

DEGRADABILIDAD AJUSTABLE Y BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS POROSAS PARA LA INGENIERIA EN TEJIDO OSEO

Elsa Paz Estévez^a, Amalia Plá Pérez^b

^a CEFAS. Universidad de Matanzas.

^b VRD. Universidad de Matanzas

Resumen: La sustitución o reparación de un órgano o tejido dañado sigue siendo un desafío para la medicina regenerativa en estos momentos. Su solución ha pasado por diferentes etapas, que han involucrado tres generaciones de materiales. Los biomateriales poliméricos de tercera generación, son materiales degradables y reabsorbibles, capaces de estimular la respuesta celular y molecular de manera controlada al ser utilizados en la ingeniería en tejido óseo en forma de andamios o matrices porosas, que a su vez sirven de soportes temporales de las matrices extracelulares donde debe desarrollarse el nuevo tejido hasta reemplazar el volumen ocupado inicialmente por el andamio. Desde el punto de vista cuantitativo, equiparar las tasas de degradación y de regeneración del nuevo tejido para garantizar el éxito de un implante óseo es un problema complejo y aún no resuelto. Una alta tasa de degradación afecta la biocompatibilidad del andamio, ya que pone en peligro el soporte mecánico que este representa y aumenta la cantidad de ácido láctico liberado por el polímero en este proceso, provocando una reacción inflamatoria del tejido huésped, mientras que una lenta degradación, evita la formación de la matriz extracelular al dificultar los procesos de diferenciación, adhesión y proliferación celular, conduciendo a la formación de un tejido fibroso alrededor del implante. La utilización de materiales compuestos polimérico-cerámicos en diferentes proporciones y la aplicación de diferentes recubrimientos con nanopartículas podrían lograr un acercamiento a mejores resultados. Una actualización del control de estos parámetros de monitoreo en la degradación hidrolítica para mejorar la biocompatibilidad es el objetivo de este trabajo.

Palabras claves: degradabilidad, biocompatibilidad, matrices poliméricas porosas, ingeniería en tejido óseo

Abstract: Replacing or repairing a damaged organ or tissue remains a challenge for regenerative medicine at this time. Your solution has gone through different stages, involving three generations of materials. Third-generation polymeric biomaterials are degradable and resorbable materials, capable of stimulating cellular and molecular response in a controlled manner when used in bone tissue engineering in the form of scaffolds or porous matrices, which in turn serve as temporary supports for the extracellular matrices where the new tissue must develop to replace the volume initially occupied by the scaffold. From a quantitative point of view, matching the degradation and regeneration rates of new tissue to ensure the success of a bone implant is a complex and yet unsolved problem. A high rate of degradation affects the biocompatibility of the scaffold, since it endangers the mechanical support that it represents and increases the amount of lactic acid released by the polymer in this process, causing an inflammatory reaction of the host tissue, while slow degradation, prevents the formation of the extracellular matrix by hindering the processes of differentiation, adhesion and cell proliferation, leading to the formation of a fibrous tissue around the implant. The use of polymeric-ceramic composite materials in different proportions and the application of different coatings with nanoparticles could achieve an approach to better results. An update of the control of these monitoring parameters in hydrolytic degradation to improve biocompatibility is the objective of this work.

1. Introducción.

La sustitución o reparación de un órgano o tejido dañado ha sido un desafío para la medicina durante mucho tiempo. Su solución ha transitado por diferentes fases que abarcan la utilización de prótesis fabricadas de materiales sintéticos, las cuales, en la mayoría de los casos no son capaces de recuperar todas las funciones de los órganos o tejidos reemplazados, hasta la utilización de distintos tipos de implantes: autólogos, aloimplantes y xenoimplantes, que también han presentado serias limitaciones asociadas a la cantidad de tejido que puede ser utilizada, a la morbilidad asociada al lugar del cuerpo donde se realice la extracción del tejido a trasplantar y a efectos secundarios, tales como, el riesgo de infección, dolor crónico en el área trasplantada, rechazo del tejido extraño, falta de tejido donante, etc. [1].

La ingeniería en tejido es un área interdisciplinar de la medicina regenerativa que combina los principios de la ingeniería, la biología, la ciencia de los materiales, la química, la física, etc., para obtener un tejido funcional in vitro que pueda sustituir un tejido dañado o la ausencia del mismo. El hueso es el segundo tejido más trasplantado en el mundo. Anualmente se hacen más de cuatro millones de operaciones de implantes de hueso para corregir defectos óseos provocados por trauma, cáncer, infecciones, artritis, etc. Los métodos tradicionales de implantes que involucran la primera y segunda generación de materiales tienen grandes impedimentos para lograr un proceso de implantación exitoso. El desarrollo de matrices porosas tridimensionales para la regeneración ósea se ha convertido en un área crucial dentro de la ingeniería en tejido óseo [2]. Existen diferentes tecnologías de fabricación, pero el campo de la medicina está muy interesado en la tecnología 3D que tiene la capacidad de crear soluciones adaptadas a cada paciente, ya que permite controlar parámetros como porosidad, tamaño del poro y morfología. Para un andamio personalizado concreto se puede lograr una buena adhesión y proliferación celular bajo carga, que es cuando mayores problemas pueden surgir en el transporte de nutrientes [3]. El material con el cual se fabrican dichas matrices tiene especial importancia, ya que ellos son los sustitutos temporales de las matrices extracelulares donde se desarrollará el nuevo tejido [4].

Dentro de los materiales usados en la ingeniería en tejido óseo los polímeros han resultado ser los más prometedores para la fabricación de andamios. Los materiales poliméricos brindan la posibilidad de añadir aditivos, incluyendo fármacos y biomoléculas, necesarios para un mejor desempeño físico-químico, mecánico, farmacológico y quirúrgico [5]. El uso de polímeros naturales ha mantenido un interés creciente en la Ingeniería en Tejidos Óseos (ITO) debido a sus propiedades favorables como son la ductilidad, biocompatibilidad y degradabilidad; además de contener moléculas biofuncionales en su superficie que promueven la adhesión, integración y diferenciación celular en los andamios. Los más investigados son el colágeno, la seda, el arginato, el quitosano y el ácido hialurónico. Sin embargo, su limitación fundamental está en la presencia de impurezas patógenas como endotoxinas y su dificultad para ajustar la tasa de degradación. Sus propiedades mecánicas tampoco son óptimas pero pueden ser mejoradas [6].

Los polímeros sintéticos obtenidos de agrobioproductos han resultado ser los más adecuados para su aplicación en ingeniería en tejido óseo. Entre ellos se encuentran poliésteres tales como el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poli(láctico) (PLA) y sus copolímeros. Uno de los más usados es el PLA, que es un poliéster alifático, termoplástico, semicristalino, biocompatible, biodegradable, con facilidad para ser moldeado y combinado con otros polímeros y cerámicas biodegradables, y el hecho de que su módulo de Young sea cercano al valor del hueso, lo hacen muy atractivo para ser utilizado en la fabricación de andamios degradables para implantes óseos. Sin embargo, la mayoría de estos polímeros, incluyendo el PLA, son altamente hidrofóbicos y no promueven el reconocimiento celular, cuando se utilizan solos en calidad de andamios, limitando su aplicación en ITO sin una modificación secundaria, ya sea, mediante la creación de un material compuesto o el tratamiento superficial del andamio para mejorar su bioactividad [7]. La alta hidrofobicidad del PLA genera una baja tasa de degradabilidad que no puede satisfacer la amplia gama de aplicaciones que pudiera tener, ya que, desde el punto de vista médico no presenta sitios de reconocimiento celular [8].

El PLA se obtiene a partir del ácido láctico que es derivado de productos agrícolas como el maíz, la remolacha y la caña de azúcar. El ácido láctico es un compuesto quiral, que dependiendo de su origen puede dar lugar al isómero D, el isómero L o una mezcla DL. Mientras el PLLA y el PDLA son semicristalinos, el PDLLA es amorfo [9]. El isómero L es un metabolito biológico que constituye la mayor fracción del PLA y se deriva de fuentes renovables ya que la mayor parte del ácido láctico proveniente de fuentes biológicas existe en esta forma L [10]. El PLLA es un polímero semicristalino con una temperatura de cristalización (T_c) de 180°C y una cristalinidad de hasta el 70% [11]. Este posee alta resistencia a la tensión y baja elongación [12]. Este polímero es uno de los más empleados ya que es adecuado para aplicaciones que pueden soportar carga tales como suturas o fijaciones ortopédica [13, 14].

El éxito de los implantes óseos utilizando andamios porosos degradables está en la relación que se establece entre el proceso de degradación hidrolítica y los mecanismos biológicos que se activan. Desde el punto de vista cuantitativo, equiparar las tasas de degradación y de regeneración del nuevo tejido para garantizar el éxito de un implante óseo es un problema complejo y aún no resuelto. Una alta tasa de degradación afecta la biocompatibilidad del andamio, ya que pone en peligro el soporte mecánico que este representa y aumenta la cantidad de ácido láctico liberado por el polímero en este proceso, provocando una reacción inflamatoria del tejido huésped; mientras que una lenta degradación, evita la formación de la matriz extracelular al dificultar los procesos de diferenciación, adhesión y proliferación celular, conduciendo a la formación de un tejido fibroso alrededor del implante. La utilización de materiales compuestos polimérico-cerámicos en diferentes proporciones y la aplicación de diferentes recubrimientos con nanopartículas podrían lograr un acercamiento a mejores resultados. Una actualización del control de estos parámetros de monitoreo durante el proceso de la degradación hidrolítica para evaluar la biocompatibilidad es el objetivo de este trabajo.

2. Degradación hidrolítica

La degradación de un polímero es el proceso a través del cual se produce un cambio en su estructura química, observándose una variación apreciable en sus propiedades [15]. Esta pérdida

de propiedades puede ocurrir por diferentes mecanismos, incluyendo hidrólisis química, microbiana, fotoquímica, térmica y degradación enzimática, que consisten en la escisión de la cadena principal o de las cadenas laterales [16].

El principal mecanismo por el cual ocurre la degradación de las matrices porosas utilizadas en implantes óseos es la degradación hidrolítica [17]. En el caso de la degradación de un polímero como el PLA, esta tiene lugar mediante la ruptura de los enlaces éster, que una vez rotos generan grupos de ácido láctico, los cuales, autocatalíticamente aceleran la reacción de degradación [17,18]. El ácido láctico es un producto intermediario en el metabolismo de los carbohidratos, que es fisiológicamente eliminado del organismo de manera natural [5–7].

La degradación del PLA sigue un perfil en dos etapas, típicas de los poliésteres alifáticos, reabsorbibles y semicristalinos. Durante la 1ra etapa ocurre la escisión del agua en las regiones amorfas, lo que da lugar a la escisión hidrolítica de los enlaces éster. Mientras que la 2da etapa comienza después de que se han degradado las zonas amorfas.

Investigaciones realizadas demuestran que la degradación del PLLA tiene lugar de forma más rápida en el centro que en la superficie del polímero, ya que los oligómeros producidos cerca de la superficie pueden escapar y los del centro no pueden difundir fuera del mismo. Este proceso se acentúa mientras mayor sea la porosidad, y conduce a un mecanismo de autocatálisis, produciendo una acidez interna superior y un gradiente de velocidad entre la superficie y el interior del andamio. La degradación depende de la porosidad, la morfología, la cristalinidad, la hidrofobicidad, el método de fabricación y el peso molecular [23].

3. Ajustabilidad de la tasa de degradación

Las tasas de degradación de matrices poliméricas pueden ser fácilmente controladas cambiando la composición, las técnicas de fabricación, los agentes aditivos y los tratamientos de las fibras. Sin embargo, un amplio rango de propiedades mecánicas pueden ser obtenidas variando la fracción de volumen de los reforzamientos [24].

Estudios de degradación *in vivo* e *in vitro* realizados en conejos muestran que la respuesta inflamatoria provocada por la acidificación del tejido huésped debido a la liberación del ácido láctico durante el proceso disminuye cuando se usan andamios de materiales compuestos de PLLA/Vidrio Bioactivo (BG, por sus siglas en inglés) debido a la compensación del pH por la liberación de iones alcalinos por parte del BG. Además, la resistencia mecánica obtenida mediante los ensayos *in vivo* e *in vitro* disminuyen un 5 % en las primeras dos semanas y llegan hasta un 35 % a las 8 semanas [17].

Otras investigaciones han mostrado que si se optimizan las propiedades mecánicas iniciales de los andamios obtenidos por fabricación aditiva y se logra ajustar mediante materiales compuestos la resistencia a la hidrólisis podrían garantizar una buena compatibilidad biomecánica de los implantes [25].

Una forma de reducir la tasa de degradación hidrolítica es mediante la radiación gamma. Otros parámetros para monitorear la tasa de degradación son las propiedades mecánicas y la variación del peso molecular, lo que puede ser evaluado mediante análisis de Microscopía Electrónica (SEM, por sus siglas en inglés) y por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC, por sus siglas en

inglés). Como resultado se pueden observar reducciones grandes tanto en las propiedades mecánicas como en el peso molecular antes de observar una pérdida de peso en la muestra [26].

Investigaciones *in vitro* de andamios de PLA sometidos a un tratamiento alcalino (AT, por sus siglas en inglés) por 6 h, que es un método simple y efectivo de introducir grupos carboxilos en los carbonos de las cadenas de PLA [27], antes de ser recubierta su superficie con Nanopartículas de Hidroxiapatita (nHA), mostraron una mejora en la hidrofiliidad en comparación con el PLA, el PLA con 1 h de AT (PLA/1hAT) y con el PLA con 1 h de AT y recubrimiento de nHA (PLA/1hAT/nHA), la cual fue evaluada mediante el Ángulo de Contacto del Agua (WCA, por sus siglas en inglés). Los menores valores de rigidez y del módulo de Young se observaron en los andamios tratados alcalinamente, independientemente de que estuvieran recubiertos o no. Las investigaciones *in vitro* sobre biocompatibilidad en estos andamios a partir del cultivo de célula de un osteosarcoma en los mismos, mostraron que el mayor número de células se obtuvo en el andamio de PLA/6hAT. La superficie que mejor función celular presentó fue la del PLA/6hAT/nHA. Sin embargo el PLA/6hAT/nHA comparado con las demás variantes resultó tener más baja tasa de proliferación celular, pero mejora la adhesión (mayor cantidad de células) [28].

Resultados experimentales de estudios de materiales compuestos de PLA/ poli(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT)/ celulosa microcristalina (MCC)/nHA, a través de SEM y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés), mostraron que el grado de cristalización, la resistencia a la tensión y la absorción de agua pueden ser modificados variando los valores de concentración de nHA en el composite (Figura 1). Al actuar esta como agente nucleante mejora la estabilidad térmica, y además, la resistencia a la tensión de los composites sin nHA fue ligeramente más alta en comparación con los de PLA puro [29].

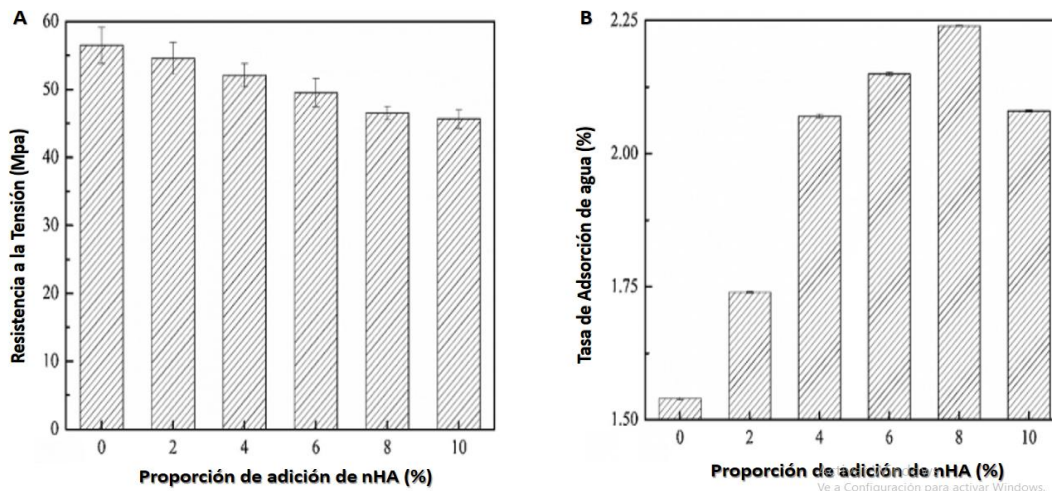


Figura 1. Resistencia a la tensión del material compuesto con diferentes proporciones de adición de nHA (A) y la relación entre la tasa de adsorción de agua y el material con diferentes proporciones de nHA (B). Tomado de Yan *et al.* [29].

La HA es uno de los fosfatos orgánicos más importantes como material biomédico ya que es el componente mineral más común del hueso humano (puede ser de origen natural o sintético).

Esta mejora la osteoconductividad y la biocompatibilidad de los implantes, varía la cinética de degradación del polímero con que ha sido mezclado o recubierta, aumenta la resistencia a la compresión y la bioactividad del polímero. Estimula la capacidad del hueso para acelerar su crecimiento, por lo que es osteoconductor [2].

4. Influencia de la degradación hidrolítica sobre el andamio

El fenómeno de degradación hidrolítica de los andamios influye sobre la regeneración ósea. Existe el criterio entre algunos autores, que este problema debe tener un enfoque de conjunto con el estado del sistema de canales entre los poros del andamio que son los que garantizan la interconexión, ya que en la degradación el acceso a esos canales puede dificultarse. El estudio del estado interno de la matriz se realizó con microtomografía [44, 45]. Se supone que, con el ajuste de la porosidad, así como del nivel de interconectividad de los poros la velocidad de regeneración celular puede ser aumentada. Investigaciones *in vivo* con andamios de HA en defectos craneales muestran que la dirección y el grado del espacio libre dentro del andamio puede influir sobre la formación de nuevo tejido [32].

Uno de los métodos descritos en la literatura más sensibles para evaluar la velocidad de degradación de las matrices porosas *in vitro*, es el análisis químico del electrolito. El incremento de la concentración de monómeros de ácido láctico, en un estudio de degradación de PLA, está relacionado con su difusión al exterior del andamio y alcanzan un valor máximo del 550 % del control en la quinta semana, en medio corporal (RPMI-1640) [32].

Otro parámetro de monitoreo de la degradación es el intercambio de iones entre el andamio y el medio biológico, que se manifiesta en la concentración de fósforo inorgánico en la segunda y quinta semana, probablemente debido a su adhesión a la matriz. La concentración de los iones de calcio se mantiene constante en las primeras semanas, sin embargo, en la quinta semana la concentración baja hasta el 67% de la cantidad de la primera semana [32]. Esto nos conduce a la deducción que en el proceso de degradación de PLA de estructura fibrilar se produce una absorción de fósforo y calcio sobre la superficie del andamio.

5. Biocompatibilidad

Estudios realizados sintetizaron andamios nanofibrilares de PLA y de PLA/HA utilizando la técnica de hilado con propulsión de gas (AJS, por sus siglas en inglés). La biocompatibilidad se evaluó utilizando como parámetros de monitoreo la respuesta de células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-BMSC) a la adhesión celular, la viabilidad celular y la interacción célula-material. Los andamios compuestos de PLA/HA mostraron mejor compatibilidad cuando se comparan con los fibrilares de PLA [33].

De todos los parámetros que influyen en la formación de la matriz extracelular se destacan como determinantes la porosidad, el tamaño de los poros, así como la vascularización. El tamaño del poro y la porosidad influyen en la interacción extracelular. El hueso cortical es una estructura mucho más densa, con porosidades superiores al 10%, que a pesar de ello no entorpece la vascularización y la infiltración celular, por el contrario, el hueso trabecular es mucho más poroso (entre un 50 y 90%)[32].

La porosidad y el tamaño de los poros ejercen influencia sobre la efectividad de la adhesión celular, que a su vez determina la densidad de las células en la matriz, su propagación y migración [34]. Estos factores a su vez influyen sobre la diferenciación osteogénica debido a la variación de la distancia de la señalización [35]. El tamaño de las dimensiones de los poros también influye sobre las propiedades mecánicas de la matriz. Una matriz suficientemente fuerte garantiza un soporte mecánico en la zona del defecto, generalmente esta fortaleza debe ser comparable con la del tejido óseo. La matriz porosa una vez implantada es capaz de influir *in vivo* sobre la osteoconducción y la vascularización [32]. Además, estos dos parámetros garantizan la interacción de las señales intracelulares y la diferenciación de los osteoblastos en células mesenquimales, así como la producción de proteína de la matriz extracelular [35–37].

Los parámetros de osteoconductividad y vascularización están directamente condicionados por los tamaños de los poros, la porosidad y la interconectividad de los poros. Para ilustrar esta afirmación fue demostrado que en matrices con igual porosidad (cerca del 50%), un tamaño de poro inferior a 40 μm determina un crecimiento mínimo en la matriz, así como el intervalo de tamaños de poro entre 100 y 350 μm es considerado óptimo. Investigaciones *in vivo* sobre defectos craneales en ratones muestran que los poros de pequeños tamaños inducen más formación de hueso que poros de 500 μm . En esta investigación también se observó la relación entre la degradación y la formación de la matriz [32, 38].

Al investigar andamios del hueso de la cadera con un tamaño de poro de 565 μm se muestra una mayor regeneración de tejido óseo que en andamios de 300 μm , sin embargo, en estos grupos la porosidad varió entre un 40 y 50 %, donde no se observó diferencias significativas en la regeneración ósea. La porosidad tiene menor influencia en la formación de tejido que el tamaño de los poros [32].

La degradación de matrices de PCL con tamaños de poros de 350 y 800 μm arrojó una diferencia insignificante entre ellas con respecto a la regeneración ósea, sin embargo, después de 4 semanas los andamios con mayores porosidades mostraron mayor crecimiento de tejido óseo, esto corrobora el significado del tamaño de los poros en la regeneración ósea, sin embargo, después de la octava semana esta diferencia no fue significativa [40].

Investigaciones realizadas en conejos sobre defectos de cráneo mostraron que para tamaños de poros de 300 μm al cabo de 4 semanas sí se induce gran cantidad de tejido óseo, en comparación con matrices de 100, 200 y 400 μm [41]. A partir de esta contradicción se puede inferir que en la generación ósea influyen directamente no solo el tamaño de los poros, si no, la forma, el propio tamaño del implante, la tasa de degradación, la vascularización y el tipo de material. Todos estos factores pueden en gran medida compensar el efecto de los tamaños de los poros.

Una rápida vascularización del tejido en el andamio es importante para la regeneración de tejido óseo ya que de lo contrario las células pierden vitalidad en ausencia de los nutrientes y el oxígeno que deben intercambiar con la sangre, este intercambio se realiza dentro de una distancia de 200 μm [42]. Investigaciones *in vitro* sobre andamios porosos mostraron que el crecimiento y la diferenciación celular dependen en gran medida tanto del tamaño de los poros como de la porosidad [32].

Una de las características fundamentales de la arquitectura de las matrices porosas, además de la porosidad y el tamaño de los poros es la interconectividad de los mismos a través de canales. Un alto grado de conectividad entre los poros aumenta la comunicación entre las células, y conlleva a una mayor regeneración ósea. El grado de interconectividad del andamio tiene una influencia limitada sobre las interacciones de las señales de las células mesenquimales y su diferenciación celular, pero sí tiene un efecto acentuado sobre la morfología del hueso que se forma dentro de la matriz [42, 43].

6. Conclusiones.

El monitoreo de la pérdida de peso puede ser importante desde el punto de vista analítico para el ajuste de la tasa de degradación, pero no es confiable para evaluar el tiempo real en que transcurre este fenómeno. Una caracterización razonable del proceso solo puede ser dada a partir de técnicas paralelas de SEM, GPC, Espectroscopía de Infrarrojos por Transformadas de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y DSC.

La lenta tasa de degradación en los andamios porosos, podría ser ajustable con tratamientos de modificación de superficies con recubrimientos de diferentes tipos de nanopartículas. Cuando estamos en presencia de tejidos duros, como los tejidos óseos, las propiedades mecánicas adquieren un papel relevante, por lo que deben ser similares al tejido a sustituir mientras dure la formación del mismo, teniendo en cuenta que estas pudieran ser afectadas seriamente en el proceso de degradación-regeneración. La porosidad y el tamaño de los poros son parámetros de las matrices porosas que tienen un papel crucial en la biocompatibilidad de los andamios. Independientemente de algunas contradicciones que se observan entre ensayos concretos, tanto la influencia del tamaño de los poros, como de la porosidad de las matrices, sobre la regeneración ósea, están validadas experimentalmente. Las propiedades bioactivas de las matrices de PLA no solamente están relacionadas con los procesos conocidos de degradación que involucran la lenta liberación de ácido láctico que está involucrado de manera natural en el metabolismo celular, si no, también con el intercambio de iones con el líquido corporal, por lo que también puede constituir una forma de evaluación de la biocompatibilidad.

Entre los parámetros fundamentales que regulan el éxito de un implante óseo utilizando andamios porosos degradables se encuentran: la porosidad y el tamaño de los poros, el tamaño y la forma del andamio, la interconectividad de los poros, el material y sus aditivos, así como los recubrimientos y tratamientos de superficies. Aunque todas estas propiedades pueden variar a lo largo del proceso de degradación, lograr optimizarlas todas como resultado del proceso de fabricación de los andamios antes de ser implantados, garantizaría un ajuste mínimo de sus propiedades y se reflejarían de forma satisfactoria en los procesos biológicos de adhesión, proliferación y diferenciación celular.

En virtud de las consideraciones anteriores, obtenidas a partir de resultados experimentales se constata que, la gran cantidad de parámetros relacionados con la arquitectura de la matriz o andamio y los biomateriales que regulan en última instancia la biocompatibilidad, provoca que en cada caso concreto puedan ocurrir efectos compensatorios que enmascaren la tendencia global en el comportamiento y las dependencias entre ellos, por lo que el ensayo de degradación del andamio personalizado es crucial para garantizar el debido rigor en los resultados.

Referencias.

- [1] E. E. Serrano, "Caracterización de injertos óseos de uso odontológico: Scoping review," Universidad Santo Tomás, 2020.
- [2] I. Sandonis, "Andamios porosos," Universidad del País Vasco, 2015.
- [3] X. Fan, L. Guo, and T. Liu, "Preparation and Mechanical Properties of PLGA / β -TCP Composites," *Polym. Plast. Technol. Eng.*, vol. 52, no. 6, pp. 621–625, 2014, doi: 10.1080/03602559.2012.762661.
- [4] G. Turnbull *et al.*, "Bioactive Materials 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering de," *Bioact. Mater.*, pp. 1–37, 2017, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
- [5] M. A. Sabino, M. Loaiza, and R. Rezende, "Artículo Invitado EN INGENIERÍA DE TEJIDOS TECHNIQUES FOR MANUFACTURING POLYMER SCAFFOLDS WITH POTENTIAL APPLICATIONS IN TISSUE ENGINEERING Artículo Invitado," vol. 37, no. 2, pp. 120–146, 2017.
- [6] X. Liu and P. X. Ma, "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 32, no. 3, pp. 477–486, 2004.
- [7] S. Liu and Y. Zheng, "Preparation and characterization of a novel polylactic acid / hydroxyapatite composite scaffold with biomimetic micro-nano fibrous porous structure," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 31, pp. 74–85, 2020, doi: 10.1007/s10856-020-06415-4.
- [8] M. E. Navarro, "Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea," Universitat Politècnica de Catalunya, 2005.
- [9] F. Zuluaga, "ALGUNAS APLICACIONES DEL ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO," pp. 125–142.
- [10] L. Lim, R. Auras, and M. Rubino, "Progress in Polymer Science Processing technologies for poly (lactic acid)," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, pp. 820–852, 2008, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004.
- [11] W. M. Chávez, "Estudio de las propiedades termomecánicas del nanocompósito PLA/C30B con distintos pesos moleculares después de ser sometidos a condiciones de intemperismo acelerado," Centro de Investigación en Materiales Avanzados, 2016.
- [12] K. Fukushima, M. Murariu, G. Camino, and P. Dubois, "Effect of expanded graphite / layered-silicate clay on thermal , mechanical and fire retardant properties of poly (lactic acid)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, no. 6, pp. 1063–1076, 2010, doi: 10.1016/j.polyimdegradstab.2010.02.029.
- [13] J.-M. Raquez, Y. Habibi, M. Murariu, and P. Dubois, "Polylactide (PLA)-based nanocomposites," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, no. 10–11, pp. 1504–1542, 2013, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.014.
- [14] N. El Miri *et al.*, "Bio-nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals: rheology of film-forming solutions, transparency, water vapor barrier and tensile properties of films," *Carbohydr. Polym.*, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.051.
- [15] A. Labeaga, "Polímeros biodegradables . Importancia y potenciales aplicaciones," Universidad Nacional de Educación a Distancia, 2018.
- [16] D. da Silva *et al.*, "Biocompatibility , biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems," *Chem. Eng. J.*, no. January, 2018, doi: 10.1016/j.cej.2018.01.010.
- [17] A. Zargar, K. Mohammad, H. Fathi, M. Manshaei, and S. M. Razavi, "In-vivo evaluation of a

- partially resorbable poly l-lactic acid / braided bioactive glass fibers reinforced composite for load bearing fracture fixation,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2020, doi: 10.1007/s10856-020-06394-6.
- [18] C. Delabarde, C. J. G. Plummer, P. Bourban, and J. E. Manson, “Accelerated ageing and degradation in poly- L -lactide / hydroxyapatite nanocomposites,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 96, no. 4, pp. 595–607, 2011, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.018.
- [19] H. Tsuji, K. Shimizu, and Y. Sato, “Hydrolytic degradation of poly(L-lactic acid): combined effects of UV treatment and crystallization,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 116, no. 5, pp. 2658–2667, 2010, doi: 10.1002/app.
- [20] L. Mattii *et al.*, “Gelatin/PLLA sponge-like scaffolds allow proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells,” *Macromol. Biosci.*, vol. 8, no. 9, pp. 819–826, 2008, doi: 10.1002/mabi.200700331.
- [21] L. Lu *et al.*, “In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 18, pp. 1837–1845, 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00047-8.
- [22] G. Khang, C. S. Park, and J. M. Rhee, “Preparation and characterization of demineralized bone particle impregnated poly(L-lactide) scaffolds,” *Korea Polym. J.*, vol. 9, no. 5, pp. 267–276, 2001.
- [23] K. A. George, T. V Chirila, and E. Wentrup-Byrne, “Effects of crosslink density on hydrolytic degradation of poly(l-lactide)-based networks,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 97, no. 6, pp. 964–971, 2012, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.03.017.
- [24] H. Mehboob and S. H. Chang, *Application of composites to orthopedic prostheses for effective bone healing: A review*, vol. 118, no. 1. Elsevier Ltd, 2014.
- [25] Z. Wang, Y. Wang, Y. Ito, P. Zhang, and X. Chen, “A comparative study on the in vivo degradation of poly(L-lactide) based composite implants for bone fracture fixation,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1038/srep20770.
- [26] M. A. Elsayy, K. H. Kim, J. W. Park, and A. Deep, “Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 79, no. June 2016, pp. 1346–1352, 2017, doi: 10.1016/j.rser.2017.05.143.
- [27] J. S. Wiggins, M. K. Hassan, K. A. Mauritz, and R. F. Storey, “Hydrolytic degradation of poly (D , L -lactide) as a function of end group : Carboxylic acid vs . hydroxyl,” *Polymer (Guildf)*., vol. 47, pp. 1960–1969, 2006, doi: 10.1016/j.polymer.2006.01.021.
- [28] W. Chen *et al.*, “Alkali treatment facilitates functional nano-hydroxyapatite coating of 3D printed polylactic acid scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 120, p. 111686, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111686.
- [29] D. Yan *et al.*, “Study on the properties of PLA/PBAT composite modified by nanohydroxyapatite,” *J. Mater. Res. Technol.*, vol. 9, no. 5, pp. 11895–11904, 2020, doi: 10.1016/j.jmrt.2020.08.062.
- [30] A. C. Jones, C. H. Arns, A. P. Sheppard, D. W. Hutmacher, B. K. Milthorpe, and M. A. Knackstedt, “Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT,” *Biomaterials*, vol. 28, pp. 2491–2504, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.046.
- [31] A. C. Jones, C. H. Arns, D. W. Hutmacher, B. K. Milthorpe, A. P. Sheppard, and M. A. Knackstedt, “Biomaterials The correlation of pore morphology , interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth,” *Biomaterials*, vol. 30, no.

- 7, pp. 1440–1451, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.056.
- [32] M. A. Sadovoy, P. M. Larionov, A. G. Samokhin, and O. M. Rozhnova, “Cellular matrices (scaffolds) for bone regeneration: state of the art,” *Hir. Pozvonoc*, vol. 2014, no. 2, pp. 79–86, 2014.
- [33] A. A. Altamirano *et al.*, “Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA / Hidroxiapatita Biocompatibility of Nanofibrous Scaffolds with Different Concentrations of PLA / Hydroxyapatite,” vol. 3, no. 18, pp. 39–50, 2016.
- [34] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O. Brien, “Biomaterials The effect of mean pore size on cell attachment , proliferation and migration in collagen – glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 461–466, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
- [35] K. Kim, D. Dean, A. G. Mikos, and J. P. Fisher, “Effect of Initial Cell Seeding Density on Early Osteogenic Signal Expression of Rat Bone Marrow Stromal Cells Cultured on Cross-Linked Poly (propylene fumarate) Disks,” *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 1810–1817, 2009.
- [36] E. M. Byrne *et al.*, “Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen – glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation,” *J. Mater. Sci Mater. Med.*, vol. 19, pp. 3455–3463, 2008, doi: 10.1007/s10856-008-3506-2.
- [37] D. A. Harrington *et al.*, “Branched peptide-amphiphiles as self-assembling coatings for tissue engineering scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 6, pp. 158–167, 2006, doi: 10.1002/jbm.a.
- [38] S. Sundelacruz and D. L. Kaplan, “Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, pp. 646–655, 2009, doi: 10.1016/j.semcdb.2009.03.017.
- [39] C. E. P. Aronin *et al.*, “Comparative effects of scaffold pore size , pore volume , and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds,” 2008, doi: 10.1002/jbm.a.32015.
- [40] S. M. M. Roosa, J. M. Kemppainen, E. N. Moffitt, P. H. Krebsbach, and S. J. Hollister, “The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 5, pp. 360–368, 2009, doi: 10.1002/jbm.a.32381.
- [41] S. Heang, I. Kyu, J. Man, and J. Ho, “In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method,” vol. 28, pp. 1664–1671, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.024.
- [42] E. Volkmer *et al.*, “Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, no. 8, pp. 1331–1340, 2008, doi: 10.1089/ten.tea.2007.0231.
- [43] L. Shor, S. Guçeri, X. Wen, M. Gandhi, and W. Sun, “Fabrication of three-dimensional polycaprolactone / hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro,” *Biomaterials*, vol. 28, pp. 5291–5297, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.018.
- [44] L. Uebersax *et al.*, “Effect of Scaffold Design on Bone Morphology In Vitro,” *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 12, pp. 3417–3429, 2006.