



Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología

www.elsevier.es/rot



INVESTIGACIÓN

Eficacia bactericida *in vivo* del farnesol sobre implantes de Ti6Al4V



J.A. Constantino^{a,b,*}, M. Delgado-Rastrollo^{c,e}, M.A. Pacha-Olivenza^{d,e},
C. Pérez-Giraldo^{c,e}, M. Quiles^{a,b}, M.L. González-Martín^{d,e} y A.M. Gallardo-Moreno^{d,e}

^a Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, España

^b Departamento de Terapéutica Médico Quirúrgica, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, España

^c Departamento de Ciencias Biomédicas, Área Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, España

^d Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, España

^e Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) (CIBER-BBN), España

Recibido el 3 de agosto de 2015; aceptado el 21 de abril de 2016

Disponible en Internet el 26 de mayo de 2016

PALABRAS CLAVE

Ti6Al4V;
Farnesol;
Bactericida;
Infección;
In vivo

Resumen

Objetivo: Evaluar *in vivo* la actividad bactericida antiestafilocócica del farnesol sobre superficies de Ti6Al4V.

Material y métodos: Se desarrolló un modelo experimental de infecciones en biomateriales inoculando *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en los fémures de 15 ratas wistar. Seguidamente se insertó una aguja de Ti6Al4V impregnada con farnesol 30 mM en el fémur estudio y una aguja control en el fémur control. Para valorar la eficacia bactericida se compararon las medianas de unidades formadoras de colonias recuperadas después de la inoculación en el grupo estudio y en el grupo control, para diferentes tiempos de eutanasia y tamaño de inóculos.

Resultados: La mediana expresada en Log₁₀ de los recuentos de UFC obtenidos en agujas de titanio con farnesol fue de 4,26 y en agujas sin farnesol, controles, fue de 4,86. Esta diferencia, al aplicar la prueba de t de Student para muestras relacionadas, resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,001$). La reducción mediana obtenida en las agujas con farnesol respecto a las agujas control fue del 74%.

Conclusiones: El tratamiento con farnesol de agujas de Ti6Al4V, a una concentración de 30 mM, parece disminuir la tasa de colonización por *Staphylococcus aureus* en dichas agujas.

© 2016 SECOT. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: jaconstan@gmail.com, juconstantic@unex.es (J.A. Constantino).

KEYWORDS

Ti6Al4V;
Farnesol;
Bactericidal;
Infection;
In vivo

In vivo* bactericidal efficacy of farnesol on Ti6Al4V implants*Abstract**

Objective: To evaluate the *in vivo* anti-staphylococcal bactericidal activity of farnesol on Ti6Al4V surfaces.

Material and methods: An experimental model of infection in biomaterials was developed by inoculation of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 into the canal of both femurs of 15 Wistar rats. A Ti6Al4V pin impregnated with 30 mM of farnesol was inserted into study femur, and a Ti6Al4V control was inserted into the control femur. To evaluate the bactericidal efficacy, a comparison was made between the median of the colony forming units recovered after inoculation in the study group and the control group for different times of euthanasia and inoculum size.

Results: The median expressed as Log₁₀ CFU counts obtained with farnesol titanium pin was 4.26, and in control group, it was 4.86, which was statistically significant ($P=.001$) on applying the Student *t* test for related samples.

The median reduction obtained in farnesol pins relative to the control was 74%.

Conclusions: Treatment with farnesol 30 mM on Ti6Al4V pins appears to decrease the rate of colonisation by *Staphylococcus aureus*.

© 2016 SECOT. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las infecciones en biomateriales implantados en seres vivos, normalmente, están asociadas a la formación de una biocapa que es difícil de erradicar. En la mayoría de los casos, es necesaria la retirada del implante infectado. Todo esto conlleva un aumento considerable de morbilidad, mortalidad y costes en la sanidad.

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosos mecanismos de defensa contra agentes antibacterianos, por lo que la resistencia a viejos y nuevos productos farmacéuticos está incrementándose.

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

El farnesol ($C_{15}H_{26}O$) es un compuesto orgánico natural, un alcohol sesquiterpeno acíclico que se encuentra ampliamente distribuido en muchos aceites esenciales, como citronela¹. Interviene en el *quorum sensing* de *Candida*, bloqueando la formación de biocapa, así como la producción de otros factores de virulencia por este hongo². El farnesol afecta al crecimiento de un número importante de bacterias y hongos, tales como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)^{2,3}, *Streptococcus mutans*⁴, *Fusarium graminearum*⁵, lo que señala su potencial uso como agente antimicrobiano⁶.

Bhattacharyya et al. han señalado que el farnesol penetra en la biocapa, se acumula en la membrana celular y a través de su mecanismo de acción aumenta la porosidad de la membrana celular⁷. Este aumento de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana a distintas sustancias podría incrementar la captación de antibióticos si se usaran en asociación con el farnesol, haría que la dosis de antibióticos necesaria fuera menor y esto disminuiría la posible aparición de resistencias. Es decir, el farnesol incrementaría la susceptibilidad de las bacterias a antibióticos y otros compuestos antimicrobianos⁸.

En un reciente artículo, Unnuntana et al. demostraron *in vitro* la capacidad del farnesol para inhibir la formación de biocapas de *S. aureus* meticilino sensible a concentraciones de 30 mM sobre discos de titanio⁹.

El objetivo del presente trabajo es analizar si el tratamiento con farnesol de la superficie de agujas de Ti6Al4V previa a su implantación en el fémur de ratas disminuye la tasa de colonización por *S. aureus* en dichas agujas y en el fémur que las contiene.

Material y métodos**Material de osteosíntesis: Ti6Al4V**

La aleación de Ti6Al4V fue suministrada por Kirschner Maschienenbau GmbH (Unterschneidheim, Alemania) en forma de alambre de dimensión 1,2 × 150 mm, que se cortó mediante un cortafrio en porciones de 1,2 × 20 mm.

El protocolo de limpieza de las agujas previa a su implantación fue el siguiente: Derquim DSF al 2%, sonicación, inmersión en agua destilada a 60 °C durante 15 min, 10 min en acetona al 70% y finalmente horno Pasteur durante 30 min a 40 °C.

Las agujas se dividieron en 2 grupos:

- a) Las que iban a ser empleadas como agujas control, que no fueron tratadas mediante ningún otro proceso.
- b) Las agujas que iban a ser utilizadas para estudiar el efecto bactericida del farnesol sobre la aleación de Ti6Al4V, las cuales fueron sometidas, además de al proceso anterior, a:
 1. Inmersión en piraña con 5 ml de H_2SO_4 concentrado a 5 ml y H_2O_2 del 30% durante una hora.
 2. Lavados con agua y etanol en un baño de ultrasonidos durante 10 min en cada uno de ellos.
 3. Inmersión de las agujas en una disolución de farnesol (30 mM) durante 24 h.

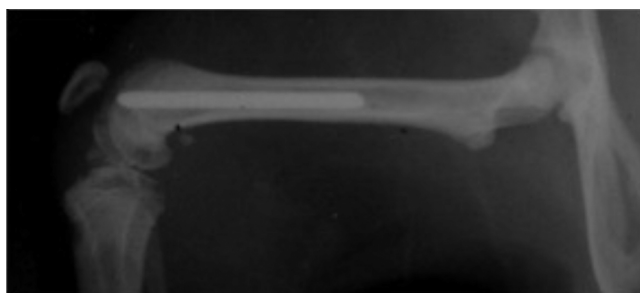


Figura 1 Radiografía de fémur con aguja de Ti6Al4V implantada en su interior.

4. Por último, se dejaron secar en un papel absorbente estéril 2-3 h en el horno Pasteur a 50 °C.

Agente patógeno

El patógeno utilizado fue *S. aureus*, la cepa ATCC 29213 (American Type Culture Collection). Se dejó crecer la bacteria durante 18-24 h en una estufa a 37 °C en caldo de soja tripticasa (*tryptic soy broth* o TSB) (BBL, Becton Dickinson and Company, Sparks, EE. UU.). Posteriormente se realizaron las diluciones oportunas hasta conseguir la concentración final deseada de bacterias.

Animal de experimentación

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

Se planificó en este estudio intervenir a 15 ratas wistar de sexo masculino de peso similar (300-350 g). Sin profilaxis antibiótica preoperatoria, se realizó la implantación aleatoria de una aguja de titanio Ti6Al4V de 1,2 × 20 mm en cada fémur de las ratas (fig. 1), una aguja tratada con farnesol y otra sin dicho tratamiento, de modo que una pata actuaba como pata estudio, la que contenía la aguja con farnesol, y la otra pata como control, la que albergaba la aguja sin farnesol.

La eutanasia de las ratas fue planificada en 2 tiempos, a las 24 h (7 ratas) y a las 72 h postintervención (8 ratas).

Técnica quirúrgica, eutanasia, recogida y procesamiento de muestras

La solución anestésica estaba compuesta por: 50% que- tamina, 40% diazepam y 10% atropina y la dosis que se administró fue de 0,004 ml/kg peso por vía intraperitoneal. Se realizó un abordaje pararrotuliano interno de 1 cm con luxación externa de la rótula. Se practicó un orificio en la región intercondílea mediante punción manual con la aguja de un catéter Abbocath del número 20, avanzando en profundidad desde la zona metafisaria hasta llegar a 3,5 cm en la diáfisis femoral, creando así un canal intramedular y respetando siempre las corticales. Se amplió posteriormente el diámetro de dicho canal usando agujas de Abbocath de calibres progresivamente mayores (números 18 y 16). Seguidamente con ayuda de una microjeringa introducida en la

profundidad del canal, se inoculó lentamente en cada pata 10 µL de diferentes inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 con un número aproximado de bacterias entre 300 y 1.300. Siempre se inoculaba el mismo número de bacterias en la pata estudio y en la pata control. Finalmente, previa aleatorización, se introdujo en las cavidades creadas las agujas de titanio Ti6Al4V de 1,2 × 20 mm, con farnesol en la pata estudio y sin farnesol en la pata control.

Una vez terminada la intervención, las ratas fueron estabuladas en jaulas independientes durante el tiempo requerido hasta su eutanasia con alimentación y mantenimiento rutinario.

Siguiendo la planificación del estudio, en el momento adecuado (24-72 h de la intervención) se sacrificaron las ratas. La eutanasia se realizó mediante inyección intracardiaca de 0,5 ml de ClK/100 g de peso corporal, previa sedación del animal con la misma solución anestésica descrita anteriormente. Al mismo tiempo se tomó una muestra de sangre por punción cardiaca para realizar hemocultivo y valorar la existencia de posible bacteriemia.

Inmediatamente después y bajo estrictas condiciones de asepsia en quirófano, se realizó la extirpación seriada de ambos fémures, desarticulándolos de las rodillas y de las caderas con la mínima cantidad posible de tejido muscular. Siempre se tuvo la precaución de utilizar un material quirúrgico estéril para cada pata. Una vez extraídos los fémures, eran fracturados con una pinza gubia para obtener la aguja intramedular. Tanto los fémures como las agujas intramedulares se recogieron en tubos separados con PBS estéril que eran rotulados para identificar si procedían de la pata izquierda o derecha y el número de bacterias que se habían inoculado.

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

Las diluciones bacterianas se llevaron a cabo mediante sonicación durante 15 min en un baño de ultrasonidos (Ultrasons P Selecta, Madrid, España), para despegar las bacterias adheridas fuertemente a las muestras. Una vez resuspendidas las bacterias en el medio, se llevaron a cabo las diluciones seriadas y la posterior siembra en placas de agar común. Estas placas se incubaron durante 18-24 h a 37 °C en la estufa. Pasado este tiempo, se procedió a la realización del recuento, usando una lupa, y se recogieron los datos de las unidades formadoras de colonias (UFC) que habían crecido de las diferentes diluciones de cada muestra. Para conseguir un número de UFC por muestra más exacto, se calculó la media de las crecidas en la serie de diluciones de cada muestra.

Análisis estadístico

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

Tabla 1 Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en Log₁₀ UFC para tiempos de eutanasia de 24 h

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

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

Resultados

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

Para tiempos de eutanasia de 24 h no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los recuentos recuperados en agujas impregnadas en farnesol respecto a las agujas control, ni en los recuentos recuperados de fémures que contenían agujas con farnesol respecto a los fémures que contenían agujas control (tabla 1). Para tiempos de eutanasia de 72 h únicamente se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativas (t de Student) ($p = 0,004$) en la mediana expresada en Log₁₀ de los recuentos de UFC recuperados en agujas de titanio impregnadas con farnesol (4,31) respecto a los recuperados de agujas sin farnesol o controles (5,26). La reducción obtenida en las agujas tratadas con farnesol respecto a las agujas controles fue del 88% (fig. 2) (tabla 2). Al analizar los resultados en global sin tener en cuenta el tiempo de eutanasia, la mediana expresada en Log₁₀ de los recuentos de UFC obtenidos en agujas de titanio con farnesol fue de 4,26 y en agujas sin farnesol, controles, fue de 4,86. Esta diferencia, al aplicar la prueba

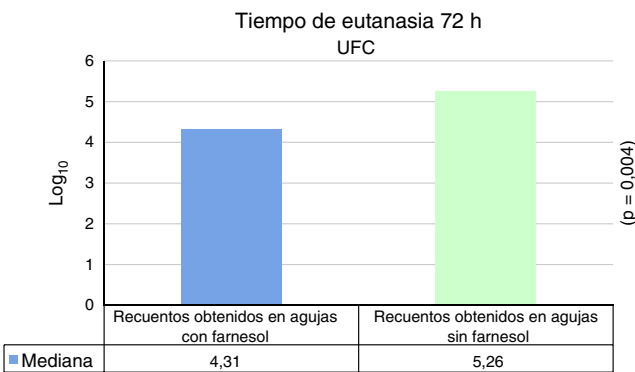


Figura 2 Gráfico que representa las medianas (Log₁₀) de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol, a las 72 h postinoculación.

de t de Student para muestras relacionadas, resultó ser estadísticamente significativa ($p = 0,001$). La reducción mediana obtenida en agujas con farnesol respecto a las agujas control fue del 74% (fig. 3) (tabla 3).

Discusión

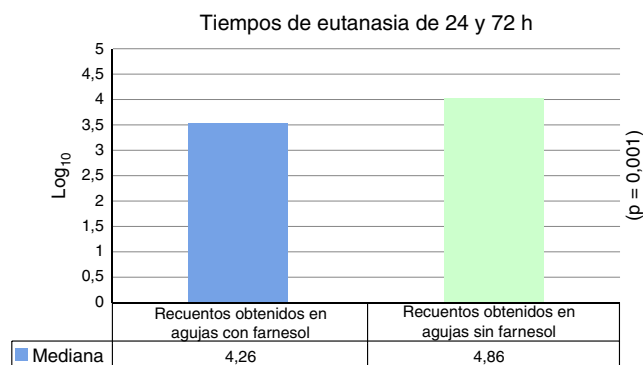
Nuevos biomateriales recubiertos de antibióticos están siendo investigados; sin embargo, su uso para la prevención de infecciones en biomateriales es controvertido, ya que la concentración de agentes bactericidas cargados en esos biomateriales podrían producir toxicidad local o sistémica y la prolongada liberación de antibióticos en cantidades subinhibitorias podría generar la aparición de

Tabla 2 Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en Log UFC para tiempos de eutanasia de 72 h

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

Tabla 3 Resumen de los estadísticos descriptivos obtenidos de los recuentos recuperados de agujas y fémures expresado en log UFC para tiempos de eutanasia de 48 h y 72 h

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

**Figura 3** Gráfico que representa las medianas (Log_{10}) de los recuentos de UFC obtenidos de agujas con farnesol y de agujas control sin farnesol o controles, independientemente del tiempo de eutanasia.

nuevas cepas de microorganismos resistentes¹⁰. Por lo tanto, hay una necesidad crítica de desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos con capacidad inhibitoria sin aumentar las resistencias. En este contexto las sustancias naturales empleadas en terapéutica tradicionalmente pueden jugar un importante papel.

El farnesol es un alcohol sesquiterpeno que se encuentra en los aceites esenciales de determinados frutos cítricos con actividad antimicótica y antibacteriana. Inicialmente se descubrió que el farnesol inhibía la comunicación intercelular en el hongo *Candida albicans*¹¹. También se ha demostrado que inhibe el proceso de filamentación y el sistema *quorum sensing* de hongos y ciertas bacterias^{2,7}. El farnesol parece no tener efectos tóxicos sistémicos o mutágenos ni *in vitro* ni *in vivo*².

Debido a todas estas propiedades, grupos de investigación han examinado su efecto en biocapas de *S. aureus in vitro*. Unnuntana et al. demostraron la capacidad del farnesol para inhibir la formación de biocapas de *S. aureus* metilino sensible a concentraciones de 30 mM en discos de titanio⁹. Los grupos de Jabra-Rizk y Gomes demostraron que concentraciones menores, de rango 200-300 μM , aún tenían efecto antibacteriano sobre las biocapas de *S. aureus* y atribuyen este efecto a la disrupción de la membrana celular del *S. aureus*^{3,11}.

En la literatura no hemos encontrado estudios *in vivo* que investiguen la influencia del farnesol en la prevención de la colonización de implantes de titanio por *S. aureus*. Basados en el artículo de Unnuntana et al., diseñamos este trabajo en

ratas utilizando agujas de Ti6Al4V impregnadas en una disolución de farnesol (30 mM).

Varios modelos experimentales de osteomielitis han sido desarrollados utilizando diferentes animales, tales como ratas¹²⁻¹⁴, conejos¹⁵, perros¹⁶, cerdos¹⁷, etc. En la mayoría de los modelos de osteomielitis, incluidos modelos en ratas, se utilizan distintos agentes y estrategias para facilitar la infección ósea: agentes esclerosantes, como el morruato de sodio¹³ o su derivado el ácido araquidónico¹⁸; la necrosis ósea térmica creada por electrocauterización¹⁹ o por el uso de broca para abrir el canal intramedular en el hueso. En nuestro modelo experimental no hemos utilizado ningún agente esclerosante, ni utilizado broca para perforar el fémur, ni cera ósea para taponar el agujero del canal, para intentar aislar el efecto del titanio como cuerpo extraño favorecedor de osteomielitis.

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

Para tiempos de eutanasia de 24 h no observamos una disminución estadísticamente significativa de los recuentos bacterianos obtenidos en agujas con farnesol respecto a las agujas controles. Ello puede ser debido al pequeño tamaño de la muestra de los subgrupos, de hecho, cuando se analizan en conjunto ambos subgrupos (24 y 48 h), sí se obtienen diferencias estadísticamente significativas.

El mecanismo íntimo de acción por el cual el farnesol tiene efecto antibacteriano se desconoce, aunque existen diferentes teorías aceptadas. El mecanismo de acción principal de esta sustancia parece ser que es la disrupción de la membrana celular del *S. aureus*. Dado el carácter lipídico de esta pequeña molécula, es relativamente fácil para el farnesol acumularse en la membrana celular provocando su rotura, evidenciándose esta por el aumento de la liberación de iones de potasio de las células de la membrana^{2,3}. Este aumento de iones potasio ocurre a los 10 s de la adición del farnesol, lo que indica que el farnesol es capaz de dañar la membrana de *S. aureus* muy rápidamente³. El farnesol también reduce la formación de matriz de fibrina por *S. aureus* mediante inhibición de la coagulasa^{2,7,13,20} e inhibe la vía de mevalonato, dificultando la apropiada

producción y reparación de la membrana celular^{8,20}. El farnesol, por tanto, incrementa la permeabilidad de la membrana de las células bacterianas, de forma inespecífica, a componentes químicos exógenos, incluidos antibióticos. Esto permitiría mejorar la eficacia de los antimicrobianos sobre las bacterias y en la biocapa de *S. aureus*. Algunos estudios *in vitro* han demostrado la capacidad del farnesol para incrementar la susceptibilidad de microorganismos a antimicrobianos, indicando su posible uso como fármaco adyuvante⁵. Brehm-Stecher et al.⁸ han publicado un incremento de susceptibilidad de *S. aureus* a ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina y vancomicina, así como de *E. coli* a polimixina B, cuando estos fármacos son combinados con farnesol.

La toxicidad local y sus posibles efectos nocivos sobre la osteointegración es siempre una preocupación cuando se utiliza cualquier agente nuevo directamente sobre el hueso. Unnuntana et al.⁹ investigaron *in vitro* los efectos del farnesol sobre los osteoblastos en discos de titanio. Estos autores demostraron que concentraciones de farnesol entre 3 y 30 mM tenían efectos negativos irreversibles sobre los preosteoblastos, de manera que estos se unían entre sí, formando conglomerados, pero no se extendían sobre la superficie del titanio. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios que muestran que el farnesol causa desorganización citoesquelética y apoptosis en otro tipos de células como son las tumorales^{21,22}. Actualmente no hay estudios *in vivo* que analicen a largo plazo la posible toxicidad local o general de esta sustancia. Sería necesario realizar estudios *in vivo* que valoraran histológica y radiográficamente a largo plazo el posible efecto negativo del farnesol sobre la osteointegración del titanio.

La principal limitación de este trabajo es el tamaño muestral, que nos impide tener una población mínima suficiente en los distintos subgrupos para valorar otras variables, como por ejemplo la influencia del tamaño del inóculo bacteriano en el efecto bactericida del farnesol sobre las agujas de Ti6Al4V.

Otra importante limitación es la utilización en este estudio de una cepa atenuada de *S. aureus* (ATCC 29213). Los resultados obtenidos con esta cepa podrían no corresponder con los obtenidos de cepas clínicas, cuyos factores de patogenicidad están intactos. Por lo tanto, serán necesarios más estudios en distintas cepas clínicas para confirmar que los resultados obtenidos pueden tener importancia clínica y que sean extrapolables a la práctica asistencial.

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

Así mismo, sería conveniente realizar un estudio *in vitro* que permitiera establecer la cinética de liberación del farnesol en las agujas de titanio, ya que si esta no es homogénea, podría explicar parte de la variabilidad observada en los resultados.

A raíz de los resultados obtenidos al realizar este estudio, y a pesar de la variabilidad intrínseca de los modelos *in vivo*, podemos concluir que el tratamiento con farnesol de agujas de Ti6Al4V, a una concentración de 30 mM, parece disminuir la tasa de colonización por *S. aureus* ATCC 29213 en dichas agujas implantadas en el fémur de una rata.

Nivel de evidencia

Nivel de evidencia I.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias a todos los miembros del Grupo de Investigación sobre Adhesión Microbiana de la Universidad de Extremadura (AM-UEx) del centro de Investigación Biomédica en Red Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBERBBN).

Bibliografía

1. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:446–75.
2. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1463–9.
3. Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H, Shimada J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;237:325–31.
4. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1302–9.

5. Semighini CP, Murray N, Harris SD. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;279:259–64.
6. Derengowski LS, de-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-de-Sousa TM, Bão SN, Kyaw CM, et al. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009;8:13.
7. Bhattacharyya S, Agrawal A, Knabe C, Ducheyne P. Sol-gel silica controlled release thin films for the inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials*. 2014;35:509–17.
8. Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3357–60.
9. Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirliff ME, Greenfield EM. The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts. An in vitro study. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91:2683–92.
10. Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*. 2010;31:6363–77.
11. Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol*. 2009;59:118–22.
12. Fukushima N, Yokoyama K, Sasahara T, Dobashi Y, Itoman M. Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: Relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2005;125:169–76.
13. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun*. 1985;47:581–6.
14. Power ME, Olson ME, Domingue PA, Costerton JW. A rat model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that provides a suitable system for studying the human infection. *J Med Microbiol*. 1990;33:189–98.
15. Jacob E, Arendt DM, Brook I, Durham LC, Falk MC, Schaberg SJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Staphylococcus aureus* cell walls in experimental osteomyelitis. *J Clin Microbiol*. 1985;22:547–52.
16. Fitzgerald RH Jr. Experimental osteomyelitis: Description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg Am*. 1983;65:371–80.
17. Passl R, Muller C, Zielinski CC, Eibl MM. A model of experimental post-traumatic osteomyelitis in guinea pigs. *J Trauma*. 1984;24:323–6.
18. Rissing JP, Buxton TB, Fisher J, Harris R, Shockley RK. Arachidonic acid facilitates experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun*. 1985;49:141–4.
19. Patterson AL, Galloway RH, Baumgartner JC, Barsoum IS. Development of chronic mandibular osteomyelitis in a miniswine model. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993;51:1358–62.
20. Kaneko M, Togashi N, Hamashima H, Hirohara M, Inoue Y. Effect of farnesol on mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot*. 2011;64:547–9.
21. Scheper MA, Shirliff ME, Meiller TF, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia*. 2008;10:954–63.
22. Miquel K, Pradines A, Favre G. Farnesol and geranylgeraniol induce actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;225:869–77.