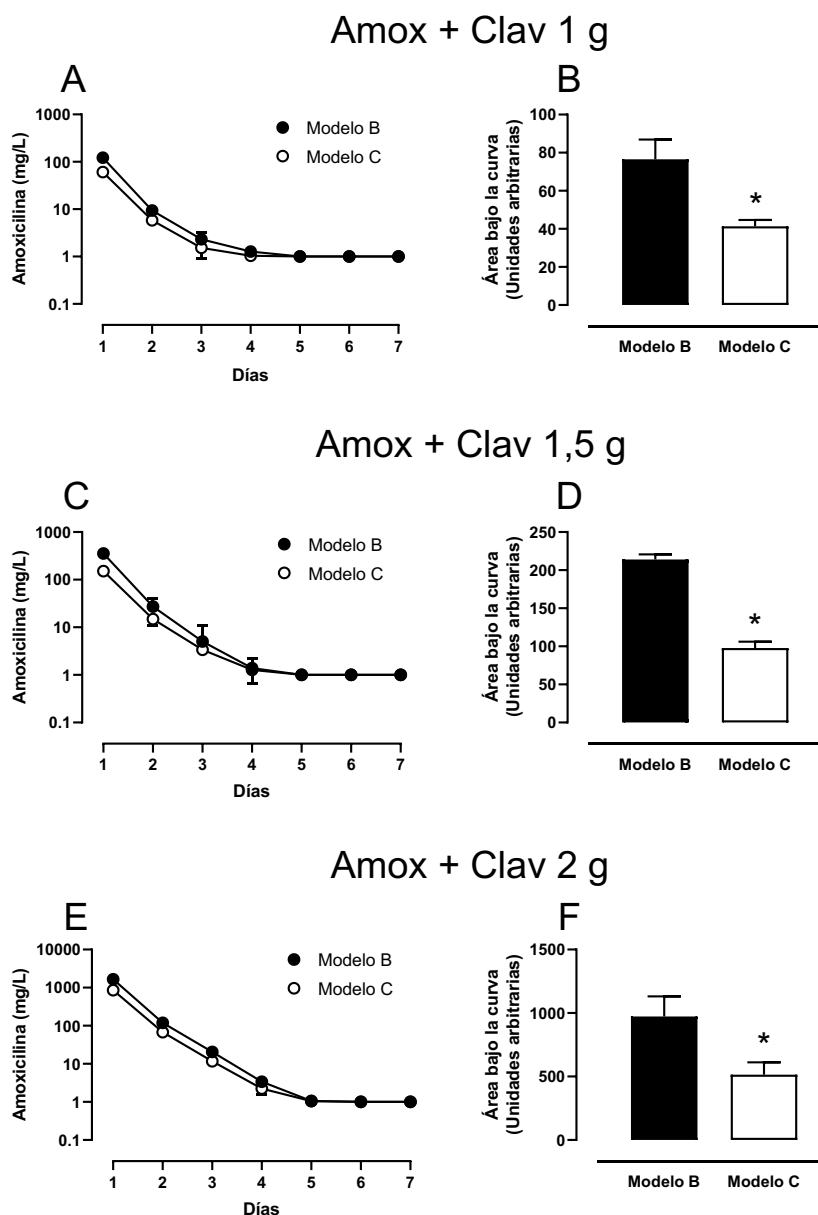


Figura 26: Paneles A), C), E) Comparación de la elución de amoxicilina entre las piezas del *modelo B* y *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico (Amox + Clav) cada 24 horas durante 7 días. Paneles B), D), E) Área bajo la curva de la elución de amoxicilina. * $P < 0.05$ versus el *modelo B*.

4.2.2 ELUCIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO.

En el análisis de elución de ácido clavulánico, el **modelo B** impreso con 1 g de amoxicilina-clavulánico a las 24 horas liberó $9,3 \pm 1,0$ mg/L de ácido clavulánico. Esta cantidad disminuyó de forma importante a los 2 días ($0,84 \pm 0,2$ mg/L) y continuó disminuyendo los siguientes días hasta alcanzar un estado estacionario a partir del cuarto día (**Figura 27** y **Tabla 5**).

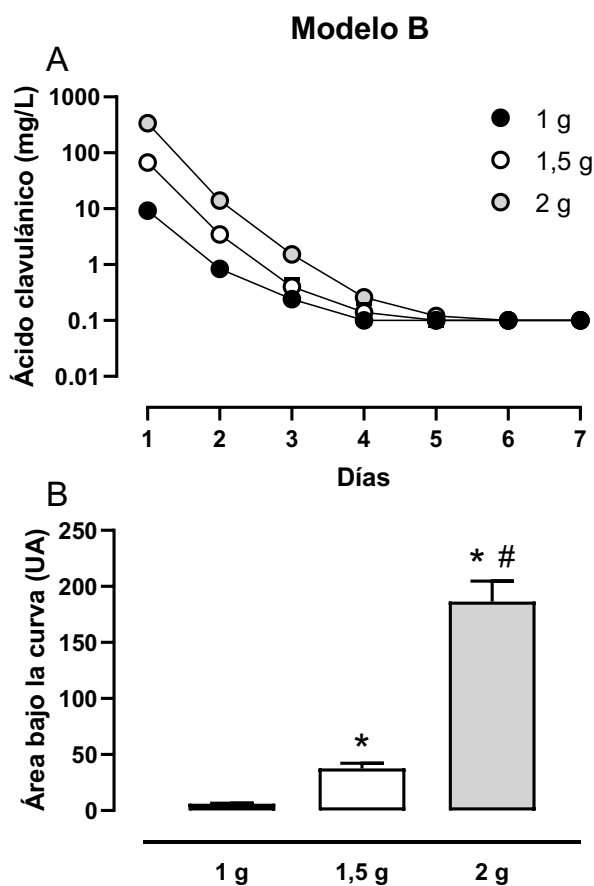


Figura 27: A) Elución de ácido clavulánico de piezas del *modelo B* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de ácido clavulánico. * $P < 0.05$ versus piezas impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico.

Tabla 5: Valores de la elución de ácido clavulánico por las piezas del *modelo B* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días.

<i>Modelo B</i>	Elución de ácido clavulánico (mg/L)		
	1 g	1,5 g	2 g
1 ^{er} día	9,3 ± 1,0	67 ± 9	340 ± 36
2 ^o día	0,84 ± 0,2	3,5 ± 0,8	14 ± 1
3 ^{er} día	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	1,9 ± 0,2
4 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,3 ± 0
5 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
6 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
7 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de la media de 5 piezas diferentes en cada condición experimental.

La **Figura 27B** recoge los valores del área bajo la curva como índice de la liberación total de ácido clavulánico durante los 7 días. Las piezas impresas con 2 g de antibiótico liberaron más ácido clavulánico que las impresas con 1,5 g y éstas más que las impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico.

El máximo de elución del ácido clavulánico por las piezas del *modelo C* se obtuvo a las 24 horas, disminuyendo notablemente a los 2 días y alcanzando el estado estacionario a partir del cuarto día (**Figura 28 y Tabla 6**). El área bajo la curva, indicativo de la elución de ácido clavulánico durante los 7 días, fue mayor cuanto mayor fue la cantidad de amoxicilina-clavulánico con la que se imprimió la pieza. Se obtuvieron diferencias significativas entre las piezas de 1, 1,5 y 2 g de amoxicilina-clavulánico (**Figura 28B**).

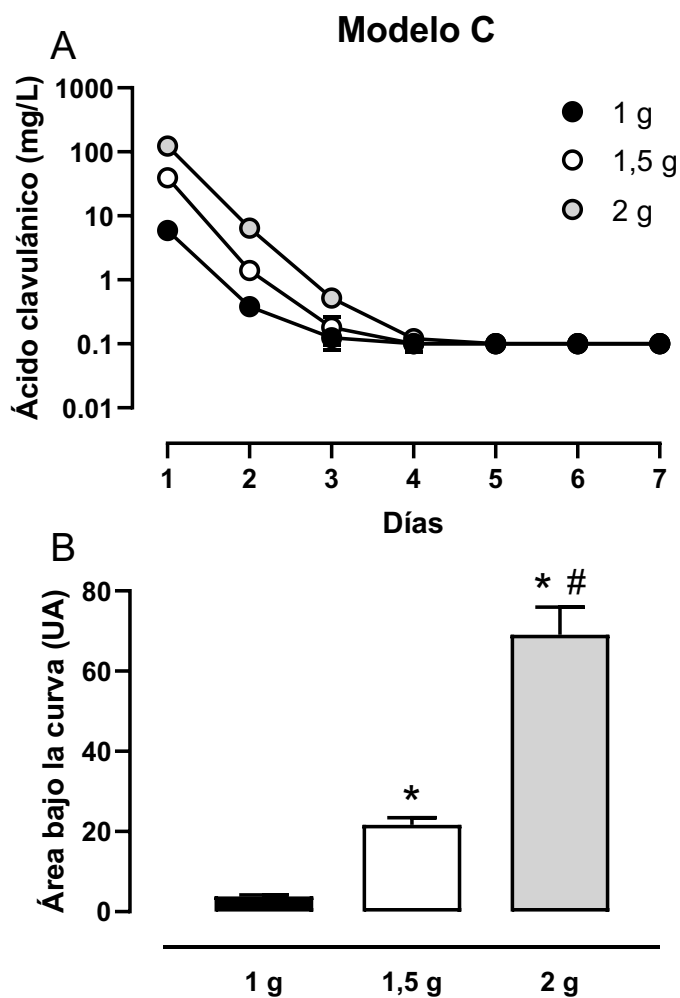


Figura 28: A) Elución de ácido clavulánico de piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días. B) Área bajo la curva de la elución de ácido clavulánico con el tiempo. * $P < 0.05$ versus piezas impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico. # $P < 0,05$ versus piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico.

Tabla 6: Valores de la elución de ácido clavulánico por las piezas del *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico cada 24 horas durante 7 días.

<i>Modelo C</i>	Elución de ácido clavulánico (mg/L)		
	1 g	1,5 g	2 g
1 ^{er} día	5,9 ± 0,7	39 ± 3	123 ± 13
2 ^o día	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,3	6,4 ± 0,8
3 ^{er} día	0,1 ± 0	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1
4 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
5 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
6 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
7 ^o día	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de la media de 5 piezas diferentes en cada condición experimental.

La comparación de la elución de ácido clavulánico entre las piezas del *modelo B* y *modelo C* impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico mostró que las piezas del *modelo B* liberaron significativamente más ácido clavulánico. Resultados similares se obtuvieron cuando las piezas fueron impresas con 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico, indicando que las piezas del *modelo B* eran capaces de eluir una mayor cantidad de ácido clavulánico en todos los casos estudiados (*Figura 29*).

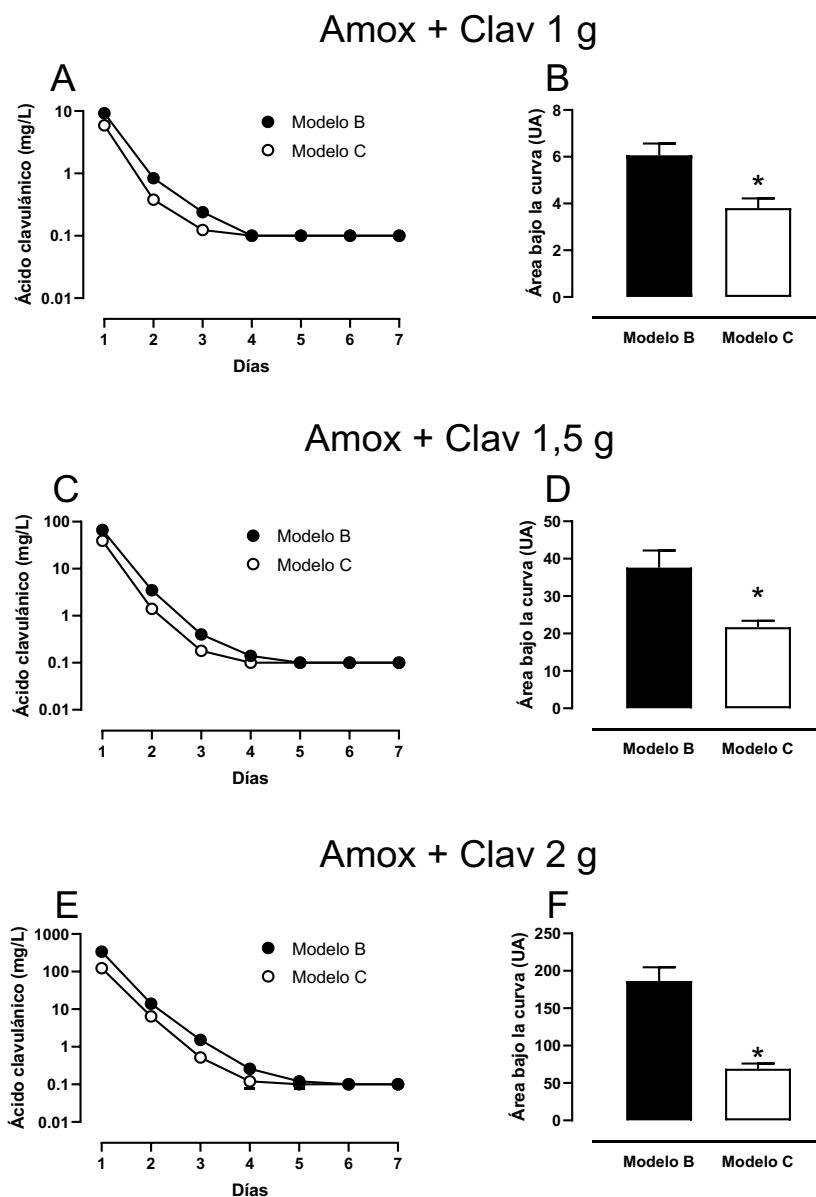


Figura 29: Paneles A), C), E) Comparación de la elución de ácido clavulánico entre las piezas del *modelo B* y *modelo C* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico (Amox + Clav) cada 24 horas durante 7 días. Paneles B), D), E) Área bajo la curva de la elución de ácido clavulánico. * $P < 0.05$ versus el *modelo B*.

4.2.3 ELUCIÓN DE AMOXICILINA Y ÁCIDO CLAVULÁNICO DEL *MODELO D*.

El *modelo D* fabricado con el cemento Palacos®LV al que se le añadieron 2 g de amoxicilina-clavulánico, para estudiar la elución de estas sustancias, ya que actualmente es el material más empleado en la traumatología. La **Figura 30** recoge la elución de amoxicilina cada 24 horas durante 7 días y la **Figura 31** la elución de ácido clavulánico.

La elución de amoxicilina o ácido clavulánico fue máxima a las 24 horas y disminuyó de forma importante en el segundo día. En ambos casos se alcanzó un estado estacionario a partir del cuarto día.

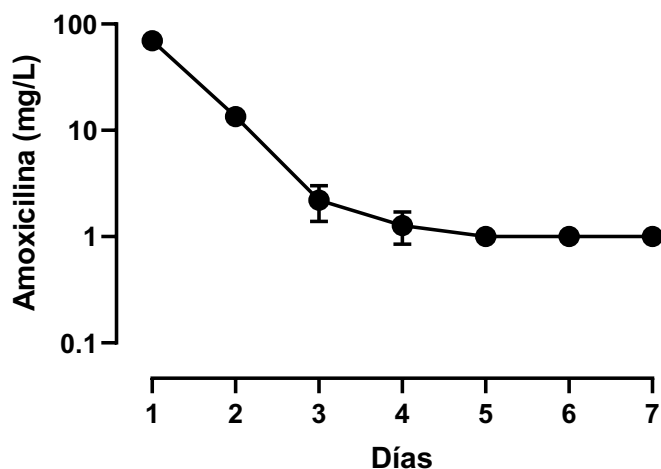


Figura 30. Elución de amoxicilina de las piezas del *modelo D* cada 24 horas durante 7 días.

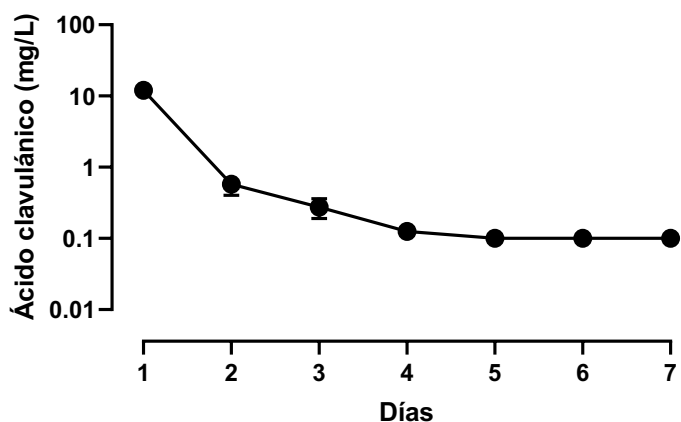


Figura 31 Elución de ácido clavulánico de las piezas del *modelo D* cada 24 horas durante 7 días.

4.3 ESTUDIO DEL PESO DE LAS PIEZAS TRAS LA ELUCIÓN.

Tras realizar el estudio de elución de amoxicilina y ácido clavulánico, las piezas se desecaron y se pesaron para estudiar la pérdida de peso en cada caso. Las piezas del *modelo B* impresas con 1 g de amoxicilina-clavulánico pasaron de pesar 351 ± 15 mg a pesar 321 ± 15 mg después de la elución, con una disminución media de $30,3 \pm 6,2$ mg de peso. En las piezas impresas con 1,5 g de amoxicilina-clavulánico, el peso medio fue 358 ± 15 mg, y después de la elución de los fármacos fue de 317 ± 15 mg, con una variación de $40,6 \pm 6,9$ mg. Finalmente, en el caso de las piezas impresas con 2 g de amoxicilina-clavulánico, el peso medio inicial fue de 319 ± 45 mg, el peso final fue de 247 ± 35 mg con una variación de $71,9 \pm 12,1$ mg (**Figura 32** y **Tabla 7**). El peso teórico de amoxicilina-clavulánico del *modelo B* atendiendo al peso de la pieza impresa con 2 g de antibiótico fue de $53,2 \pm 7,5$ mg, confirmándose que existía una mayor pérdida de peso que cantidad de amoxicilina-clavulánico en la pieza, sugiriendo que al añadir una

mayor proporción de fármacos parte de la resina Optiprint® Lumina no polimerizó adecuadamente y fue eliminada en el proceso de elución.

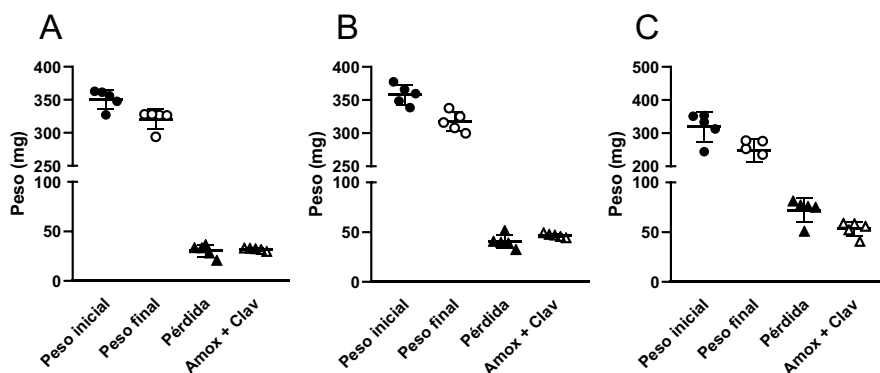


Figura 32: Valores del peso medio antes (●) y después (○) de la elución de la amoxicilina-clavulánico de las piezas del *modelo B* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina y con A) 1 g, B) 1,5 g y C) 2 g de amoxicilina-clavulánico. Para cada pieza se calculó la diferencia entre el peso inicial y el peso después de la elución, indicativo de la pérdida de peso (▲) y el peso teórico de amoxicilina-clavulánico calculado a partir del peso inicial de cada pieza (△).

En las piezas del *Modelo C* se observaron datos similares a los de las piezas del *modelo B*. Los valores se muestran en la *Figura 33* y *Tabla 7*.

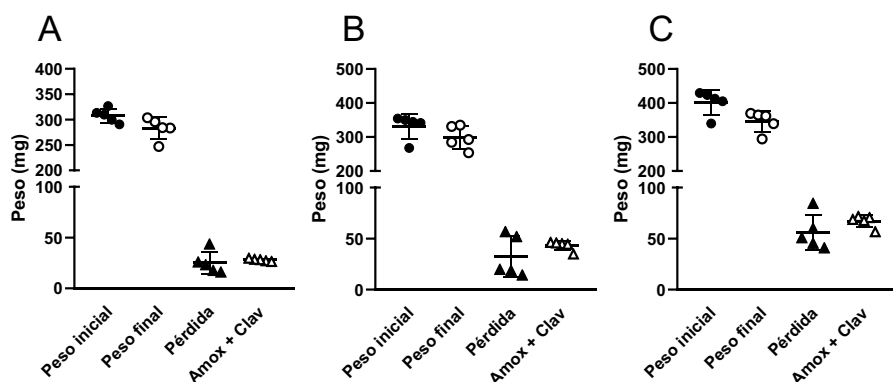


Figura 33: Valores del peso medio antes (●) y después (○) de la elución de la amoxicilina-clavulánico de las piezas del *modelo C* impresas con 10 g de la resina Optiprint® Lumina y con A) 1 g, B) 1,5 g y C) 2 g de amoxicilina-clavulánico. Para cada pieza se calculó la diferencia entre el peso inicial y el peso después de la elución, indicativo de la pérdida de peso (▲) y el peso teórico de amoxicilina-clavulánico calculado a partir del peso inicial de cada pieza (Δ).

Tabla 7: Valores medios del peso inicial, peso final después de la elución, variación del peso y cantidad teórica de amoxicilina-clavulánico (Amox-Clav) en las piezas del *modelo B* y del *modelo C* impresos con 10 g de resina Optiprint® Lumina y 1, 1,5 o 2 g de amoxicilina-clavulánico.

	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Variación (mg)	Amox-Clav (mg)
Modelo B				
1 g	351 ± 15	321 ± 15	30,3 ± 6,2	31,9 ± 1,4
1.5 g	358 ± 15	317 ± 15	40,6 ± 6,9	46,7 ± 1,9
2 g	319 ± 45	247 ± 35	71.9 ± 12	53,2 ± 7,5
Modelo C				
1 g	308 ± 14	283 ± 22	25,2 ± 11	28,0 ± 1,3
1.5 g	332 ± 36	299 ± 34	32.2 ± 20	43.3 ± 4,7
2 g	402 ± 36	346 ± 17	56.3 ± 17	67,0 ± 6,0

Los valores se muestran como la media ± desviación estándar de la media de 5 piezas diferentes en cada condición experimental.

También, se realizó un análisis del peso tanto previo como posterior a la elución de amoxicilina-clavulánico del **modelo D**. Las piezas del **modelo D** tuvieron un peso medio tras la fabricación de 388 ± 26 mg. Tras la elución y desecación de las piezas, el peso medio fue de 387 ± 26 mg. Por lo tanto, la disminución media fue de $0,8 \pm 0,8$ mg (**Figura 4-17**). En este caso, y debido a las características de fabricación de las piezas, no es posible calcular la cantidad aproximada de amoxicilina-clavulánico contenida en las piezas fabricadas por este método y el valor no indica.

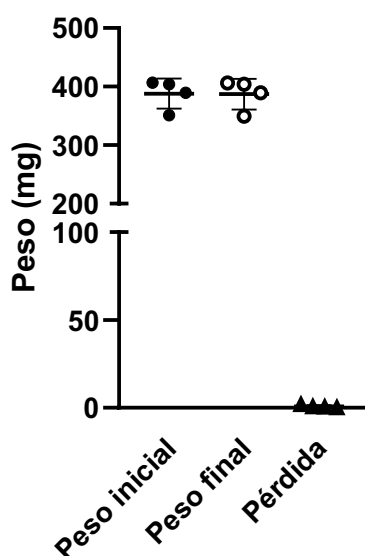


Figura 34: Valores del peso medio antes (●) y después (○) de la elución de la amoxicilina-clavulánico de las piezas del **modelo D** fabricadas con cemento Palacos®LV con 2 g de amoxicilina-clavulánico. Para cada pieza se calculó la diferencia entre el peso inicial y el peso después de la elución, indicativo de la pérdida de peso (▲).

Finalmente, para determinar el grado de penetración de un colorante básico en las estructuras fabricadas, piezas del **modelo B** y del **modelo D** con 2 g de amoxicilina-clavulánico se sumergieron en una solución de azul de metileno al

1%. El **modelo B** muestra coloración azul distribuida por toda la estructura, indicando que el azul de metileno penetró y tiñó toda la estructura. Sin embargo, en el caso del **modelo D**, únicamente se observó coloración azul en la superficie de la pieza, no encontrando coloración azul en el interior (**Figura 35**). Estos resultados indican que el azul de metileno es capaz de teñir la resina Optiprint® Lumina a través de la red que forma la resina polimerizada pero no a través del cemento. Pudiendo ser uno de los motivos que podrían explicar la diferente elución de amoxicilina-clavulánico de las piezas impresas con resina y las fabricadas con el cemento.

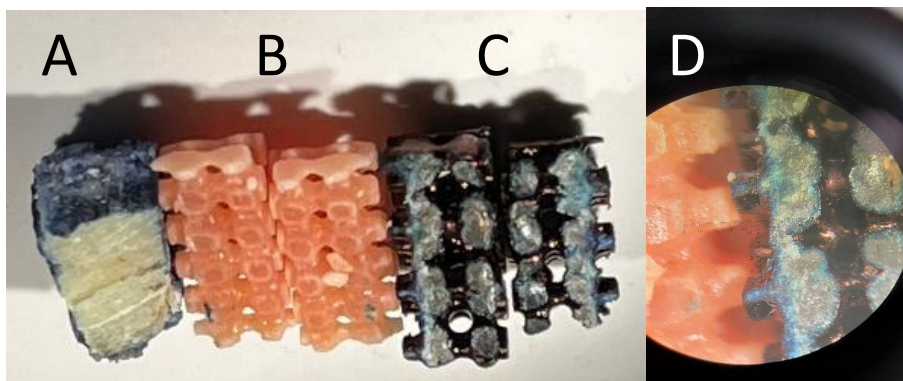


Figura 35: A) Pieza del *modelo D* sumergida en una solución de azul de metileno, desecada y partida por la mitad, donde se puede observar que el azul de metileno tiñe la superficie de la pieza, pero no ha penetrado por el interior de la pieza. B) Pieza del *modelo B* sin sumergir y partida por la mitad donde se observa el color de la resina Optiprint® Lumina y C) pieza del *modelo B* sumergida en la solución de azul de metileno, desecada y partida por la mitad, donde se observa que el azul de metileno ha penetrado a través de la red polimerizada de la resina. D) Fotografía ampliada de la pieza del *modelo B* antes y después de haberse sumergido en una solución de azul de metileno.

4.4 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Las piezas del **modelo B** impresas con 2 g de amoxicilina-clavulánico fueron las escogidas para el estudio microbiológico por ser las que eluyeron mayor cantidad de fármacos. Las piezas se sumergieron en 4 mL de PBS y tras 12 h, se extrajo el PBS y se repuso por 4 mL de PBS nuevo. El PBS extraído se utilizó para determinar su capacidad antimicrobiana mediante la observación del crecimiento de las colonias *E. coli* sensible a amoxicilina-clavulánico. El proceso se repitió al 1^{er}, 2^o, 3^{er}, 5^o, 7^o y 14^o día. Se utilizó un grupo control de piezas del **modelo B** impreso únicamente con la resina Optiprint® Lumina, sin antibiótico, para determinar si existía efecto microbicida por parte de la resina.

Tras analizar los resultados obtenidos por la técnica de microdilución en placa, se observó que las muestras sin antibiótico no tenían efecto microbicida en las cepas de *E. coli*, a diferencia de las piezas con amoxicilina-clavulánico. A las 12 h el PBS con las sustancias eluidas mostró una capacidad microbicida similar a una concentración de 896-512 mg/L, disminuyendo de forma progresiva hasta el día 14, en el que la capacidad microbicida fue similar a una muestra con 8 mg/L (**Figura 36 y Tabla 8**).

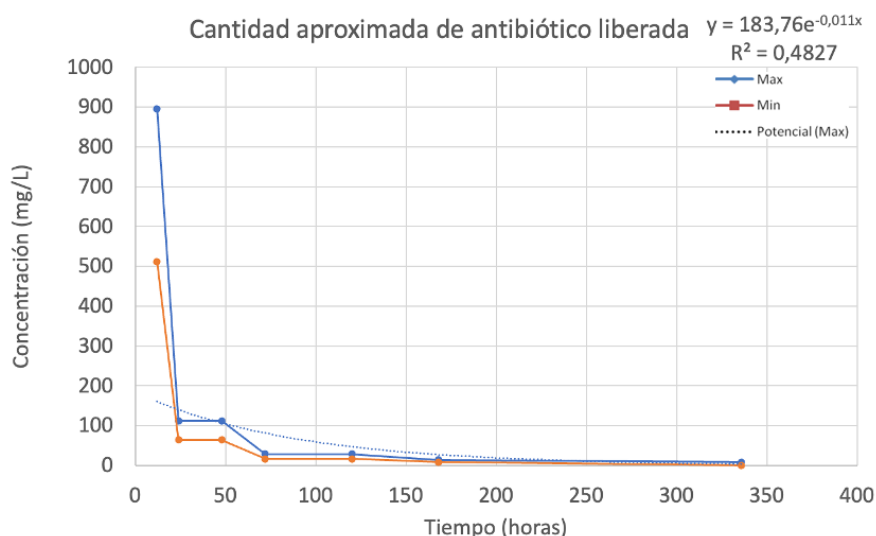


Figura 36: Curva con el máximo y el mínimo de la elución de antibiótico en las colonias de *E. coli* sensible a amoxicilina-clavulánico.

Tabla 8: Valores de la equivalencia de la capacidad microbicida en las colonias de *E. coli* sensible a amoxicilina-clavulánico de las soluciones de PBS con el antibiótico eluido a los diferentes tiempos de las piezas del *modelo B* impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) y en presencia de 2 g de amoxicilina-clavulánico.

Tiempo	<i>Modelo B</i>	
	0 g	2 g
12 horas	0 mg/L	896-512 mg/L
1 día	0 mg/L	112-64 mg/L
2 días	0 mg/L	112-64 mg/L
3 días	0 mg/L	28-16 mg/L
5 días	0 mg/L	28-16 mg/L
7 días	0 mg/L	14-8 mg/L
14 días	0 mg/L	8-0 mg/L

4.5 ESTUDIO MECÁNICO

Para el estudio mecánico se utilizaron piezas del **modelo B** impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina en ausencia (0 g) y en presencia de 2 g de amoxicilina-clavulánico, antes (2 g pre) y después (2 g post) de la elución de los fármacos durante 7 días. Para la prueba se utilizaron 3 piezas de cada modelo y se sometieron a fuerzas de compresión crecientes hasta llegar a la rotura de la pieza. La **Figura 37** muestra ejemplos de registro de la fuerza compresión aplicada a piezas del **modelo B** en las diferentes condiciones experimentales.

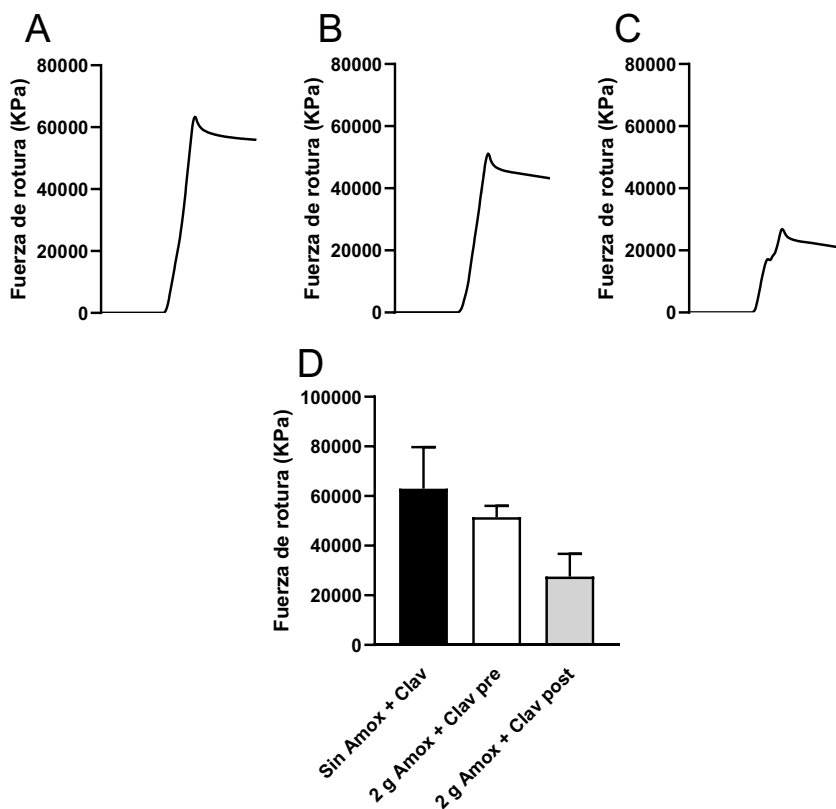


Figura 37: Registros de la fuerza de compresión aplicada hasta la rotura de las piezas del *modelo B*, impresas con 10 g de resina Optiprint® Lumina, A) en ausencia (Sin Amox + Clav) o en presencia de 2 g de amoxicilina-clavulánico, B) antes (2 g Amox + Clav pre) y C) después (2 g Amox+ Clav post) de la elución de los fármacos. D) Valores medios y desviación estándar de la fuerza de rotura de las piezas del *modelo B* en las diferentes condiciones experimentales.

Las piezas del *modelo B* que se imprimieron únicamente con la resina Optiprint® Lumina, a las que no se les añadió antibiótico, mostraron mayor resistencia a la rotura que aquellas a las que se les añadió 2 g de amoxicilina-clavulánico. La adición de amoxicilina-clavulánico redujo un 18 % la fuerza de rotura de las piezas. Además, cuando las piezas impresas con 2 g de amoxicilina-clavulánico habían eluido durante 7 días los fármacos, la fuerza de rotura todavía fue menor,

reduciendo aproximadamente un 56 % la resistencia de la pieza impresa sin fármacos.

La fuerza de rotura de las piezas del **modelo B** después de la elución de la amoxicilina-clavulánico (2 g post) se compararon con las piezas del **modelo D** fabricadas con cemento y 2 g de amoxicilina-clavulánico después de la elución de los fármacos. La **Figura 38** muestra una pieza del **modelo B** y otra del **modelo D** después de aplicarles la fuerza que provoca la rotura de la pieza.



Figura 38: Fotografía de una pieza del **modelo B** (izquierda) y **modelo D** (derecha) fabricadas con 2 g de amoxicilina-clavulánico y tras la elución de los fármacos durante 7 días a las que se les ha aplicado la fuerza de rotura.

La fuerza de compresión aplicada para la rotura de la pieza del **modelo D** fue más del doble que la aplicada para la rotura del **modelo B** (**Figura 39**), indicando que la pieza fabricada con cemento y amoxicilina-clavulánico tiene una mayor dureza que la impresa con la resina Optiprint® Lumina, aunque la pieza del **modelo B** aún presenta una importante resistencia a la rotura, incluso después de haber eluido los fármacos.

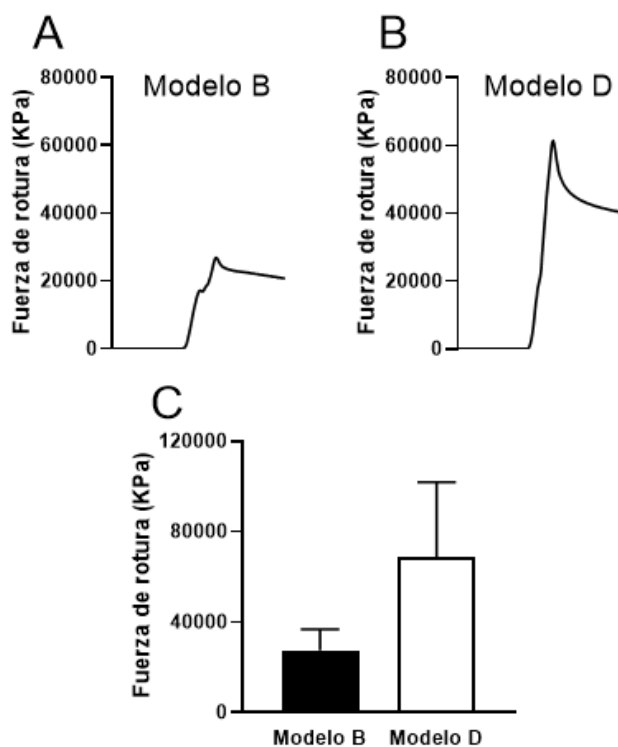


Figura 39: Registro de la fuerza de compresión desarrollada hasta la rotura de A) una pieza del *modelo B* y B) una pieza del *modelo D* fabricadas con 2 g de amoxicilina-clavulánico después de la elución de los fármacos durante 7 días. C) Valores medios de la fuerza de rotura de la pieza del *modelo B* y *modelo D* fabricadas con 2 g de amoxicilina-clavulánico después de la elución de los fármacos durante 7 días.

5 DISCUSIÓN

En la actualidad existe un incremento de las resistencias a los antibióticos, convirtiéndose en una crisis global de salud (132,233). Por ello, es necesario desarrollar nuevas estrategias que amplíen la utilización de antibióticos de forma local en patologías tan complejas como las infecciones osteoarticulares. La impresión 3D, mediante la creación de piezas tridimensionales, permite desarrollar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento del paciente.

Aunque las impresoras tipo SLA no han sido ampliamente empleadas en el campo de la sanidad debido a la limitación de las resinas fotocurables, cada vez se están utilizando más junto con la adición de medicamentos, como el paracetamol o el ácido paraaminosalicílico de forma exitosa (234). También se ha empleado recientemente con antibióticos como el norfloxacino mediante el diseño de cápsulas 3D para su liberación sostenida mediante microgránulos (235), siendo una herramienta útil y una alternativa a otro tipo de impresoras en el campo de la sanidad. Por ello y debido a las ventajas que posee frente a otro tipo de impresoras tradicionales, como las FDM, hemos utilizado en este trabajo la impresora tipo SLA para obtener piezas con amoxicilina-clavulánico, fármacos que no se emplean de forma habitual con otros *cárriers* ya que sus propiedades farmacológicas se ven alteradas por los mismos, teniendo como objetivo ampliar las opciones terapéuticas para el facultativo, a la vez que obtener un objeto 3D personalizado para su aplicación.

En la presente tesis hemos demostrado que es posible obtener piezas impresas con resina-antibiótico que permiten la elución progresiva y eficaz del fármaco a lo largo de los días. Una de las ventajas de fabricar las piezas con impresión 3D es que se puede diseñar y modificar el tamaño, la forma, las capas e incluso la densidad de orificios para modificar la elución del fármaco.

La cantidad de fármaco que se emplea en la mezcla es importante, dado que una mayor proporción antibiótico-resina dificulta la obtención de una mezcla

homogénea que permita la impresión, formando un acúmulo del antibiótico en el fondo del tanque de la impresora. En las fases iniciales del estudio se determinó que el empleo de 2 g de amoxicilina-clavulánico con 10 g de resina producía una mezcla homogénea, que permitía obtener una pieza similar a la obtenida únicamente con resina. Debido a la alta viscosidad de la resina, para establecer las proporciones se decidió pesar la resina, en vez de coger un volumen. Después de la obtención de una mezcla homogénea resina-antibiótico se procedió a la impresión de las piezas.

La utilización local de la amoxicilina-clavulánico en traumatología siempre ha sido limitada, debido a la imposibilidad de administrar los fármacos junto con el cemento, debido a que son termolábiles. El PMMA en el proceso de polimerización aumenta significativamente la temperatura, alterando las propiedades fisicoquímicas de la amoxicilina-clavulánico (122,127). Esta limitación en el empleo de amoxicilina-clavulánico frente a microorganismos sensibles, justifica la necesidad de emplear otros antibióticos termoestables de mayor espectro y toxicidad (236,237). Como demuestra nuestro estudio, es posible obtener piezas del modelo B impresas con resina y 2 g de amoxicilina-clavulánico que eluyeron de forma eficaz los fármacos, alcanzándose concentraciones promedio de amoxicilina de 1.655 mg/L en las primeras 24 horas que decayeron progresivamente hasta el 7º día, con una concentración de 1 mg/L. De igual manera, el ácido clavulánico alcanzó concentraciones de 340 mg/L en las primeras 24 horas, que disminuyeron progresivamente hasta 0,1 mg/L el 7º día. El diseño de la pieza y de sus orificios en contacto con el líquido modificó la elución de amoxicilina-clavulánico. El modelo C con una menor densidad de agujeros en su superficie eluyó concentraciones menores en las primeras 24 horas, tanto de amoxicilina (860 mg/L) como de clavulánico (23 mg/L). Esto es similar a lo que se observa con antibióticos termoestables en el PMMA, en el cual

a mayor superficie de contacto se obtiene una mayor liberación del antibiótico (238).

Todas las piezas se diseñaron con el mismo tamaño, pero con diferente densidad de orificios, a mayor densidad de los orificios se producía una mayor elución del antibiótico, debido a que el mayor número de perforaciones aumenta la superficie de contacto con el líquido. Por este motivo, en el estudio microbiológico y mecánico se han empleado únicamente piezas del modelo B dado que eran las que mostraron mayor elución de amoxicilina-clavulánico.

Las piezas utilizadas en el estudio fueron pesadas tras su impresión previamente al análisis de la elución de fármacos. Además, fueron nuevamente pesadas tras el proceso de elución. Esto permitía determinar si existía una correcta elución del antibiótico, y si se correspondía con el peso de los fármacos añadidos. Se observó que la pérdida de peso tras la elución de antibiótico de las piezas del modelo B impresas con 1 y 1,5 g, correspondía con el peso estimado de amoxicilina-clavulánico añadido a la pieza. Sin embargo, en las piezas impresas con 2 g la pérdida de peso tras la elución era mayor que el peso estimado de amoxicilina-clavulánico en la pieza. Este incremento en la pérdida de peso podría deberse al aumento de antibiótico en la resina, que alteraría el proceso de polimerización y la presencia de residuos de resina no polimerizada que se eliminarían durante la elución. A pesar de esto, se ha podido comprobar que el proceso de polimerización de la resina no afecta a la actividad del antibiótico, determinada mediante su capacidad bactericida que alcanzó una actividad *in vivo* similar a 14-8 mg/mL de amoxicilina-clavulánico frente a cepas de *E. coli* a los 7 días.

Una de las limitaciones del uso de las resinas en las impresoras 3D son los posibles residuos tóxicos que se pueden generar y los efectos secundarios que pueden producir. Por este motivo se empleó la resina biocompatible Optiprint, dispositivo médico de Clase IIA. En el estudio microbiológico se comprobó que

la resina no tenía efectos antimicrobianos. Se realizó un estudio comparativo entre la capacidad antibacteriana de la resina en ausencia y en presencia de antibiótico. Se demostró que las piezas sin fármaco no inhibieron el crecimiento de las cepas de *E. coli*, mientras que aquellas piezas impresas con resina-antibiótico tenían claros efectos antimicrobianos, poniendo de manifiesto que los efectos estaban mediados por la amoxicilina-clavulánico.

Existen pocos estudios que analicen si la luz UV de las impresoras láser modifican las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de los antibióticos. Como ejemplo se ha descrito que la luz UV altera las propiedades fisicoquímicas de la tetraciclina, degradándose hasta un 75% (239,240). Otros antibióticos como la rifampicina han sido empleados en la impresión SLA para fabricar parches transdérmicos para su liberación controlada, con resultados aparentemente prometedores en los que no se afectan las propiedades del antibiótico (241).

Ranganathan *et al.* (242) analizaron el efecto de la luz UV en la impresión de piezas con una resina experimental formada por polietilenglicol y diacrilado de polietilenglicol a la que añadieron doxiciclina o vancomicina. Tras realizar la impresión, se colocaron las piezas en placas de Petri con *E. coli* y se observó que la doxiciclina mantenía su actividad y sus propiedades tras someterse a la impresión con luz UV. Sin embargo, las piezas impresas con vancomicina fueron afectadas por la luz UV, perdiendo un 35% de la eficacia a las 10 horas. Los resultados obtenidos en nuestros estudios de elución y microbiológico concuerdan con los de la doxiciclina. La utilización de luz UV para la impresión de las piezas con amoxicilina-clavulánico no mostró cambios en sus propiedades farmacológicas, obteniendo una respuesta efectiva sobre la inhibición del crecimiento de colonias de *E. coli*. Además, se observó que incluso pasados 14 días existía respuesta al antibiótico inhibiendo el crecimiento de las colonias de *E. coli*, con concentraciones similares a 8 mg/L de amoxicilina-clavulánico.

Comparado la SLA con otras modalidades de impresión 3D, existen importantes diferencias con respecto a la impresión FDM. En la literatura se describen diversos estudios que demuestran que se pueden fabricar piezas con impresoras FDM utilizando filamento de PLA y que liberan antibiótico durante unas 2 semanas (242). Sin embargo, no se disponen de filamentos comerciales de PLA cargados con antibiótico, por lo que la incorporación del antibiótico es un proceso que requiere de la habilidad y destreza del operador. En algunos casos, el filamento se ha mezclado con el fármaco directamente durante el proceso de extrusión (243) y en otros se ha añadido al propio filamento introduciéndolo en soluciones con altas concentraciones de fármaco (190). También se han descrito máquinas específicamente diseñadas para producir filamento cargado con el producto que se desea añadir y luego obtener piezas más homogéneas con la impresión FDM (192).

Sin embargo, no siempre se han obtenido las piezas con la cantidad de fármaco deseada. Otra alternativa que ha sido utilizada es fabricar las piezas por impresión FDM y posteriormente sumergirlas en una solución concentrada de antibiótico. Qamar *et al.* (244) observaron que, al sumergir las piezas impresas en una disolución concentrada de ciprofloxacino, al estudiar el proceso de elución apenas obtuvieron concentraciones del fármaco y estas fueron poco homogéneas. Esta es una de las formas descritas para salvaguardar una de las grandes limitaciones que posee la impresión FDM: la temperatura. Sin embargo, no siempre se pueden “evitar” las altas temperaturas durante la extrusión del filamento, como observaron Scaffaro *et al.* con la cefazolina, obteniendo cantidades liberadas prácticamente indetectables (245). Por esta razón, la mayoría de los fármacos termolábiles no pueden emplearse directamente en las impresoras basadas en FDM (246), en estos casos hay que buscar otras alternativas a la impresión por extrusión (247).

Se ha demostrado que antibióticos termoestables, como la gentamicina mezclada con filamento de PLA, son capaces de aguantar altas temperaturas, entre 160 °C y 175 °C, durante el proceso de extrusión sin que sus propiedades se vean alteradas (248). Por tanto, aunque la impresión FDM es útil para su utilización con antibióticos termoestables como la gentamicina, la doxiciclina o el ciprofloxacino (249), no sería útil para fármacos termolábiles como la amoxicilina-clavulánico, requiriendo otras alternativas de impresión 3D para emplear estos fármacos u otro tipo de antibióticos termolábiles como la amikacina (250).

En el presente estudio se ha demostrado que la impresión SLA con resina biocompatible permite emplear antibióticos termolábiles como la amoxicilina-clavulánico sin que sus propiedades se vean afectadas por el proceso de impresión. Además, la obtención de la mezcla resina-antibiótico para su impresión 3D es más sencilla y no depende de factores como el tamaño y el grosor del filamento.

Cui *et al.* emplearon piezas similares a las de nuestro estudio con distintas densidades de orificios en su superficie, utilizando el ciprofloxacino como antibiótico y la impresión tipo FDM. Estudiaron la elución del antibiótico en función de los orificios que tenía la pieza, comprobando su efectividad frente a la inhibición del crecimiento de cepas de *E. coli* y *S. Aureus*. Observaron que, dependiendo del diseño de la pieza se producía mayor o menor elución del antibiótico, obteniendo mayor elución cuantos más orificios se añadían a la pieza, debido a la mayor superficie de contacto con el medio líquido (251). En nuestro estudio, se observó que el colorante azul de metileno tiñó toda la estructura de la pieza impresa con resina, indicando que el medio líquido pasaba por el interior de la pieza permitiendo la elución del antibiótico, que junto con la posibilidad de emplear fármacos termolábiles en las piezas obtenidas por impresión SLA, supone una ventaja del empleo de la resina frente al PLA.

El estudio de Tappa *et al.* se realizó en gránulos de PLA y gentamicina obtenidos mediante impresión FDM y la impregnación del filamento con antibiótico por el método de recubrimiento de aceite (252). Sin embargo, aunque demostraron su efectividad frente a cepas de *E. coli*, el tiempo de elución fue menor al obtenido en nuestro estudio con amoxicilina-clavulánico, suponiendo otra clara ventaja de la resina frente al PLA.

La reproducibilidad de los objetos fabricados por impresión 3D ha sido un tema estudiado en múltiples ocasiones, debido a la trascendencia que tiene fabricar piezas de iguales dimensiones con diferentes impresoras y operarios, manteniendo las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las piezas (253,254). En nuestro estudio hemos podido determinar la reproducibilidad de la impresión SLA de las piezas fabricadas con la resina y la resina mezclada con distintas cantidades de antibiótico. La impresión se realizó en 8 días diferentes con resina sin antibiótico y con resina a la que se le adicionó 1, 1,5 o 2 g para la fabricación de los modelos B y C. Las piezas obtenidas tuvieron un coeficiente de variación que aumentaba de forma proporcional a la cantidad de antibiótico añadida a la resina, llegando a un valor máximo del 8,2 % con las piezas impresas con la resina y 2 g de amoxicilina-clavulánico. Es posible que las moléculas de antibiótico puedan interferir en el proceso de polimerización de la resina, de tal manera que cuanto mayor sea la cantidad de antibiótico mayor alteración de la polimerización y mayor coeficiente de variación en el peso de las piezas impresas.

Finalmente, las piezas del modelo B fueron sometidas a la máquina de ensayo PCE-MT5500 para determinar sus propiedades mecánicas, por ser el modelo que mejores resultados obtuvo en cuanto a la elución de antibiótico. En el estudio mecánico se observó que las piezas del modelo B impresas únicamente con resina, sin antibiótico, presentaban una resistencia tensil media de 62.000 KPa, valor que coincide con la resistencia descrita previamente en la literatura (256). Las piezas del modelo B con 2 g de antibiótico mostraron un valor medio de

51.445 KPa. El mismo modelo después de la elución del antibiótico redujo su resistencia ténsil a la rotura a un valor medio de 25.706 KPa. Esta disminución de la resistencia ténsil demuestra que la eliminación del antibiótico de la estructura de la pieza hace que sea más frágil con una disminución importante de la resistencia a la rotura, pero que mantiene valores aceptables de resistencia mecánica. Los valores mecánicos de las piezas impresas con resina y antibiótico, previamente a su elución, son similares a los valores de los objetos impresos únicamente con la resina según las especificaciones del fabricante (255). Estos valores son superiores a los descritos en la literatura de las fuerzas tensiles que soporta el PLA, con valores máximos de 47.000 KPa (257), y por tanto, los objetos con antibiótico impresos por SLA presentan mayor resistencia tensil que los impresos por FDM.

La anisotropía mecánica de la impresión FDM es de las más grandes, de aproximadamente el 50%, a diferencia de la impresión mediante SLA, cuya anisotropía es de apenas un 1% (256). Se ha descrito, que las fuerzas tensiles que pueden soportar los objetos obtenidos mediante impresión SLA (66.000 KPa) son mayores que la de los objetos obtenidos mediante la impresión tipo FDM (33.000 KPa). La fuerza tensil aumenta cuando el grosor de la capa aumenta debido a que la zona de las piezas donde se produce la fractura suele encontrarse entre las capas de impresión, donde se produce la polimerización. Por la baja anisotropía y la buena polimerización que se produce entre una capa y la siguiente, las piezas impresas en SLA tienen mayor resistencia tensil que las obtenidas con las impresoras tipo FDM (258). Además, se ha demostrado que la fuerza y resistencia de los objetos impresos con impresoras SLA son más resistentes cuando se emplea una longitud de onda de 405 nm (259).

El PMMA es, sin duda, el *cárrier* más empleado en traumatología para la antibioterapia local. Sin embargo, este tipo de material no puede emplearse directamente para su impresión 3D y la fabricación de piezas personalizadas al

paciente, por lo que se requiere de moldes para obtener espaciadores o piezas personalizadas (260,261). Allen *et al.*, emplearon poliuretano rígido (RPU 60) para la impresión 3D de cubos con un tamaño de 20 mm de lado y 2 mm de grosor de pared. Posteriormente, inyectaron sulfato cálcico deshidratado y antibiótico dentro del cubo y lo sumergieron en suero salino para medir la concentración de antibiótico liberado. En el grupo control, emplearon cemento óseo junto con gentamicina y lo inyectaron en los cubos de RPU. Observaron que, aunque el cemento era resistente, no era capaz de liberar antibiótico más allá del segundo día, tras una liberación máxima de gentamicina en las primeras 24 horas, a diferencia del sulfato cálcico, que era capaz de mantener una liberación más sostenida hasta el quinto día, demostrando la ineficiencia del cemento para obtener concentraciones prolongadas de antibiótico a lo largo del tiempo (262).

La resina posee ventajas respecto al PMMA en lo que respecta a la elución de antibiótico. Primero, la resina no precisa temperatura para su polimerización, por tanto, no altera las propiedades fisicoquímicas de antibióticos termolábiles. Aunque las piezas impresas con resina requerirán de su retirada en un segundo tiempo, al igual que ocurre con el cemento, y supone una desventaja respecto a los sustitutos óseos, (podría producir el mismo efecto que un espaciador, una zona donde los microorganismos pueden formar biofilm), sí que da un aporte estructural importante (107,144) a diferencia de otros sustitutos óseos como el sulfato cálcico, y sin la degradación tan rápida que presentan. Además, al poder diseñar la forma de la pieza y personalizarla, se pueden obtener otro tipo de piezas, como tornillos, que pueden implantarse en el paciente, dando soporte estructural a la vez que permiten la elución de antibiótico, e incluso se pueden obtener piezas biodegradables (224).

El uso de PMMA con antibiótico está especialmente aceptado en las prótesis de revisión. Sin embargo, como se describe en la literatura (97,118) y hemos comprobado en este estudio, la elución del antibiótico desde el cemento es muy

errática, con picos máximos en las primeras 48 horas hasta ser prácticamente indetectable a partir del 3^{er} día. Estudios previos demuestran que, incluso con la daptomicina y la vancomicina, antibióticos ampliamente utilizados con el PMMA, evidencian rápidas caídas de la curva de elución y son prácticamente indetectables a partir del 4^o día (263). En el caso de otros antibióticos como la rifampicina, la detección es mínima a partir del 2^o día, con concentraciones menores de 2 µg/mL (264). Estos resultados demuestran que, los antibióticos termoestables empleados comúnmente con el cemento, y que no son tan afectados por el incremento de la temperatura en el proceso de la polimerización, tienen una escasa elución desde el cemento óseo, con concentraciones prácticamente indetectables a partir del 4^o día. En el caso de la amoxicilina, apenas existen estudios de elución desde el cemento, al ser termolábil, aunque los estudios que han abordado esta cuestión han demostrado que las piezas fabricadas con la adición de 1,2 g de amoxicilina-clavulánico a 40 g de cemento presentaban unas curvas de elución que descendían muy rápidamente mostrando una ausencia de detección del antibiótico a partir del 3^{er} día (121), a diferencia de lo que ocurre en nuestro estudio con las piezas impresas con resina, que al 4^o día aún eluían amoxicilina proporcionando una concentración de 3,4 mg/L. En nuestro estudio hemos fabricado piezas con cemento al que se le añadió 2 g de amoxicilina-clavulánico y se ha comprobado una menor detección de amoxicilina, con una concentración de 1,32 mg/L al 4^o día.

A diferencia de las piezas de PMMA con antibiótico, las piezas de resina con antibiótico tienen una elución más sostenida a lo largo del tiempo, manteniéndose tanto la amoxicilina como el clavulánico en la resina hasta su elución completa y detectándose, aunque cantidades mínimas, pasados los 10 días. Esto podría ser debido, en parte, a la diferente estructura interna de la pieza que se produce por la polimerización del cemento y la de la resina. La inmersión de las piezas fabricadas con cemento y resina en una solución de azul de metileno, un colorante

básico, mostró que el colorante tiñó la superficie de las piezas de cemento, no pasando al interior de la pieza mientras que, en las piezas fabricadas con la resina el colorante tiñó tanto la superficie como el interior de las piezas, mostrando que el colorante fue capaz de pasar al interior de la pieza y teñirla. Estos resultados sugieren que, en las piezas de cemento la elución del antibiótico se produce mayoritariamente desde la superficie del cemento, a diferencia de la resina, cuya estructura permite el paso del líquido por su interior y, por tanto, aumentando su superficie de contacto para la elución del fármaco. No debemos olvidar que la elución del antibiótico desde el PMMA está influenciada por cómo se realizó la mezcla, bien manual o con vacío, por lo que se añade otro factor que puede dar lugar a resultados poco reproducibles cuando se utiliza el cemento con antibióticos, pudiendo encontrar situaciones en las que se obtienen concentraciones menores a las esperadas de forma local, si la mezcla del cemento y el antibiótico no se realizó de forma adecuada (108,265).

Como se acaba de mencionar, las propiedades del cemento se ven afectadas por la forma de realizar la mezcla, de tal manera que si no se hace una mezcla suficientemente homogénea la pieza de PMMA muestra una importante fragilidad (266). En la literatura está ampliamente descrita la capacidad de resistencia tensil que posee el PMMA, que llega a valores de 75.000 KPa (265). Este valor no dista mucho del observado en nuestro estudio, en el que las piezas de PMMA alcanzaron valores medios de 69.000 KPa. Cabe destacar, que para que exista una aprobación ISO de las piezas fabricadas con PMMA, la resistencia ténsil mínima tiene que ser de 70.000 KPa (266). En las pruebas mecánicas, se determinó que la estructura del modelo B presentaba una menor resistencia tras la elución del antibiótico. Aunque la pérdida de resistencia ténsil es una desventaja de las piezas impresas con la resina, esta disminución podría deberse a la mayor pérdida de antibiótico en el proceso de elución que, al formar parte de

la estructura, provocaría que las piezas fueran menos resistentes a la rotura que las fabricadas con el cemento.

Se ha podido comprobar con el colorante azul de metileno que la estructura de las piezas de resina, a diferencia de las de cemento, permite el paso del colorante a su través, mostrando una diferencia entre las estructuras que podría estar relacionada con la menor resistencia a la rotura de las piezas impresas con resina. Sería posible diseñar piezas de resina con orificios en zonas concretas de las piezas, mientras que otras zonas serían macizas, de tal manera que se podrían diseñar piezas con una densidad de orificios adecuada para regular la elución del antibiótico y aumentar la resistencia a la rotura de las piezas.

Por tanto, la resina podría emplearse para la obtención de material de osteosíntesis, garantizando una correcta elución de antibiótico y, aunque pierda capacidad de resistencia a la rotura con respecto a la estructura de cemento, los resultados obtenidos seguirían siendo adecuados con una resistencia a la rotura mayor a 30.000 KPa.

Con respecto a las aplicaciones prácticas de la resina-antibiótico en el campo actual de la traumatología, existen múltiples aplicaciones en las cuales puede suponer un beneficio terapéutico para el paciente. Por una parte, en el caso de las artritis sépticas, debido a que existe una afectación importante del cartílago articular secundario a la infección, permitiría que con la aplicación de un *cárrier* de resina y antibiótico dirigido se redujera la necesidad de desbridamientos secundarios para erradicar la infección. En las infecciones protésicas supondría un beneficio a la hora de emplear espaciadores específicos con antibiótico dirigido y propiedades mecánicas óptimas que permitieran el suficiente soporte para que el paciente pudiera movilizarse con mayor seguridad. Así mismo, debido al aumento de la incidencia de las infecciones, en aquellos pacientes con factores de riesgo se podría emplear tanto para las prótesis como para las fracturas, en

tornillos o placas diseñadas en 3D para la prevención de la infección o bien para su tratamiento definitivo. En el caso de las pseudoartrosis, el recubrimiento del defecto óseo con estos *cárriers* o bien el empleo de placas de forma temporal para la estabilización ósea permitiría, por una parte, mantener el espacio, y por otra, servir de soporte estructural al defecto óseo. Por tanto, existen múltiples opciones terapéuticas en las que las piezas obtenidas con resina y el antibiótico deseado pueden ser de gran utilidad en las infecciones osteoarticulares.

5.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Debido al aumento del uso de impresión 3D junto con fármacos para obtener dispositivos médicos o nuevos medicamentos, la FDA publicó una guía con las consideraciones técnicas asociadas con los procesos de fabricación aditiva y las pruebas y requisitos que deben cumplir los dispositivos que van a ser utilizados en los pacientes (267). Entre ellos, destacaban la validación del diseño y el tipo de material empleado, las características pre- y post-impresión de los objetos, los parámetros físicos y mecánicos del producto final, los efectos deletéreos sobre los humanos y consideraciones sobre esterilización y biocompatibilidad.

Uno de los mayores retos del empleo de estas nuevas tecnologías es precisamente las regulaciones en cuanto a seguridad para su empleo en humanos y de la validación de dichos productos para ser utilizados sin que existan daños para el paciente. Es importante mantener unos estándares de seguridad y efectividad de los dispositivos médicos, por esta razón la resina empleada en este estudio presenta el certificado DIN EN ISO 13485 de producto sanitario, cumpliendo con las directivas Europeas (268). Por tanto, las piezas y objetos impresos con dicha resina serían aptos y cumplirían los requisitos necesarios en cuanto al material empleado para su fabricación.

5.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El objetivo de esta tesis ha sido analizar las piezas impresas mediante tecnología SLA a partir de una resina biocompatible junto con un antibiótico termolábil para su posible utilización en humanos, y que permita la elución sostenida del fármaco. Dado que es un estudio experimental *in vitro*, se trata de resultados preliminares no extrapolables a la situación *in vivo* y aunque prometedores aún no permiten una aplicación directa a la práctica clínica del día a día.

Es difícil la comparación de los resultados de la tesis con los de otros estudios similares, dado que la bibliografía que aborda la elución de antibióticos a partir de piezas impresas con tecnología SLA es escasa o nula. Por esta razón, no ha sido posible comparar los resultados con los de otros grupos de investigación. Además, aunque la metodología ha sido reproducida de forma sistemática y cuidadosa, podrían producirse variaciones en la realización de la mezcla antibiótico-resina que condicionen el proceso de elución. Por este motivo se registró el peso de las piezas antes y después de la elución del antibiótico para comprobar la calidad de la impresión y la reproducibilidad del proceso de elución.

Hay que tener en cuenta, de cara a la aplicabilidad de este estudio, que se requiere de la utilización de una resina biocompatible que permita una futura aplicación al paciente sin que exista riesgo a reacciones adversas sobre los tejidos circundantes. Estudios de otros investigadores han empleado otro tipo de resinas con propiedades diferentes, por esta razón la comparación de los datos no es posible.

Otra limitación de esta tesis es la técnica de detección de la actividad antibacteriana del antibiótico eluido desde las piezas impresas. En nuestro estudio hemos empleado la técnica de microdilución en placa con *E. coli* sensible a amoxicilina. Cabe destacar que esta técnica no puede emplearse con todos los microorganismos, y ciertas bacterias requieren de atmósferas o medios de

incubación diferentes, debido a que su tasa de crecimiento es inferior a otras cepas y por tanto los resultados son de difícil interpretación. Además, si se desea realizar un estudio similar con otros antibióticos se podrían obtener resultados erróneos si se emplea esta técnica, como por ejemplo las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación frente a *Salmonella spp* o aminoglucósidos frente a *Enterococos*, aunque cabe destacar que en el caso de la amoxicilina-clavulánico no presenta esta limitación frente a las cepas de *E. coli* (269).

Por último, la utilización de un grupo control de piezas fabricadas con PMMA a las que se les ha añadido amoxicilina-clavulánico, un antibiótico termolábil, pueden suponer una fuente de gran heterogeneidad debido a la variabilidad del proceso de mezcla, con la posibilidad de que las piezas presenten cantidades erráticas de antibiótico en su interior y a la pérdida de antibiótico y de sus propiedades fisicoquímicas debidas al incremento de la temperatura producido por el proceso de polimerización del cemento.

5.6 LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo supone el inicio de diferentes líneas de investigación referentes a la impresión 3D, el empleo de la SLA en la traumatología y la adicción tanto de antibiótico como de materiales osteoconductores y osteoinductores.

Una vez demostrado que se pueden obtener piezas biocompatibles con antibiótico mediante impresión por SLA y que se produce una elución sostenida de amoxicilina-clavulánico, fármaco que no es empleado como antibiótico local en la mayoría de casos, debido a que se alteran sus propiedades a las elevadas temperaturas que se alcanzan durante la fase de polimerización del cemento óseo, se abren diferentes oportunidades para su empleo, especialmente para evitar la utilización de antibióticos nefrotóxicos como la vancomicina o la gentamicina en

pacientes con múltiples comorbilidades. Además, permitiría realizar una terapia más dirigida, especialmente hoy en día que nos encontramos con un aumento de las tasas de resistencias en microorganismos, en parte por el empleo de antibióticos de amplio espectro en ciertas patologías.

Nuevos estudios podrían determinar si es posible emplear otros antibióticos con la resina biocompatible o incluso añadir otros materiales que estimulen la formación de hueso, para realizar una terapia más precisa, dependiendo del tipo de infección osteoarticular, el microorganismo causal y la terapia que se desea emplear. Las técnicas propuestas podrían emplearse para la fabricación de espaciadores y de diferentes objetos o materiales de osteosíntesis, como por ejemplo tornillos o placas, y emplearse de forma profiláctica y preventiva de la infección, como ya se ha estudiado en diversos objetos impresos con PLA biodegradable (252).

Finalmente, también sería conveniente realizar estudios de toxicidad a gran escala, para establecer el tiempo que pueden emplearse los dispositivos médicos impresos con resina-antibiótico con total seguridad dentro del paciente. Esto constituiría una nueva línea de investigación, en la que se podría plantear el uso de resina-antibiótico para la obtención de piezas biodegradables, con el fin de permitir un soporte estructural temporal, que posteriormente sería sustituido por tejido propio del paciente.

6 CONCLUSIONES

1. La impresión SLA permite la obtención de piezas utilizando la resina biocompatible Optiprint® Lumina con amoxicilina-clavulánico, un antibiótico termolábil poco utilizado en traumatología por su incompatibilidad con el cemento óseo.
2. Las piezas se pueden fabricar de forma reproducible y con una baja variabilidad, que aumenta conforme aumenta la cantidad de amoxicilina-clavulánico que se añade a la resina.
3. Las piezas eluyen más antibiótico cuanto mayor cantidad de amoxicilina-clavulánico se añade a la resina y cuanto mayor superficie de contacto tienen con el medio, alcanzando el pico de elución el primer día y disminuyendo hasta el cuarto o quinto día, dependiendo del modelo considerado.
4. El antibiótico eluido de las piezas posee una importante actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Escherichia coli* sensibles a amoxicilina-clavulánico, actividad que es máxima en las primeras 24 horas y que disminuye paulatinamente, encontrándose todavía actividad a las 2 semanas.
5. La resistencia mecánica de las piezas impresas con la resina Optiprint® Lumina presenta valores elevados, aunque ligeramente menores que los del cemento óseo. Las piezas con antibiótico previamente a la elución tienen una resistencia similar a las piezas impresas únicamente con resina, aunque la resistencia disminuye de forma importante una vez el antibiótico se ha eluido.
6. El diseño de piezas con distintas características estructurales se puede materializar mediante impresión SLA con una resina biocompatible y la adición de fármacos, incluso antibióticos termolábiles.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Trinkaus E, Zimmerman MR. Trauma among the Shanidar Neandertals. *Am J Phys Anthropol.* 1982 Jan;57(1):61-76. doi: 10.1002/ajpa.1330570108. PMID: 6753598.
2. Pickett JC. A Short Historical Sketch of Osteomyelitis. *Ann Med Hist.* 1935 Mar;7(2):183-191. PMID: 33943626; PMCID: PMC7942299.
3. Bishop WJ. *The Early History of Surgery.* Hale. 1960. London
4. Pasteur L. La théorie des germes et ses applications à la médecine et à la chirurgie / lecture faite à l'Académie de médecine par M. Pasteur en son nom et au nom de MM. Joubert et Chamberland, le 30 avril 1878
5. Janssens PA. *Paleopathology.* London. John Baker. 1970;
6. Buchholz HW, Engelbrecht H. [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins]. *Chir Z Alle Geb Oper Medizen.* novembre de 1970;41(11):511-5.
7. Klemm K. Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections. *Zentralbl Chir.* 1979;104(14):934-42.
8. Texto Atlas de Histología Gartner Hiatt 3 Edición 2008 | PDF.
9. Junqueira, L.C, Carneiro, J. *Basic Histology. Texto y Atlas.* Edition. McGraw-Hill; 2005.
10. Sobotta, J., Welsch U. *Histología.* 2a Edición. Editorial Médica Panamericana.; 2009.
11. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* abril de 2017;125(4):353-64.
12. Winkler H, Janata O, Berger C, Wein W, Georgopoulos A. In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother.* septiembre de 2000;46(3):423-8.
13. Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *MedChemComm.* 1 de octubre de 2019;10(10):1719-39.
14. Thabit AK, Fatani DF, Bamakhrama MS, Barnawi OA, Basudan LO,

- Alhejaili SF. Antibiotic penetration into bone and joints: An updated review. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. abril de 2019;81:128-36.
15. Boselli E, Allaouchiche B. [Diffusion in bone tissue of antibiotics]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 18 de diciembre de 1999;28(40):2265-76.
16. Masters EA, Trombetta RP, de Mesy Bentley KL, Boyce BF, Gill AL, Gill SR, et al. Evolving concepts in bone infection: redefining «biofilm», «acute vs. chronic osteomyelitis», «the immune proteome» and «local antibiotic therapy». *Bone Res*. 2019;7:20.
17. Hofstee MI, Muthukrishnan G, Atkins GJ, Riool M, Thompson K, Morgenstern M, et al. Current Concepts of Osteomyelitis: From Pathologic Mechanisms to Advanced Research Methods. *Am J Pathol*. junio de 2020;190(6):1151-63.
18. Blanco JF, Díaz A, Melchor FR, da Casa C, Pescador D. Risk factors for periprosthetic joint infection after total knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg*. febrero de 2020;140(2):239-45.
19. Holleyman RJ, Deehan DJ, Walker L, Charlett A, Samuel J, Shirley MDF, et al. Staphylococcal resistance profiles in deep infection following primary hip and knee arthroplasty: a study using the NJR dataset. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2019;139(9):1209-15.
20. Phillips JE, Crane TP, Noy M, Elliott TSJ, Grimer RJ. The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey. *J Bone Joint Surg Br*. julio de 2006;88(7):943-8.
21. Illingworth KD, Mihalko WM, Parvizi J, Sculco T, McArthur B, el Bitar Y, et al. How to minimize infection and thereby maximize patient outcomes in total joint arthroplasty: a multicenter approach: AAOS exhibit selection. *J Bone Joint Surg Am*. 17 de abril de 2013;95(8):e50.
22. Maradit Kremers H, Larson DR, Crowson CS, Kremers WK, Washington RE, Steiner CA, et al. Prevalence of Total Hip and Knee Replacement in the United States. *J Bone Joint Surg Am*. 2 de septiembre de 2015;97(17):1386-97.

23. Mortazavi SMJ, Schwartzenger J, Austin MS, Purtill JJ, Parvizi J. Revision total knee arthroplasty infection: incidence and predictors. *Clin Orthop*. agosto de 2010;468(8):2052-9.
24. Mortazavi SMJ, Molligan J, Austin MS, Purtill JJ, Hozack WJ, Parvizi J. Failure following revision total knee arthroplasty: infection is the major cause. *Int Orthop*. agosto de 2011;35(8):1157-64.
25. Fletcher N, Sofianos D, Berkes MB, Obremskey WT. Prevention of perioperative infection. *J Bone Joint Surg Am*. julio de 2007;89(7):1605-18.
26. Tachdjian MO, Compere EL. Postoperative wound infections in orthopedic surgery; evaluation of prophylactic antibiotics. *J Int Coll Surg*. diciembre de 1957;28(6 Pt 1):797-805.
27. Wolf M, Clar H, Friesenbichler J, Schwantzer G, Bernhardt G, Gruber G, et al. Prosthetic joint infection following total hip replacement: results of one-stage versus two-stage exchange. *Int Orthop*. julio de 2014;38(7):1363-8.
28. Lum ZC, Natsuhara KM, Shelton TJ, Giordani M, Pereira GC, Meehan JP. Mortality During Total Knee Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. diciembre de 2018;33(12):3783-8.
29. Choo KJ, Austin M, Parvizi J. Irrigation and Debridement, Modular Exchange, and Implant Retention for Acute Periprosthetic Infection After Total Knee Arthroplasty. *JBJS Essent Surg Tech*. 2019;9(4):e38.1-2.
30. Qasim SN, Swann A, Ashford R. The DAIR (debridement, antibiotics and implant retention) procedure for infected total knee replacement - a literature review. *SICOT-J*. 2017;3:2.
31. Ibrahim MS, Raja S, Khan MA, Haddad FS. A multidisciplinary team approach to two-stage revision for the infected hip replacement: a minimum five-year follow-up study. *Bone Jt J*. octubre de 2014;96-B(10):1312-8.
32. Kunutsor SK, Whitehouse MR, Blom AW, Beswick AD, INFORM Team. Re-Infection Outcomes following One- and Two-Stage Surgical

- Revision of Infected Hip Prosthesis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*. 2015;10(9):e0139166.
33. Huang CC, Tsai KT, Weng SF, Lin HJ, Huang HS, Wang JJ, et al. Chronic osteomyelitis increases long-term mortality risk in the elderly: a nationwide population-based cohort study. *BMC Geriatr*. 31 de marzo de 2016;16:72.
34. Wu CJ, Huang CC, Weng SF, Chen PJ, Hsu CC, Wang JJ, et al. Septic arthritis significantly increased the long-term mortality in geriatric patients. *BMC Geriatr*. 9 de agosto de 2017;17(1):178.
35. Iqbal F, Shafiq B, Noor SS, Ali Z, Memon N, Memon N. Economic Burden of Periprosthetic Joint Infection Following Primary Total Knee Replacement in a Developing Country. *Clin Orthop Surg*. diciembre de 2020;12(4):470-6.
36. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty*. septiembre de 2012;27(8 Suppl):61-65.e1.
37. Kamath AF, Ong KL, Lau E, Chan V, Vail TP, Rubash HE, et al. Quantifying the Burden of Revision Total Joint Arthroplasty for Periprosthetic Infection. *J Arthroplasty*. septiembre de 2015;30(9):1492-7.
38. Schwarz EM, Parvizi J, Gehrke T, Aiyer A, Battenberg A, Brown SA, et al. 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. mayo de 2019;37(5):997-1006.
39. Daines BK, Dennis DA, Amann S. Infection prevention in total knee arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg*. junio de 2015;23(6):356-64.
40. Papas PV, Congiusta D, Scuderi GR, Cushner FD. A Modern Approach to Preventing Prosthetic Joint Infections. *J Knee Surg*. agosto de 2018;31(7):610-7.
41. Kerkhoffs GMMJ, Servien E, Dunn W, Dahm D, Bramer JAM, Haverkamp D. The influence of obesity on the complication rate and

- outcome of total knee arthroplasty: a meta-analysis and systematic literature review. *J Bone Joint Surg Am.* 17 de octubre de 2012;94(20):1839-44.
42. Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J Am Acad Dermatol.* junio de 2007;56(6):901-16; quiz 917-20.
43. Gupta MN, Sturrock RD, Field M. A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis. *Rheumatol Oxf Engl.* enero de 2001;40(1):24-30.
44. Ross JJ. Septic Arthritis of Native Joints. *Infect Dis Clin North Am.* junio de 2017;31(2):203-18.
45. Ferrand J, El Samad Y, Brunschweiler B, Grados F, Dehamchia-Rehailia N, Séjourne A, et al. Morbimortality in adult patients with septic arthritis: a three-year hospital-based study. *BMC Infect Dis.* 1 de junio de 2016;16:239.
46. Kortram K, Bezstarosti H, Metsemakers WJ, Raschke MJ, Van Lieshout EMM, Verhofstad MHJ. Risk factors for infectious complications after open fractures; a systematic review and meta-analysis. *Int Orthop.* octubre de 2017;41(10):1965-82.
47. Papakostidis C, Kanakaris NK, Pretel J, Faour O, Morell DJ, Giannoudis PV. Prevalence of complications of open tibial shaft fractures stratified as per the Gustilo-Anderson classification. *Injury.* diciembre de 2011;42(12):1408-15.
48. Pollak AN, Jones AL, Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ. The Relationship Between Time to Surgical Débridement and Incidence of Infection After Open High-Energy Lower Extremity Trauma. *J Bone Joint Surg Am.* enero de 2010;92(1):7-15.
49. Fang C, Wong TM, To KK, Wong SS, Lau TW, Leung F. Infection after fracture osteosynthesis - Part II. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2017 Jan;25(1):2309499017692714. doi: 10.1177/2309499017692714. PMID: 28219306.

50. Grammatico I, Baron S, Rusch E, Lepage B, Surer N, Desenclos JC, et al. Epidemiology of vertebral osteomyelitis (VO) in France: analysis of hospital-discharge data 2002–2003. *Epidemiol Infect.* mayo de 2008;136(5):653-60.
51. Levine SE, Esterhai JL, Heppenstall RB, Calhoun J, Mader JT. Diagnoses and staging. Osteomyelitis and prosthetic joint infections. *Clin Orthop.* octubre de 1993;(295):77-86.
52. Mader JT, Shirliff M, Calhoun JH. Staging and staging application in osteomyelitis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* diciembre de 1997;25(6):1303-9.
53. Depypere M, Morgenstern M, Kuehl R, Senneville E, Moriarty TF, Obremskey WT, et al. Pathogenesis and management of fracture-related infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mayo de 2020;26(5):572-8.
54. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury.* junio de 2014;45 Suppl 2:S3-7.
55. Mills LA, Aitken SA, Simpson AHRW. The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthop.* agosto de 2017;88(4):434-9.
56. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhav A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet Lond Engl.* 23 de enero de 2016;387(10016):386-94.
57. Yokoe DS, Avery TR, Platt R, Huang SS. Reporting surgical site infections following total hip and knee arthroplasty: impact of limiting surveillance to the operative hospital. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* noviembre de 2013;57(9):1282-8.
58. Keemu H, Alakylä KJ, Klén R, Panula VJ, Venäläinen MS, Haapakoski JJ, et al. Risk factors for revision due to prosthetic joint infection following total knee arthroplasty based on 62,087 knees in the Finnish Arthroplasty Register from 2014 to 2020. *Acta Orthop.* 3 de mayo de 2023;94:215-23.

59. Rakow A, Perka C, Trampuz A, Renz N. Origin and characteristics of haematogenous periprosthetic joint infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* julio de 2019;25(7):845-50.
60. Zeller V, Kerroumi Y, Meyssonier V, Heym B, Metten MA, Desplaces N, et al. Analysis of postoperative and hematogenous prosthetic joint-infection microbiological patterns in a large cohort. *J Infect.* abril de 2018;76(4):328-34.
61. Zimmerli W, Sendi P. Orthopedic implant-associated infections. En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th Edition. Philadelphia: Elsevier; 2020.
62. Konigsberg BS, Della Valle CJ, Ting NT, Qiu F, Sporer SM. Acute hematogenous infection following total hip and knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* marzo de 2014;29(3):469-72.
63. Westberg M, Fagerberg ØT, Snorrason F. Poor outcome after debridement and implant retention for acute hematogenous periprosthetic joint infection: a cohort study of 43 patients. *Acta Orthop.* 8 de marzo de 2023;94:115-20.
64. Miley GB, Scheller AD, Turner RH. Medical and surgical treatment of the septic hip with one-stage revision arthroplasty. *Clin Orthop.* octubre de 1982;(170):76-82.
65. Gehrke T, Zahar A, Kendoff D. One-stage exchange: it all began here. *Bone Joint J.* 2013 Nov;95-B(11 Suppl A):77-83. doi: 10.1302/0301-620X.95B11.32646. PMID: 24187359.
66. Wouthuyzen-Bakker M, Sebillotte M, Huotari K, Escudero Sánchez R, Benavent E, Parvizi J, et al. Lower Success Rate of Débridement and Implant Retention in Late Acute versus Early Acute Periprosthetic Joint Infection Caused by *Staphylococcus* spp. Results from a Matched Cohort Study. *Clin Orthop.* junio de 2020;478(6):1348-55.
67. Lange J, Troelsen A, Solgaard S, Otte KS, Jensen NK, Søballe K, et al. Cementless One-Stage Revision in Chronic Periprosthetic Hip Joint Infection. Ninety-One Percent Infection Free Survival in 56 Patients at Minimum 2-Year Follow-Up. *J Arthroplasty.* abril de 2018;33(4):1160-

1165.e1.

68. Toulson C, Walcott-Sapp S, Hur J, Salvati E, Bostrom M, Brause B, et al. Treatment of infected total hip arthroplasty with a 2-stage reimplantation protocol: update on «our institution's» experience from 1989 to 2003. *J Arthroplasty*. octubre de 2009;24(7):1051-60.
69. Ariza J, Euba G, Murillo O. Infecciones relacionadas con las prótesis articulares Orthopedic device-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 Jun-Jul;26(6):380-90. Spanish. doi: 10.1157/13123843. PMID: 18588820.
70. Masters EA, Ricciardi BF, Bentley KL de M, Moriarty TF, Schwarz EM, Muthukrishnan G. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat Rev Microbiol*. julio de 2022;20(7):385-400.
71. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. marzo de 2013;11(3):297-308.
72. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 11 de agosto de 2016;14(9):563-75.
73. Romanò CL, Romanò D, Morelli I, Drago L. The Concept of Biofilm-Related Implant Malfunction and «Low-Grade Infection». *Adv Exp Med Biol*. 2017;971:1-13.
74. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. diciembre de 2018;4(12):e01067.
75. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. julio de 2010;2(7):a000398.
76. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincón MV, Gómez LA, Lesmes YA, et al. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol*. octubre de 2017;88(10):1066-89.

77. Zimmerli W, Sendi P. Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections In Vitro, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 2019;63(2):e01746-18.
78. Aditya V, Kotian A, Saikrishnan S, Rohit A, Mithoor D, Karunasagar I, et al. Effect of ciprofloxacin and in vitro gut conditions on biofilm of *Escherichia coli* isolated from clinical and environmental sources. *J Appl Microbiol.* febrero de 2022;132(2):964-77.
79. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SRK, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de septiembre de 2010;79(2):340-4.
80. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs.* octubre de 2012;35(10):923-34.
81. Govaert GAM, Kuehl R, Atkins BL, Trampuz A, Morgenstern M, Obrebskey WT, et al. Diagnosing Fracture-Related Infection: Current Concepts and Recommendations. *J Orthop Trauma.* enero de 2020;34(1):8-17.
82. Gazendam A, Wood TJ, Tushinski D, Bali K. Diagnosing Periprosthetic Joint Infection: a Scoping Review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 4 de abril de 2022;15(3):219-29.
83. Holtom PD. Antibiotic prophylaxis: current recommendations. *J Am Acad Orthop Surg.* 2006;14(10 Spec No.):S98-100.
84. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clin Infect Dis.* 1 de febrero de 2011;52(3):e18-55.
85. Gogia JS, Meehan JP, Di Cesare PE, Jamali AA. Local Antibiotic Therapy in Osteomyelitis. *Semin Plast Surg.* mayo de 2009;23(2):100-7.

86. Crane DP, Gromov K, Li D, Søballe K, Wahnes C, Büchner H, et al. Efficacy of Colistin Impregnated Beads to Prevent Multi-drug Resistant *A. baumannii* Implant-Associated Osteomyelitis. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* agosto de 2009;27(8):1008-15.
87. Antibiotic therapy for osteoarticular infections in 2023: Proposals from the Pediatric Infectious Pathology Group (GPIP). *Infect Dis Now.* 1 de noviembre de 2023;53(8):104789.
88. Cipriano A, Santos FV, Dias R, Carvalho A, Reis E, Pereira C, et al. Adult Native Joint Septic Arthritis: A Nine-Year Retrospective Analysis in a Portuguese University Hospital. *Acta Médica Port.* 2 de diciembre de 2021;34(12):826-32.
89. Wassif RK, Elkayal M, Shamma RN, Elkheshen SA. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis. *Drug Deliv.* 28(1):2392-414.
90. Fromm KM. Silver coordination compounds with antimicrobial properties. *Appl Organomet Chem.* 2013;27(12):683-7.
91. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl.* 4 de febrero de 2013;52(6):1636-53.
92. Harges J, von Eiff C, Streitbuerger A, Balke M, Budny T, Henrichs MP, et al. Reduction of periprosthetic infection with silver-coated megaprotheses in patients with bone sarcoma. *J Surg Oncol.* 1 de abril de 2010;101(5):389-95.
93. Mijndendonckx K, Leys N, Mahillon J, Silver S, Van Houdt R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* agosto de 2013;26(4):609-21.
94. Pitarresi G, Palumbo FS, Calascibetta F, Fiorica C, Di Stefano M, Giammona G. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. *Int J Pharm.* 5 de junio de 2013;449(1-2):84-94.
95. Romanò CL, Malizos K, Capuano N, Mezzoprete R, D'Arienzo M, Van

- Der Straeten C, et al. Does an Antibiotic-Loaded Hydrogel Coating Reduce Early Post-Surgical Infection After Joint Arthroplasty? *J Bone Jt Infect.* 2016;1:34-41.
96. Malizos K, Blauth M, Danita A, Capuano N, Mezzoprete R, Logoluso N, et al. Fast-resorbable antibiotic-loaded hydrogel coating to reduce post-surgical infection after internal osteosynthesis: a multicenter randomized controlled trial. *J Orthop Traumatol Off J Ital Soc Orthop Traumatol.* junio de 2017;18(2):159-69.
97. van Vugt TAG, Arts JJ, Geurts JAP. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate Beads and Spacers in Treatment of Orthopedic Infections and the Role of Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 25 de julio de 2019;10:1626.
98. Vishnevetskaya RI. [Use of polymethyl metacrylate for osteosynthesis and arthroplasty]. *Gosp Delo.* 1947;(4):42-7.
99. Charnley J. THE BONDING OF PROSTHESES TO BONE BY CEMENT. *J Bone Joint Surg Br.* agosto de 1964;46:518-29.
100. Buchholz HW, Elson RA, Engelbrecht E, Lodenkämper H, Röttger J, Siegel A. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 1981;63-B(3):342-53.
101. Cervello S, Cortel A. El uso de las cadenas de PMMA -Gentamicina en el tratamiento de las infecciones en cirugía ortopédica y traumatología. *Rev. I~sp. de Cir. Ost.,* 14,417-423 (1979)
102. AlBuhairan B, Hind D, Hutchinson A. Antibiotic prophylaxis for wound infections in total joint arthroplasty: a systematic review. *J Bone Joint Surg Br.* julio de 2008;90(7):915-9.
103. Gandhi R, Backstein D, Zywiell MG. Antibiotic-laden Bone Cement in Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 15 de octubre de 2018;26(20):727-34.
104. Shyam AK, Sancheti PK, Patel SK, Rocha S, Pradhan C, Patil A. Use of antibiotic cement-impregnated intramedullary nail in treatment of infected non-union of long bones. *Indian J Orthop.* 2009;43(4):396-402.

105. Topoleski LDT, Rodriguez-Pinto R. Bone Cement: an overview. En: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2011 [citado 9 de octubre de 2023]. p. 11-28. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552941001987>
106. Vaishya R, Chauhan M, Vaish A. Bone cement. *J Clin Orthop Trauma*. diciembre de 2013;4(4):157-63.
107. Arora M, Chan EK, Gupta S, Diwan AD. Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature. *World J Orthop*. 18 de abril de 2013;4(2):67-74.
108. Lewis G. Not all approved antibiotic-loaded PMMA bone cement brands are the same: ranking using the utility materials selection concept. *J Mater Sci Mater Med*. enero de 2015;26(1):5388.
109. Kowalski R, Schmaehling R. Commercial aspects and delivery systems of bone cements. En: Deb S, editor. *Orthopaedic Bone Cements* [Internet]. Woodhead; 2008
110. Geiger MH, Keating EM, Ritter MA, Ginther JA, Faris PM, Meding JB. The clinical significance of vacuum mixing bone cement. *Clin Orthop*. enero de 2001;(382):258-66.
111. Mjöberg B, Rydholm A, Selvik G, Onnerfält R. Low- versus high-viscosity bone cement. Fixation of hip prostheses analyzed by roentgen stereophotogrammetry. *Acta Orthop Scand*. abril de 1987;58(2):106-8.
112. Blankstein M, Lentine B, Nelms NJ. The Use of Cement in Hip Arthroplasty: A Contemporary Perspective. *J Am Acad Orthop Surg*. 2020 Jul 15;28(14):e586-e594. doi: 10.5435/JAAOS-D-19-00604. PMID: 32692094.
113. Hinarejos P, Guirro P, Leal J, Montserrat F, Pelfort X, Sorli ML, et al. The use of erythromycin and colistin-loaded cement in total knee arthroplasty does not reduce the incidence of infection: a prospective randomized study in 3000 knees. *J Bone Joint Surg Am*. 1 de mayo de 2013;95(9):769-74.

114. Li C, Renz N, Trampuz A. Management of Periprosthetic Joint Infection. Hip Pelvis. septiembre de 2018;30(3):138-46.
115. Armstrong MS, Spencer RF, Cunningham JL, Gheduzzi S, Miles AW, Learmonth ID. Mechanical characteristics of antibiotic-laden bone cement. Acta Orthop Scand. diciembre de 2002;73(6):688-90.
116. Paz E, Sanz-Ruiz P, Abenojar J, Vaquero-Martín J, Forriol F, Del Real JC. Evaluation of Elution and Mechanical Properties of High-Dose Antibiotic-Loaded Bone Cement: Comparative “In Vitro” Study of the Influence of Vancomycin and Cefazolin. J Arthroplasty. agosto de 2015;30(8):1423-9.
117. Lee SH, Tai CL, Chen SY, Chang CH, Chang YH, Hsieh PH. Elution and Mechanical Strength of Vancomycin-Loaded Bone Cement: In Vitro Study of the Influence of Brand Combination. PLoS ONE. 17 de noviembre de 2016;11(11):e0166545.
118. Duey RE, Chong ACM, McQueen DA, Womack JL, Song Z, Steinberger TA, et al. Mechanical Properties and Elution Characteristics of Polymethylmethacrylate Bone Cement Impregnated with Antibiotics for Various Surface Area and Volume Constructs. Iowa Orthop J. 2012;32:104-15.
119. Draenert K, Draenert Y. The Three Interfaces. En: Breusch S, Malchau H, editores. The Well-Cemented Total Hip Arthroplasty: Theory and Practice. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005 p. 93-102.
120. Sanz-Herrera JA, Esteban H, Ariza MP. Bone-Cement Interface Micromechanical Model under Cyclic Loading. Key Eng Mater. 2012;488-489:391-4.
121. Lee JH, Han CD, Cho SN, Yang IH, Lee WS, Baek SH, et al. How Long Does Antimycobacterial Antibiotic-loaded Bone Cement Have In Vitro Activity for Musculoskeletal Tuberculosis? Clin Orthop. noviembre de 2017;475(11):2795-804.
122. Gálvez-López R, Peña-Monje A, Antelo-Lorenzo R, Guardia-Olmedo J, Moliz J, Hernández-Quero J, et al. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded

- acrylic bone cement. *Diagn Microbiol Infect Dis.* enero de 2014;78(1):70-4.
123. Hinarejos P, Guirro P, Puig-Verdie L, Torres-Claramunt R, Leal-Blanquet J, Sanchez-Soler J, et al. Use of antibiotic-loaded cement in total knee arthroplasty. *World J Orthop.* 18 de diciembre de 2015;6(11):877-85.
124. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am.* noviembre de 2006;88(11):2487-500.
125. Al-Husinat L, Jouryyeh B, Al Sharie S, Al Modanat Z, Jurieh A, Al Hseinat L, et al. Bone Cement and Its Anesthetic Complications: A Narrative Review. *J Clin Med.* 7 de marzo de 2023;12(6):2105.
126. Lewis G, Mladsí S. Effect of sterilization method on properties of Palacos R acrylic bone cement. *Biomaterials.* 1998;19(1-3):117-24.
127. Xie J, Wang W, Fan X, Li H, Wang H, Liao R, et al. Effects of PMMA spacer loaded with varying vancomycin concentrations on bone regeneration in the Masquelet technique. *Sci Rep.* 11 de marzo de 2022;12(1):4255.
128. Lachiewicz PF, Wellman SS, Peterson JR. Antibiotic Cement Spacers for Infected Total Knee Arthroplasties. *J Am Acad Orthop Surg.* 1 de marzo de 2020;28(5):180-8.
129. Guild GN, Wu B, Scuderi GR. Articulating vs. Static antibiotic impregnated spacers in revision total knee arthroplasty for sepsis. A systematic review. *J Arthroplasty.* marzo de 2014;29(3):558-63.
130. Voleti PB, Baldwin KD, Lee GC. Use of static or articulating spacers for infection following total knee arthroplasty: a systematic literature review. *J Bone Joint Surg Am.* 4 de septiembre de 2013;95(17):1594-9.
131. Anagnostakos K, Meyer C. Antibiotic Elution from Hip and Knee Acrylic Bone Cement Spacers: A Systematic Review. *BioMed Res Int.* 2017;2017:4657874.
132. Corona PS, Espinal L, Rodríguez-Pardo D, Pigrau C, Larrosa N, Flores

- X. Antibiotic susceptibility in gram-positive chronic joint arthroplasty infections: increased aminoglycoside resistance rate in patients with prior aminoglycoside-impregnated cement spacer use. *J Arthroplasty*. agosto de 2014;29(8):1617-21.
133. Peters CL, Hines JL, Bachus KN, Craig MA, Bloebaum RD. Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects. *J Biomed Mater Res A*. 1 de marzo de 2006;76(3):456-62.
134. Geurts J, Chris Arts JJ, Walenkamp GHIM. Bone graft substitutes in active or suspected infection. Contra-indicated or not? *Injury*. septiembre de 2011;42 Suppl 2:S82-86.
135. Dressman, H. (1892) Ueber Knochenplombierung bei Hohlenformigen Defekten des Knochens. *Beitr Klin Chir*, 9, 804-810. - References - Scientific Research Publishing.
136. Ferrando A, Part J, Baeza J. Treatment of Cavitary Bone Defects in Chronic Osteomyelitis: Bioactive glass S53P4 vs. Calcium Sulphate Antibiotic Beads. *J Bone Jt Infect*. 9 de octubre de 2017;2(4):194-201.
137. Gramlich Y, Walter G, Klug A, Harbering J, Kemmerer M, Hoffmann R. Procedure for single-stage implant retention for chronic periprosthetic infection using topical degradable calcium-based antibiotics. *Int Orthop*. julio de 2019;43(7):1559-66.
138. Calanna F, Chen F, Risitano S, Vorhies JS, Franceschini M, Giori NJ, et al. Debridement, antibiotic pearls, and retention of the implant (DAPRI): A modified technique for implant retention in total knee arthroplasty PJI treatment. *J Orthop Surg Hong Kong*. 2019;27(3):2309499019874413.
139. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. noviembre de 2006;17(11):967-78.
140. Fernandes HR, Gaddam A, Rebelo A, Brazete D, Stan GE, Ferreira JMF. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. *Mater Basel Switz*. 12 de diciembre de 2018;11(12):2530.

141. Aurégan JC, Bégue T. Bioactive glass for long bone infection: a systematic review. *Injury*. diciembre de 2015;46 Suppl 8:S3-7.
142. Mecca FG, Bellucci D, Cannillo V. Effect of Thermal Treatments and Ion Substitution on Sintering and Crystallization of Bioactive Glasses: A Review. *Mater Basel Switz*. 28 de junio de 2023;16(13):4651.
143. Fiume E, Barberi J, Verné E, Bains F. Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies. *J Funct Biomater*. 16 de marzo de 2018;9(1):24.
144. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 7 de junio de 2017;2(4):224-47.
145. Azi ML, Aprato A, Santi I, Kfuri M, Masse A, Joeris A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 9 de noviembre de 2016;17(1):465.
146. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: WHAT THEY CAN OFFER AND WHAT THEY CANNOT. *J Bone Joint Surg Br*. 1 de mayo de 2007;89-B(5):574-80.
147. Ashman O, Phillips AM. Treatment of non-unions with bone defects: which option and why? *Injury*. enero de 2013;44 Suppl 1:S43-45.
148. Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride-Gagyi S. Masquelet's Induced Membrane Technique: Review of Current Concepts and Future Directions. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. abril de 2021;39(4):707-18.
149. Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury*. junio de 2011;42(6):591-8.
150. Fung B, Hoit G, Schemitsch E, Godbout C, Nauth A. The induced membrane technique for the management of long bone defects. *Bone Jt J*. diciembre de 2020;102-B(12):1723-34.
151. Gubin AV, Borzunov DY, Marchenkova LO, Malkova TA, Smirnova IL. Contribution of G.A. Ilizarov to bone reconstruction: historical

- achievements and state of the art. *Strateg Trauma Limb Reconstr.* noviembre de 2016;11(3):145-52.
152. Tetsworth K, Paley D, Sen C, Jaffe M, Maar DC, Glatt V, et al. Bone transport versus acute shortening for the management of infected tibial non-unions with bone defects. *Injury.* octubre de 2017;48(10):2276-84.
153. Corona PS, Ramirez-Nuñez LJ, Amat C, Carrera L. Outcome of oscillating saw open osteotomy in two-stage lower extremity bone transport with monolateral frame. *Injury.* octubre de 2017;48(10):2285-91.
154. Catagni MA, Guerreschi F, Lovisetti L. Distraction osteogenesis for bone repair in the 21st century: lessons learned. *Injury.* junio de 2011;42(6):580-6.
155. Aimar A, Palermo A, Innocenti B. The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art. *J Healthc Eng.* 2019;2019:5340616.
156. Keller M, Guebeli A, Thieringer F, Honigmann P. Overview of In-Hospital 3D Printing and Practical Applications in Hand Surgery. *BioMed Res Int.* 26 de marzo de 2021;2021:4650245.
157. Su A, Al'Aref SJ. Chapter 1 - History of 3D Printing. En: Al'Aref SJ, Mosadegh B, Dunham S, Min JK, editores. *3D Printing Applications in Cardiovascular Medicine* [Internet]. Boston: Academic Press; 2018 [citado 7 de octubre de 2023]. p. 1-10. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128039175000018>
158. Horvath J. A Brief History of 3D Printing. En: Horvath J, editor. *Mastering 3D Printing* [Internet]. Berkeley, CA: Apress; 2014 [citado 7 de octubre de 2023]. p. 3-10. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4842-0025-4_1
159. Byrne N, Velasco Forte M, Tandon A, Valverde I, Hussain T. A systematic review of image segmentation methodology, used in the additive manufacture of patient-specific 3D printed models of the cardiovascular system. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2016;5:2048004016645467.

160. Mitsouras D, Liacouras P, Imanzadeh A, Giannopoulos AA, Cai T, Kumamaru KK, et al. Medical 3D Printing for the Radiologist. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc*. 2015;35(7):1965-88.
161. George E, Liacouras P, Lee TC, Mitsouras D. 3D-Printed Patient-Specific Models for CT- and MRI-Guided Procedure Planning. *AJNR Am J Neuroradiol*. julio de 2017;38(7):E46-7.
162. 14:00-17:00. ISO. [citado 7 de octubre de 2023]. ISO 17296-2:2015. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/61626.html>
163. Tack P, Victor J, Gemmel P, Annemans L. 3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review. *Biomed Eng OnLine*. 21 de octubre de 2016;15(1):115.
164. Wu AM, Lin JL, Kwan KYH, Wang XY, Zhao J. 3D-printing techniques in spine surgery: the future prospects and current challenges. *Expert Rev Med Devices*. junio de 2018;15(6):399-401.
165. Lal H, Patralekh MK. 3D printing and its applications in orthopaedic trauma: A technological marvel. *J Clin Orthop Trauma*. 2018;9(3):260-8.
166. Mulford JS, Babazadeh S, Mackay N. Three-dimensional printing in orthopaedic surgery: review of current and future applications. *ANZ J Surg*. septiembre de 2016;86(9):648-53.
167. Bagaria V, Deshpande S, Rasalkar DD, Kuthe A, Paunipagar BK. Use of rapid prototyping and three-dimensional reconstruction modeling in the management of complex fractures. *Eur J Radiol*. diciembre de 2011;80(3):814-20.
168. Tzavellas AN, Kenanidis E, Potoupnis M, Tsiridis E. Chapter 10 - 3D printing in orthopedic surgery. En: Tsoulfas G, Bangeas PI, Suri JS, editores. *3D Printing: Applications in Medicine and Surgery* St. Louis: Elsevier; 2020. p. 133-41.
169. Wang X, Xu S, Zhou S, Xu W, Leary M, Choong P, et al. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials*. marzo de

- 2016;83:127-41.
170. Alvarez K, Nakajima H. Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials*. 23 de julio de 2009;2(3):790-832.
171. Kim KB, Kim WC, Kim HY, Kim JH. An evaluation of marginal fit of three-unit fixed dental prostheses fabricated by direct metal laser sintering system. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater*. julio de 2013;29(7):e91-96.
172. Hoffmann W, Bormann T, Rossi A, Müller B, Schumacher R, Martin I, et al. Rapid prototyped porous nickel–titanium scaffolds as bone substitutes. *J Tissue Eng*. 24 de junio de 2014;5:2041731414540674.
173. Haberland C, Elahinia M, Walker JM, Meier H, Frenzel J. On the development of high quality NiTi shape memory and pseudoelastic parts by additive manufacturing. *Smart Mater Struct*. septiembre de 2014;23(10):104002.
174. Zheng YF, Gu XN, Witte F. Biodegradable metals. *Mater Sci Eng R Rep*. 1 de marzo de 2014;77:1-34.
175. Chen Y, Zhang S, Li J, Song Y, Zhao C, Wang H, et al. Influence of Mg 2+ concentration, pH value and specimen parameter on the hemolytic property of biodegradable magnesium. *Mater Sci Eng B-Adv Funct Solid-State Mater*. 2011;176:1823-6.
176. Roopavath UK, Kalaskar DM. 1 - Introduction to 3D printing in medicine. En: Kalaskar DM, editor. *3D Printing in Medicine*. Woodhead Publishing; 2017 p. 1-20.
177. Williams, DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. julio de 2008;(20):2941-53.
178. Rynio P, Galant K, Wójcik Ł, Grygorcewicz B, Kazimierczak A, Falkowski A, et al. Effects of Sterilization Methods on Different 3D Printable Materials for Templates of Physician-Modified Aortic Stent Grafts Used in Vascular Surgery—A Preliminary Study. *Int J Mol Sci*. 24 de marzo de 2022;23(7):3539.
179. Lakkala P, Munnangi SR, Bandari S, Repka M. Additive manufacturing

- technologies with emphasis on stereolithography 3D printing in pharmaceutical and medical applications: A review. *Int J Pharm* X. diciembre de 2023;5:100159.
180. Rybicki FJ, Grant GT. *3D Printing in Medicine: A Practical Guide for Medical Professionals*. Springer International Publishing; 2017. 138 p.
181. Park BJ, Choi HJ, Moon SJ, Kim SJ, Bajracharya R, Min JY, et al. Pharmaceutical applications of 3D printing technology: current understanding and future perspectives. *J Pharm Investig*. 2018
182. Sadia M, Sośnicka A, Arafat B, Isreb A, Ahmed W, Kelarakis A, et al. Adaptation of pharmaceutical excipients to FDM 3D printing for the fabrication of patient-tailored immediate release tablets. *Int J Pharm*. 20 de noviembre de 2016;513(1-2):659-68.
183. Reddy MV, Eachempati K, Gurava Reddy AV, Mugalur A. Error Analysis: How Precise is Fused Deposition Modeling in Fabrication of Bone Models in Comparison to the Parent Bones? *Indian J Orthop*. 2018;52(2):196-201.
184. Konta AA, García-Piña M, Serrano DR. Personalised 3D Printed Medicines: Which Techniques and Polymers Are More Successful? *Bioengineering*. 22 de septiembre de 2017;4(4):79.
185. Arefin AME, Khatri NR, Kulkarni N, Egan PF. Polymer 3D Printing Review: Materials, Process, and Design Strategies for Medical Applications. *Polymers*. 6 de mayo de 2021;13(9):1499.
186. Garcia J, Yang Z, Mongrain R, Leask RL, Lachapelle K. 3D printing materials and their use in medical education: a review of current technology and trends for the future. *BMJ Simul Technol Enhanc Learn*. enero de 2018;4(1):27-40.
187. Ji Q, Wang Z, Yi J, Tang X. Mechanical Properties and a Constitutive Model of 3D-Printed Copper Powder-Filled PLA Material. *Polymers*. 19 de octubre de 2021;13(20):3605.
188. Bandari S, Nyavanandi D, Dumpa N, Repka MA. Coupling hot melt extrusion and fused deposition modeling: Critical properties for

- successful performance. *Adv Drug Deliv Rev.* mayo de 2021;172:52-63.
189. Tan DK, Maniruzzaman M, Nokhodchi A. Advanced Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion Coupled with Fused Deposition Modelling (FDM) 3D Printing for Personalised Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 24 de octubre de 2018;10(4):203.
190. Goole J, Amighi K. 3D printing in pharmaceuticals: A new tool for designing customized drug delivery systems. *Int J Pharm.* 29 de febrero de 2016;499(1-2):376-94.
191. Mouriño V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *J R Soc Interface.* 28 de octubre de 2009;7(43):209-27.
192. Ortega-Yago A, Ferràs-Tarragó J, de la Calva-Ceinos C, Baeza-Oliete J, Angulo-Sánchez MA, Baixauli-García I, et al. Mechanical resistance of polylactic acid bone matrices developed by 3D printing for the reconstruction of bone defects. *Rev Espanola Cirugia Ortop Traumatol.* 7 de febrero de 2023;S1888-4415(23)00037-1.
193. Fu J, Yu X, Jin Y. 3D printing of vaginal rings with personalized shapes for controlled release of progesterone. *Int J Pharm.* 25 de marzo de 2018;539(1-2):75-82.
194. Li J, Wu C, Chu P, Gelinsky M. 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. *Mater Sci Eng R Rep.* 1 de abril de 2020;140:100543.
195. Aita IE, Breitzkreutz J, Quodbach J. Investigation of semi-solid formulations for 3D printing of drugs after prolonged storage to mimic real-life applications. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 15 de abril de 2020;146:105266.
196. Tirella A, Vozzi F, Vozzi G, Ahluwalia A. PAM2 (piston assisted microsyringe): a new rapid prototyping technique for biofabrication of cell incorporated scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods.* febrero de 2011;17(2):229-37.
197. Karavasili C, Gkaragkounis A, Moschakis T, Ritzoulis C, Fatouros DG.

- Pediatric-friendly chocolate-based dosage forms for the oral administration of both hydrophilic and lipophilic drugs fabricated with extrusion-based 3D printing. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 30 de abril de 2020;147:105291.
198. Singh M, Haverinen HM, Dhagat P, Jabbour GE. Inkjet printing-process and its applications. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* 9 de febrero de 2010;22(6):673-85.
199. Zhang H, Moon S, Ngo T. 3D Printed Electronics of Non-contact Ink Writing Techniques: Status and Promise. *Int J Precis Eng Manuf-Green Technol.* 17 de julio de 2019;7.
200. Khan S, Dahiya R, Lorenzelli L. Technologies for Printing Sensors and Electronics Over Large Flexible Substrates: A Review. *IEEE Sens J.* 4 de diciembre de 2014;PP.
201. de Gans BJ, Duineveld P, Schubert U. Inkjet Printing of Polymers: State of the Art and Future Developments. *Adv Mater.* 3 de febrero de 2004;16:203-13.
202. Kim SY, Kim K, Hwang YH, Park J, Jang J, Nam Y, et al. High-Resolution, Electrohydrodynamic Inkjet Printing of Stretchable, Metal Oxide Semiconductor Transistors with High Performances. *Nanoscale.* 6 de octubre de 2016;8.
203. Vaezi M, Yang S. Freeform fabrication of nano-biomaterials using 3D printing. En: *Rapid Prototyping of Biomaterials: Principles and Applications.* 2013.
204. Derby B. Bioprinting: Inkjet Printing Proteins and Hybrid Cell-Containing Materials and Structures. *J Mater Chem.* 25 de noviembre de 2008;18:5717-21.
205. Saunders R, Derby B. Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: Bioprinting. *Int Mater Rev.* 1 de noviembre de 2014;59:430-48.
206. Boudriau S, Hanzel C, Massicotte J, Sayegh L, Wang J, Lefebvre M. Randomized Comparative Bioavailability of a Novel Three-Dimensional Printed Fast-Melt Formulation of Levetiracetam Following the

- Administration of a Single 1000-mg Dose to Healthy Human Volunteers Under Fasting and Fed Conditions. *Drugs RD*. junio de 2016;16(2):229-38.
207. López-Iglesias C, Casielles A, Altay Benetti A, Bettini R, Alvarez-Lorenzo C, García-González CA. From the printer to the lungs: Inkjet-printed aerogel particles for pulmonary delivery. *Chem Eng J*. 1 de septiembre de 2018;357.
208. Deshmane S, Kendre P, Mahajan H, Jain S. Stereolithography 3D printing technology in pharmaceuticals: a review. *Drug Dev Ind Pharm*. septiembre de 2021;47(9):1362-72.
209. Rocheva VV, Koroleva AV, Savelyev AG, Khaydukov KV, Generalova AN, Nechaev AV, et al. High-resolution 3D photopolymerization assisted by upconversion nanoparticles for rapid prototyping applications. *Sci Rep*. 26 de febrero de 2018;8(1):3663.
210. Zhang J, Dumur F, Xiao P, Graff B, Bardelang D, Gigmes D, et al. Structure Design of Naphthalimide Derivatives: Toward Versatile Photoinitiators for Near-UV/Visible LEDs, 3D Printing, and Water-Soluble Photoinitiating Systems. *Macromolecules*. 14 de abril de 2015;48:2054-63.
211. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng*. 2015;9:4.
212. Wang X, Jiang M, Zhou Z, Gou J, Hui D. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. *Compos Part B Eng*. 1 de febrero de 2017;110:442-58.
213. Salmoria GV, Cardenuto MR, Roesler CRM, Zepon KM, Kanis LA. PCL/Ibuprofen Implants Fabricated by Selective Laser Sintering for Orbital Repair. *Procedia CIRP*. 1 de enero de 2016;49:188-92.
214. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubrue P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*. septiembre de 2012;33(26):6020-41.
215. Pagac M, Hajnys J, Ma QP, Jancar L, Jansa J, Stefek P, et al. A Review

- of Vat Photopolymerization Technology: Materials, Applications, Challenges, and Future Trends of 3D Printing. *Polymers*. enero de 2021;13(4):598.
216. Bagheri A, Jin J. Photopolymerization in 3D Printing. *ACS Appl Polym Mater*. 20 de febrero de 2019;1.
217. Ahmad J, Garg A, Mustafa G, Mohammed AA, Ahmad MZ. 3D Printing Technology as a Promising Tool to Design Nanomedicine-Based Solid Dosage Forms: Contemporary Research and Future Scope. *Pharmaceutics*. 10 de mayo de 2023;15(5):1448.
218. Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, Spence DM. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal Chem*. 1 de abril de 2014;86(7):3240-53.
219. Lu ZL, Cao J, Bai SZ, Wang MY, Li DC. Microstructure and mechanical properties of TiAl-based composites prepared by Stereolithography and gelcasting technologies. *J Alloys Compd*. 5 de junio de 2015;633.
220. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. agosto de 2010;31(24):6121-30.
221. Bongiovanni R, Vitale A. Vat Photopolymerization. En: Marasso SL, Cocuzza M, editores. *High Resolution Manufacturing from 2D to 3D/4D Printing: Applications in Engineering and Medicine*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 17-46.
222. Ahn D, Stevens LM, Zhou K, Page ZA. Rapid High-Resolution Visible Light 3D Printing. *ACS Cent Sci*. 23 de septiembre de 2020;6(9):1555-63.
223. Zhao Z, Tian X, Song X. Engineering Materials with Light: Recent Progresses in Digital Light Processing Based 3D Printing. *J Mater Chem C*. 2020;8.
224. Della Bona A, Cantelli V, Britto VT, Collares KF, Stansbury JW. 3D printing restorative materials using a stereolithographic technique: a systematic review. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater*. febrero de

- 2021;37(2):336-50.
225. Vitale A, Cabral JT. Frontal Conversion and Uniformity in 3D Printing by Photopolymerisation. *Materials*. 7 de septiembre de 2016;9(9):760.
226. Bifano M. Digital Light Processing: A Review on the Printing Resolution and the Materials Options. *Appl Comput Eng*. 5 de mayo de 2022;1:17-25.
227. Steyrer B, Buseti B, Harakály G, Liska R, Stampfl J. Hot Lithography vs. room temperature DLP 3D-printing of a dimethacrylate. *Addit Manuf*. 1 de marzo de 2018;21.
228. Tumbleston JR, Shirvanyants D, Ermoshkin N, Janusziewicz R, Johnson AR, Kelly D, et al. Additive manufacturing. Continuous liquid interface production of 3D objects. *Science*. 20 de marzo de 2015;347(6228):1349-52.
229. Johnson AR, Caudill CL, Tumbleston JR, Bloomquist CJ, Moga KA, Ermoshkin A, et al. Single-Step Fabrication of Computationally Designed Microneedles by Continuous Liquid Interface Production. *PloS One*. 2016;11(9):e0162518.
230. Mousavi A, Provaggi E, Kalaskar DM, Savoji H. 2 - 3D printing families: laser, powder, and nozzle-based techniques. En: Kalaskar DM, editor. *3D Printing in Medicine (Second Edition)* Woodhead Publishing; 2023 p. 29-57.
231. Lee JW, Ahn G, Kim D. Development of nano- and microscale composite 3D scaffolds using PPF/DEF-HA and micro-stereolithography. *Microelectron Eng*. 1 de abril de 2009;86:1465-7.
232. Ballard DH, Tappa K, Boyer CJ, Jammalamadaka U, Hemmanur K, Weisman JA, et al. Antibiotics in 3D-printed implants, instruments and materials: benefits, challenges and future directions. *J 3d Print Med*. 3(2):83-93.
233. Doganay MT, John Chelliah C, Tozluyurt A, Hujer AM, Obaro SK, Gurkan U, et al. 3D printed materials for combating antimicrobial resistance. *Mater Today*. 1 de julio de 2023;67:371-98.

234. Wang J, Goyanes A, Gaisford S, Basit AW. Stereolithographic (SLA) 3D printing of oral modified-release dosage forms. *Int J Pharm.* 30 de abril de 2016;503(1):207-12.
235. Suryavanshi P, Chaudhari VS, Banerjee S. Customized 3D-printed hollow capsular device filled with norfloxacin-loaded micropellets for controlled-release delivery. *Drug Deliv Transl Res.* 1 de mayo de 2023;13(5):1183-94.
236. Chiş AA, Rus LL, Morgovan C, Arseniu AM, Frum A, Vonica-Țincu AL, et al. Microbial Resistance to Antibiotics and Effective Antibiotherapy. *Biomedicines.* 12 de mayo de 2022;10(5):1121.
237. Antimicrobial consumption, costs and resistance patterns: a two year prospective study in a Romanian intensive care unit - PubMed [Internet]. [citado 9 de diciembre de 2023].
238. Sa Y, Yang F, Wang Y, Wolke JGC, Jansen JA. Modifications of Poly(Methyl Methacrylate) Cement for Application in Orthopedic Surgery. En: Chun HJ, Park CH, Kwon IK, Khang G, editores. *Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine*. Singapore: Springer; 2018 p. 119-34.
239. Carballo M, Aguayo S, González M, Esperon F, Torre ADL. Environmental Assessment of Tetracycline's Residues Detected in Pig Slurry and Poultry Manure. *J Environ Prot.* 2016;07(01):82-92.
240. Daghrir R, Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett.* 2013;11(3):209-27.
241. Yadav V, Sharma PK, Murty US, Mohan NH, Thomas R, Dwivedy SK, et al. 3D printed hollow microneedles array using stereolithography for efficient transdermal delivery of rifampicin. *Int J Pharm.* 10 de agosto de 2021;605:120815.
242. Ranganathan SI, Kohama C, Mercurio T, Salvatore A, Benmassaoud MM, Kim TWB. Effect of temperature and ultraviolet light on the bacterial kill effectiveness of antibiotic-infused 3D printed implants. *Biomed Microdevices.* 26 de agosto de 2020;22(3):59.

243. Holländer J, Genina N, Jukarainen H, Khajeheian M, Rosling A, Mäkilä E, et al. Three-Dimensional Printed PCL-Based Implantable Prototypes of Medical Devices for Controlled Drug Delivery. *J Pharm Sci.* septiembre de 2016;105(9):2665-76.
244. Qamar N, Abbas N, Irfan M, Hussain A, Arshad MS, Latif S, et al. Personalized 3D printed ciprofloxacin impregnated meshes for the management of hernia. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 de octubre de 2019;53:101164.
245. Scaffaro R, Botta L, Maio A, Gallo G. Incorporation of an Antibiotic in Poly(Lactic Acid) and Polypropylene by Melt Processing. *J Appl Biomater Funct Mater.* 1 de julio de 2016;14(3):e240-7.
246. Domsta V, Seidlitz A. 3D-Printing of Drug-Eluting Implants: An Overview of the Current Developments Described in the Literature. *Molecules.* 2 de julio de 2021;26(13):4066.
247. Kollamaram G, Croker DM, Walker GM, Goyanes A, Basit AW, Gaisford S. Low temperature fused deposition modeling (FDM) 3D printing of thermolabile drugs. *Int J Pharm.* 10 de julio de 2018;545(1-2):144-52.
248. Doped Halloysite Nanotubes for Use in the 3D Printing of Medical Devices - PubMed [Internet]. [citado 8 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29244755/>
249. Benmassaoud MM, Kohama C, Kim TWB, Kadlowec JA, Foltiny B, Mercurio T, et al. Efficacy of eluted antibiotics through 3D printed femoral implants. *Biomed Microdevices.* 15 de junio de 2019;21(3):51.
250. Glinka M, Filatova K, Kucińska-Lipka J, Bergerova ED, Wasik A, Sedlařík V. Encapsulation of Amikacin into Microparticles Based on Low-Molecular-Weight Poly(lactic acid) and Poly(lactic acid-co-polyethylene glycol). *Mol Pharm.* 2 de agosto de 2021;18(8):2986-96.
251. Cui M, Hu N, Fang D, Sun H, Pan H, Pan W. Fabrication and evaluation of customized implantable drug delivery system for orthopedic therapy based on 3D printing technologies. *Int J Pharm.* 25 de abril de 2022;618:121679.

252. Tappa K, Jammalamadaka U, Weisman JA, Ballard DH, Wolford DD, Pascual-Garrido C, et al. 3D Printing Custom Bioactive and Absorbable Surgical Screws, Pins, and Bone Plates for Localized Drug Delivery. *J Funct Biomater*. 1 de abril de 2019;10(2):17.
253. Piot N, Barry F, Schlund M, Ferri J, Demondion X, Nicot R. 3D printing for orbital volume anatomical measurement. *Surg Radiol Anat*. 1 de julio de 2022;44(7):991-8.
254. Prendergast ME, Burdick JA. Recent Advances in Enabling Technologies in 3D Printing for Precision Medicine. *Adv Mater*. 2020;32(13):1902516.
255. AL-Dwairi PZ, Ebrahim A, Baba N. A Comparison of the Surface and Mechanical Properties of 3D Printable Denture-Base Resin Material and Conventional Polymethylmethacrylate (PMMA). *J Prosthodont*. 1 de febrero de 2022;32.
256. Applied Plastics Engineering Handbook - 3rd Edition [Internet]. [citado 7 de enero de 2024]. Disponible en: <https://shop.elsevier.com/books/applied-plastics-engineering-handbook/kutz/978-0-323-88667-3>
257. Fouly A, Albahkali T, Abdo HS, Salah O. Investigating the Mechanical Properties of Annealed 3D-Printed PLA–Date Pits Composite. *Polymers*. 13 de agosto de 2023;15(16):3395.
258. Dizon JRC, Espera AH, Chen Q, Advincula RC. Mechanical characterization of 3D-printed polymers. *Addit Manuf*. 1 de marzo de 2018;20:44-67.
259. Formlabs White Paper: How Mechanical Properties of Stereolithography 3D Prints are Affected by UV Curing. By Zachary Zguris, PhD formlabs.
260. Maydanshahi MR, Nazarian A, Eygendaal D, Ebrahimzadeh MH, Kachooei AR, Shaegh SAM. 3D printing-assisted fabrication of a patient-specific antibacterial radial head prosthesis with high periprosthetic bone preservation. *Biomed Mater*. marzo de 2021;16(3):035027.

261. Kong L, Mei J, Ge W, Jin X, Chen X, Zhang X, et al. Application of 3D Printing-Assisted Articulating Spacer in Two-Stage Revision Surgery for Periprosthetic Infection after Total Knee Arthroplasty: A Retrospective Observational Study. *BioMed Res Int.* 8 de febrero de 2021;2021:3948638.
262. Allen B, Moore C, Seyler T, Gall K. Modulating antibiotic release from reservoirs in 3D-printed orthopedic devices to treat periprosthetic joint infection. *J Orthop Res.* 2020;38(10):2239-49.
263. Weiss BD, Weiss EC, Haggard WO, Evans RP, McLaren SG, Smeltzer MS. Optimized Elution of Daptomycin from Polymethylmethacrylate Beads. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2009;53(1):264-6.
264. Funk GA, Menuey EM, Ensminger WP, Kilway KV, McIff TE. Elution of rifampin and vancomycin from a weight-bearing silorane-based bone cement. *Bone Jt Res.* abril de 2021;10(4):277-84.
265. von Hertzberg-Boelch SP, Luedemann M, Rudert M, Steinert AF. PMMA Bone Cement: Antibiotic Elution and Mechanical Properties in the Context of Clinical Use. *Biomedicines.* 29 de julio de 2022;10(8):1830.
266. PMMA Cements [Internet]. [citado 9 de enero de 2024]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/9783642415357>
267. Health C for D and R. Technical Considerations for Additive Manufactured Medical Devices . FDA; 2020 Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/technical-considerations-additive-manufactured-medical-devices>
268. UNE-EN ISO 13485:2018 Productos sanitarios. Sistemas de gestión Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0060449>
269. Malbrán, CG. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. MIC Testing. *Serv Antimicrob - INEI-ANLIS.* enero de 2012;32(2).

