

# 3D zelula-euskarri biodegradagarriak: diseinuaren garrantzia etorkizuneko biomedikuntza-aplikazioetan

*Aitor Larrañaga, Jone M. Ugartemendia, Jose-Ramon Sarasua*

Meatze-Metalurgia eta Materialen Zientzia Saila.  
Bilboko Ingenieritza Goi Eskola Teknikoa (UPV/EHU)

**Laburpena:** Azken urte hauetan, polimero biodegradagarriez eginiko 3D zelula-euskarrien diseinuak garrantzi handia hartu du ehun-ingeniariaren arloaren barnean. Lan honen helburu nagusia da gai honi buruzko ikuspegi orokor bat ematea. Alde batetik, euskarriaren diseinuan polimero biodegradagarriaren hautapenak, mikroegiturak eta euskarriaren morfologiak duten garrantzia azaltzen da. Bestetik, atal honetan euskarriak lortzeko metodo ezberdinak ere deskribatzen dira. Bukatzeko, zelulen eta polimero-euskarriaren arteko elkarrekintzen ikerketak etorkizuneko medikuntza-aplikazioetarako duen garrantzia gorai-patzen da.

**Abstract:** In this work the use of biodegradable polymers for the fabrication of 3D scaffolds is presented. In the field of tissue engineering, these scaffolds serve as a template for cells to attach, proliferate and differentiate and thus, the design parameters are crucial for their success. On the one hand, the choice of the most adequate material and the analysis of its microstructure is presented, as well as the importance of the morphology of the scaffold. In this sense, different techniques for the obtention of suitable morphologies are described, highlighting the advantages and drawbacks of each technique. On the other hand, the interactions between cells and scaffolds are briefly introduced. These interactions play a pivotal role in the final use of the cell-scaffold constructs for medical applications.

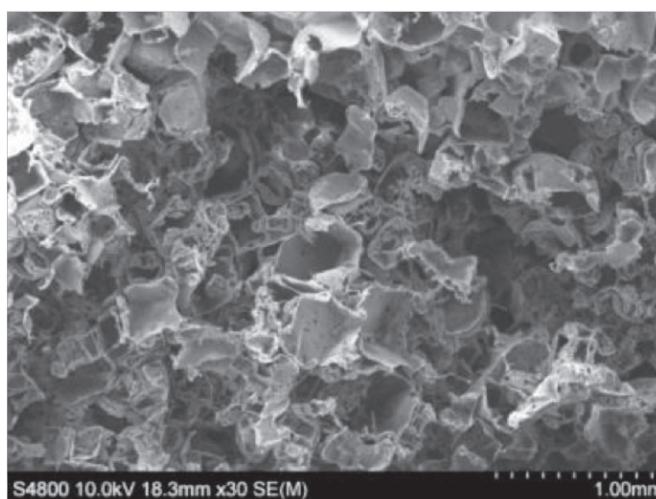
## SARRERA

Ehun-ingeniarietzak, ingeniariaren eta zientziaren printzipioak aplikatuz ehunen funtzioak berritu, mantendu eta hobetzen dituzten ordezkari biologikoak garatzen ditu [1]. Arlo honen barruan, 3-dimentsioko zelula-euskarrien diseinua, *scaffold* izenez ere ezaguna, funtsezko jarduera bilakatu da. Kalteuriko ehunen birsorpenean parte hartzen duten zelulen funtzionamendu

egokia bermatzea da hauen helburu nagusia. Izan ere, lortu behar da euskarri hauen gainazalean aipaturiko zelulak modu egokian itsatsi, ugaritu eta diferentziaztea.

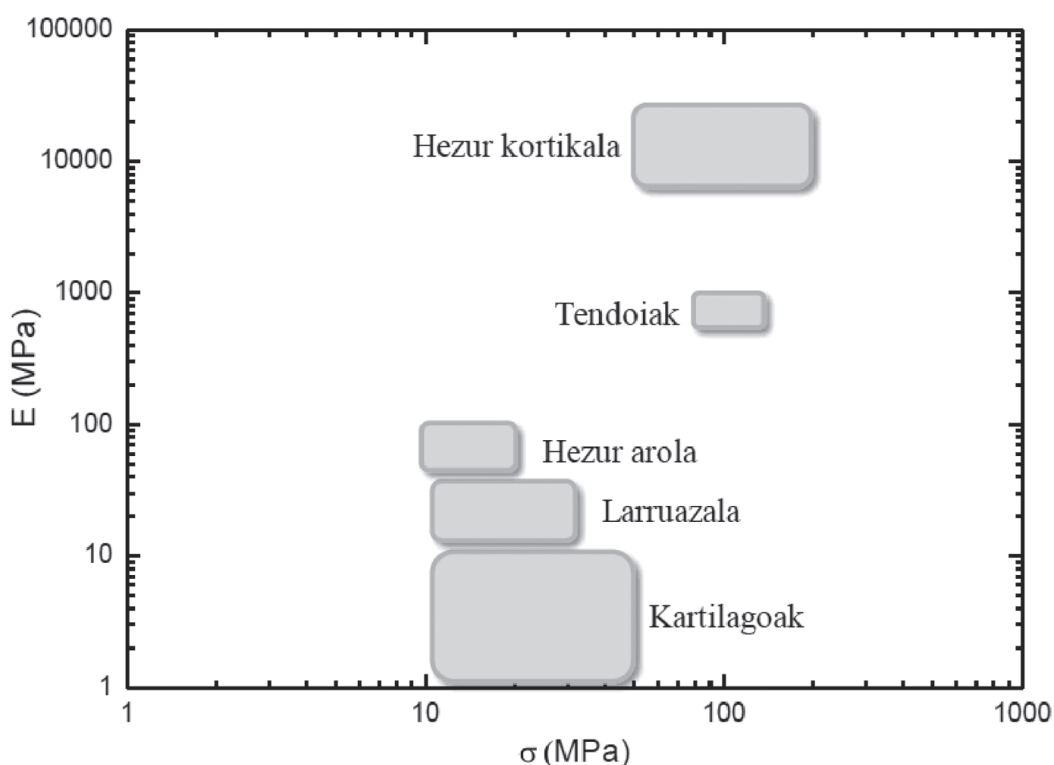
Erronka honi aurre egiteko, ezinbestekoa da euskarri hauen diseinu egokia lortzea. Izan ere, materialaren hautapenetik hasi eta euskarriaren azken itxurarrainoko bidean hartu beharreko erabakiek izugarrizko garrantzia dute zelulen funtzionamendu egokiaren sustapenean, baita giza organismoan izango duten efektuan ere. Beraz, zelula-euskarriak erabilgarriak izan daitezten, zenbait baldintza bete behar dituzte.

Inplanteen antzera, euskarriek giza gorputzaren barruan ezarrita egon behar dutenez, gorputz ehunen eta oinarritzko materialaren arteko elkarrekintzak bateragarriak izan behar dira. Beraz, euskarriek, gorputzean behin sartuta, giza organismoan kalterik sor ez dezaten, material biobateragarriak eginak egon behar dute. Bestalde, material biodegradagarriak izatea ere komeni da [2]. Modu honetan, behin bere funtzioa bete eta ehun berria guztiz berritzen denean, bigarren ebakuntza baten beharrik gabe, gorputzetik prozesu metabolikoen bitartez giza gorputzarentzat kaltegarriak ez diren produktu bilakatu eta ondoren modu natural batean desagertzen dira. Honetaz gain, euskarriek 3-dimentsioko egitura porotsua izan behar dute, alde batetik poroen hutsuneen artetik elikagaien difusioa errazteko, eta bestetik, zelulen ekintzetatik eratorritako hondakinak modu erraz batean kanporatzeko. Honen adibide gisa, 1. irudian aurkezten da poli (L-laktida) (PLLA) oinarri duen euskarri porotsua. Azkenik, euskarriek propietate mekaniko egokiak aurkeztea ere garrantzitsua da, bai beraien erabilera errazteko, baita inplanteak eroan behar dituen kargak jasateko ere.



**1. irudia.** PLLA oinarri duen zelula-euskarri porotsuaren SEM irudia.

Zelula-euskarrien fabrikaziorako material-hautapenari dagokionez, polimero biodegradagarriek indar handia hartu dute beraien ezaugarriak direla-eta. Alde batetik, polimero naturalak erabil daitezke. Hauen adibide dira kolagenoa, zeta, kitosanoa edota alginatoa, besteak beste. Beste alde batetik, polimero naturalekin alderatuz aurkezten dituzten abantailak direla-eta, polimero sintetikoek izugarrizko garrantzia hartu dute azken urteotan. Hain zuzen ere, polimero sintetikoen propietateak, hots, propietate mekanikoak edota degradazio-abiadura, modu errazean doi daitezke eta beraz, aukera zabalagoa dago aplikazio jakin baterako baldintzak beteko dituen material egokia diseinatzeko. Biobateragarriak eta biodegradagarriak diren polimero material sintetikoen artean, etorkizun oparoko hautagaiak dira poli(laktida) (PLA), polikaprolaktona (PCL), poliglikolida (PGA) eta beraien arteko nahasteak eta kopolimeroak. Material hauen erabilpena, aplikazio jakin baterako bete beharreko eskakizunen edo baldintzen arabera izango da. Izan ere, ez dira berdinak hezur baten birsorkuntzak behar dituen baldintzak edo kartilago batek behar dituenak (ikus 2. irudia). Adibidez, hezur bat birsorkuntzako behar den materialak zurruna izan behar du (Young modulua 50-100 MPa tartean) [3], eta aldiz, kartilagoen kasuan, materialak malgua izan behar du (Young modulua 1-10 MPa tartean), deformatzeko eta hasierako itxura berreskuratzeko gaitasun handia erakutsiz [4].



**2. irudia.** Giza gorputzeko ehun ezberdinen propietate mekanikoak. E (Young modulua) eta  $\sigma$  (isurpen erresistentzia) [5].

Beste alde batetik, polimero arloan jakina da mikroegiturak izugarritzko eragina duela aipaturiko propietateetan. Adibidez, sarritan, transformazio prozesuetan jasandako tratamendu termikoa dela-eta, polimeroek mikroegitura-aldaketa bat jasan dezakete, eta ondorioz, bere propietateak ere aldatu egiten dira. Bestetan, mikroegituraren aldaketa eragiteko nahikoa da tenperatura finko batean biltegitratua edukitzea. Ondorioz, material bat hautagai izatetik ez izatera alda daiteke, edo alderantziz. Hau dela-eta, behin materiala hautatu ondoren, ezinbestekoa da material horrek zerbitzuko baldintzapean aurkeztuko duen mikroegituraren informazioa eta jasan dezakeen aldaketa posibleen azterketa.

### **3-D ZELULA-EUSKARRIEN DISEINUA**

Sarreran esan bezala, aplikazio jakin baterako zelula-euskarrien diseinuan, bi faktore nagusik hartzen dute parte. Alde batetik, oinarri bezala hautatzen den polimeroa eta haren mikroegitura erabakigarriak dira euskarriaren amaierako propietateetan. Hauen arabera izango da euskarriak aurkeztuko dituen propietate mekanikoak eta degradazio-abiadura, besteak beste. Beste alde batetik, euskarriaren morfologia ere garrantzitsua da. Egitura porotsuek bermatzen dute zelulentzat beharrezkoak diren elikagaiak euskarri guztitik zehar zabaltzea eta beharrezkoak diren elikagaiak jasotzea. Jarraian, bi faktore nagusi hauen azterketa sakonagoa aurkeztuko da.

#### **1. Polimeroaren mikroegituraren eta karakterizazioaren garrantzia 3-D euskarrietan**

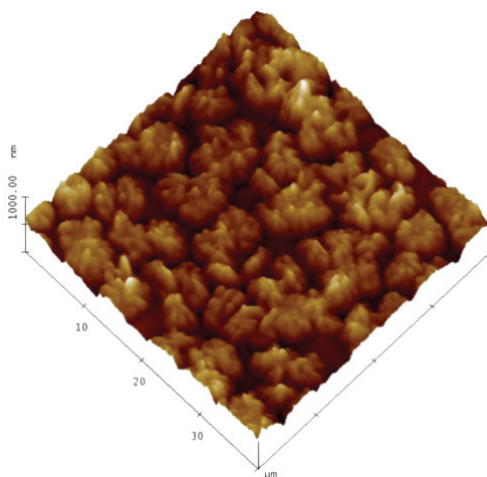
Produktua hobetu eta bere aplikazio-tartea zabaltzeko, euskarri berri hauen diseinuz arduratzen den ikertzaileak, hautatutako lehengaiaren mikroegituraren eta propietate fisiko-kimiko, nahiz propietate mekanikoen arteko harremanari buruzko informazio zehatza eduki behar du.

Izan ere, sarreran esan bezala, polimero hauen erabilpena, aurkeztu dituzten propietate hauen arabera izango da. Adibidez, polilaktidez egindako euskarri porotsuen kasuan, frogatu da izaera amorfoa duen poli(D,L-laktida) (PDLLA), izaera erdikristalinoa edo kristaltzeko joera duen poli(L-laktida) (PLLA) baino bi bider azkarrago degradatzen dela [6]. Era berean, mikroegiturak propietate mekanikoetan duen eragina aztertzen duten lanak ere egin dira. Honen adibide bat da ehun-ingeniaritzan etorkizun handia eduki dezakeen poli(L-laktida-ko- $\epsilon$ -kaprolaktona) (PLCL) kopolimeroa. Hain zuzen ere, 70/30 konposizio zehatzeko ausazko kopolimeroaren propietate mekanikoez izugarritzko aldaketa jasaten dute mikroegituraren baitan. Materiala malgua izatetik zurruna izatera alda daiteke, egoera guztiz amorfo batetik hasi eta kristaltze maila handitzen doan heinean [7]. Are gehiago, konposizio bera, baina kopolimero kateen mikroegitura ezberdinek propie-

tate mekanikoetan daukaten efektua ere plazaratu da [8]. Beraz, mikroegiturak propietateetan izan dezakeen efektua ikusirik, ezinbestekoa da euskarria sortu aurretik erabiliko den materialen mikroegitura sakonki aztertzea.

Maila altuko mikroegituren karakterizazioa egiteko, sarritan behaketa metodo tradizionalak hainbat muga aurkezten dituzte alboko bereizmen urriagatik edota laginak prestatu eta behatzeko erabili behar diren baldintzak direla-eta; hala da adibidez mikroskopio optiko eta elektronikoen kasuan. Hau dela-eta, azken urte hauetan, Indar Atomikoko Mikroskopiak (IAM), AFM-z (*Atomic Force Microscopy*) ere ezagunak, izugarriko harrera ona eduki du ikerketa-munduan. Beste behaketa-metodoek ez bezala, bereizmen handiko teknika honek, ahalbidetzen du laginen gainazalaren 3D irudiak nano nahiz mikro eskalean lortzea. Gainera, itsaskortasuna edo biskoelastikotasuna bezalako materialen propietateekiko oso sentikorra denez, lor daiteke gainazalean gertatzen diren fase ezberdinak desberdintzea, baita haien propietate mekanikoak aztertzea ere. Honi esker, mikroegituraren informazio zehatzagoa jaso daiteke eta beraz, euskarria osatzen duen materialaren karakterizazioa egiteko tresna oso baliagarria da IAM hau.

Behin materiala hautatu eta karakterizatu ondoren, euskarriaren morfologiaren azterketari ekin behar zaio, hurrengo atalean azaltzen den bezala.



**3. irudia.** AFM-z lortutako PLLA laginaren mikroegituraren 3D irudia.

## 2. Zelula euskarriaren morfologiaren garrantzia

Orain arte, errazagoa izateagatik, zelula-azterketa gehienak 2D euskarrien gainean egin izan ohi dira [9]. Hauek, zelulen prozesu biologikoak ulertzeko oso erabilgarriak izan dira, baina ehun-ingeniaritzarako erabil-

garriak izan daitezkeen euskarrien ikerkuntzan aurrerapauso bat eman ahal izateko, ezinbestekoa da 3D egituren gainean zelula-azterketan aurrera egitea. Izan ere, gure gorputzean ehunek sortzen dituzten ia zelula gehienak zelulaz kanpoko hiru dimentsioko matrizean aurki daitezke. Hala, 3D egitura porotsuek, askoz hobeto simulatzen dituzte zelulek gorputzean aurkezten dituzten baldintzak. Gainera, 2D euskarriekin alderatuz, zelulak egitura osoan zehar poroen hutsuneetatik barrena zabaldu eta bolumen guztian zehar heda daitezke; beraz, ez dira aurreko kasuan bezala euskarriaren azalerara bakarrik mugatzen. Aipaturiko egitura porotsuak lortzeko zenbait teknika ezberdin aurki daitezke bibliografian. Jarraian erabilienak diren 6 teknikak aurkeztuko dira.

Disoluzio-lurruntze/partikulen iragazketa metodoa (*Solvent casting/Particulate leaching*): Teknika hau erabiliz, lehenik polimeroa disolbatzaile organiko batean disolbatzen da eta jarraian hautatutako disolbatzailean disolbaezinak diren partikulak gehitzen zaizkio polimero-disoluzioari. Partikula bezala gatza (NaCl) edo azukrea erabili ohi dira. Ondoren, lortzen den nahastea molde batean isurtzen da eta disolbatzailea lurrundu eta gero lortzen den materiala uretan sartzen da. Izan ere, gehitutako gatz edo azukre-partikulak kloroformoa bezalako disolbatzaile organikoetan disolbaezinak dira, baina polimeroak ez bezala, disolbagarriak dira urarekiko kontaktuan. Honela, partikulek betetako lekuak hutsik gelditzen dira, eta egitura porotsu bat lortzen da. Teknika honek erraztasunak eskaintzen ditu euskarria lortzeko eta porositatea eta poroen itxura kontrolatzeko uanean. Soilik polimero eta partikula kantitateen arteko erlazioa eta partikulen itxura aldatuz poro kopurua eta neurriak erraz doi daitezke eta beraz, euskarriaren morfologia era errazean kontrola daiteke. Hala ere, kontuan hartu beharra dago kloroformoa bezalako disolbagarri organikoak kaltegarriak izan daitezkeela zelulen biziraupenerako. Bestalde, oso barnean dauden partikulak disolbatzeko dagoen zailtasuna dela-eta, desabantaila gisa aipatu beharra dago, lortzen diren zelula-euskarrien lodiera mugatua dagoela (< 3mm).

Gas-aireztatzea (*Gas foaming*): Teknika honetan, polimeroz eginiko disko bat CO<sub>2</sub>-rekiko kontaktuan jartzen da presio handietan. Behin polimeroa CO<sub>2</sub>-z asetzen denean, sistema behartzen da orekaz kanpoko eze-gonkortasun termodinamiko baterantz eta gas honen burbuilak eragiten dira. Hauek, egituren zehar barreiatzen dira eta euskarri porotsu bat sortzen da. Beraz, teknika honen bidez disolbatzaile organikoen erabilera saihesten da. Aldiz, poroen artean lortzen den konektibitatea eskasa da, soilik lortzen baita poroen % 10-30 tartekoa ondo konektaturik egotea. Baliteke honek izugarri mugatzea zelulen hedapena egitura osoan zehar.

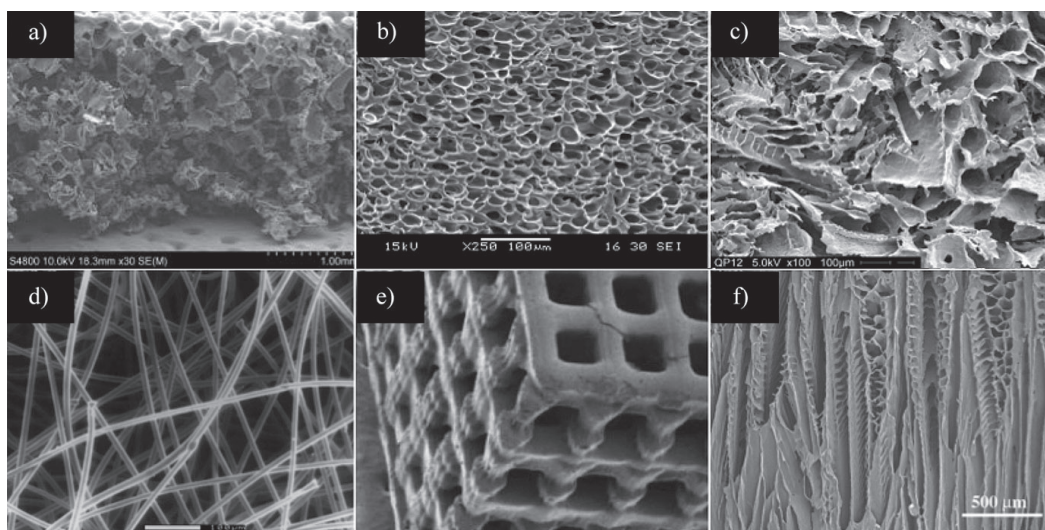
Emulsioren liofilizazioa (*Emulsion freeze drying*): Teknika honetan, disolbatzaile organiko bat erabiliz, polimero disoluzio baten eta uraren arteko emulsiio homogeneo bat prestatzen da. Ondoren, liofilizazio prozesu baten

bitartez, disolbatzailea eta ura desagerrarazten dira. Teknika honen desabantaila nagusi gisa aipa daiteke elkar konektatu gabeko poroak lortzen direla; beraz, zelulentzat hain beharrezkoak diren elikagaien banaketa eta hedapena kaskarragoa izan daiteke.

**Elektrohariketa (*Electrospinning*):** Teknika honetan, eremu elektriko bat aplikatuz polimero zuntzen eraketa substratu baten gainean kontrolatzen da. Hain zuzen ere, injektatutako polimero disoluzio bati edota polimero urtu bati potentzial elektriko bat aplikatzen zaio. Potentzial kritiko baten gainetik, aurretik materialaren barne egituran sortutako karga-desorekak, polimero disoluzioaren gainazal-tentsioa gainditzen du eta elektrikoki kargatuta dagoen zorrotada sortzen da. Zorrotada hau, lurrari konektatuta dagoen euskarri batera zuzentzen da eta disolbatzailea lurruntzen den heinean, euskarri edo substratuaren gainean zuntz polimerikoak sortzen dira. Era honetara, mikro eta nano tamaina dituzten zuntzez eraturiko zelula-euskarriak fabrika daitezke. Teknika honen bidez lorturiko zelula-euskarriak oso konektibitate ona erakusten dute poroen artean. Aldiz, lehenengo kasuan bezala, disolbagarri organikoen erabilerak zenbait aplikaziotarako aukerak mugatzen ditu.

**Prototipo diseinuen 3D inprimaketa azkarra (*Rapid-prototyping*):** Teknika honek ordenagailuaren bidezko diseinuan (CAD) dauka oinarria. 3D inprimagailu baten laguntzaz, ordenagailuan diseinatutako zelula euskarriak hautatutako polimeroarekin geruzaz geruza fabrika daitezke. Teknikak hainbat abantaila ditu, besteak beste abiadura azkarra duelako itxura konplexuak dituzten piezak egiteko. Hala ere, zelula-euskarrien itxura inprimatzeko erabiltzen den pitaren menpe egongo da. Normalean, teknika honen bidez ezin da mikroegitura finik lortu eta horregatik euskarriaren porositatea nahiko txikia izan ohi da.

**Termikoki eragindako fase banaketa (*Thermally induced phase separation*):** Zelula-euskarriak egiteko lehen aldiz erabilitako teknika izan zen. Azken urteetan, teknika hau egokitu egin da zelula-euskarri porotsuak fabrikatzeko asmoz. Lehenengo eta behin, tenperatura handietan polimeroa disolbatzaile batean disolbatzen da eta jarraian tenperatura bortizki jaisten da. Tenperatura-beherakada honekin, likido/likido edota likido/solido fase banaketa eragiten da disoluzioan. Azkenik, sublimazio prozesuaren bitartez, disolbatzailean aberatsa den fasea desagerrarazten da. Kasu honetan, euskarriaren poroen morfologia eta porositatea, oinarritzat harturiko polimeroaren, disolbatzailearen, aurreko bien kontzentrazioaren eta fase-banaketa gertatzen den tenperaturaren arabera izango da. Teknika honen bitartez lortzen diren euskarriek propietate mekaniko onak erakusten dituzte. Hala ere, lortzen diren poroak txikiak dira (10-100  $\mu\text{m}$  inguru) eta ez dira egokiak hezur-ehunaren birsorkuntzarako esate baterako.



**4. irudia.** Hainbat teknika ezberdinen bidez lorturiko zelula-euskarri porotsuak: a) Disoluzio-lurruntze /partikulen iragazketa metodoa; b) Gas-aireztatzea; c) Emulsioren liofilizazioa; d) Elektrohariketa; e) Prototipo-diseinuen 3D inprimaketa azkarra; f) Termikoki eragindako fase-banaketa.

## ZELULAREN ETA POLIMEROAREN MATRIZEAREN ARTEKO ELKARREKINTZEN AZTERKETA

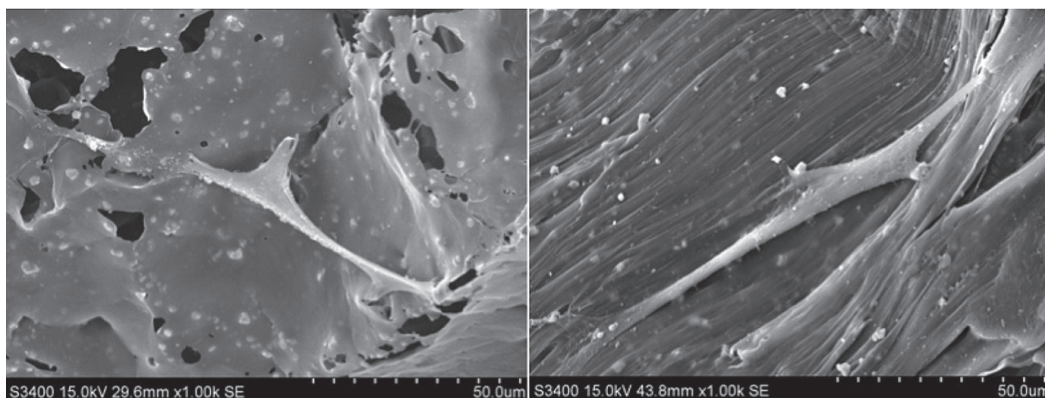
Orain arte aurkeztutako ataletan zelula-euskarri porotsuak egiteko erabiltzen diren material eta teknikak aurkeztu dira. Diseinatutako sistema hauek etorkizunean erabilgarriak izan daitezzen, erabakigarria da bertan erantsiko diren zelulek betetzen duten funtzioa. Izan ere, zelularen eta polimeroaren matrizearen arteko elkarrekintzen sustapenean dago zelula euskarrien arrakastaren gakoa. Horretarako, aurreko ataletan aipaturiko alderdi morfologiko eta propietate mekanikoez gain, ezinbestekoa da zelulak erantsiko diren ingurumenaren egokitzapen on bat bermatzea.

Zelulek seinale biokimiko egokiak jaso ditzaten, gorputzaren baldintzak antzeratuko dituen zelula-euskarria lortzea da helburu nagusia. Kontzeptu honi biomimetismoa deritzo. Hau da, zelulek euskarrian aurkituko duten ingurumena giza ehunetan aurkituko dutenaren geroz eta antzekoagoa bada, beraien funtzioaren garapena egokiagoa izango da. Era erraz batean esanda, gizakiak bere etxe propioan askoz erosoago sentitzen diren modu berean, zelulek ere nahiago izaten dute ezaguna den ingurumen batean bizitzea eta beraz, beraiantzat ezezaguna den euskarria ezaguna bilakatu behar da.

Hainbat bide daude helburu hau lortzeko. Aukeretako bat da hazkunde faktoreak erantsiz (proteinak etab.) euskarriaren gainazala modifikatzea [10]. Beste aukeretako bat da giza ehunetan aurki daitezkeen partikula

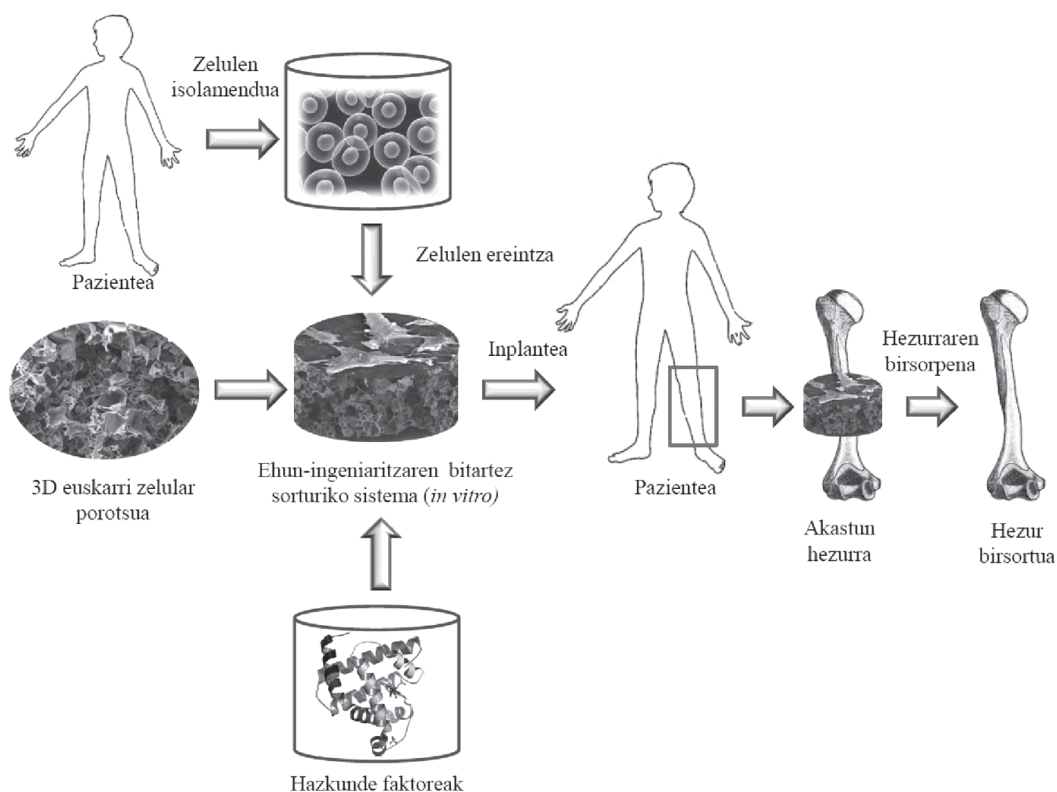


ezorganiko bioaktiboak eranstea. Adibidez, hezurraren birsorpenean erabili ohi diren zelulak osteoblastoak dira. Aipaturiko zelula mota hauek zelula helduak dira, eta ondorioz, ez dute diferentziatzeko gaitasunik. Hala, soilik berdinak diren zelulak sor ditzakete mitosiaren bitartez eta gainera, beraien birsorkuntza-abiadura askoz ere geldoagoa izan ohi da. Oztopo hauei aurre egiteko, zelula mota ezberdinetarantz diferentziatzeko gaitasuna duten ama zelulak erabil daitezke. Diferentziazio prozesu hau modu egokian gerta dadin, behin ama zelulak euskarrian erantsita, seinale biokimiko egokiak jaso behar dituzte. Hau euskarriari hezurren osagai mineral nagusia den hidroxiapatita bezalako konposatuak gehituz lortzen da. Zelulak hidroxiapatitarekiko kontaktuan jartzerakoan osteoblastoetara jotzeko seinaleak jasotzen dituzte eta, era honetara, zelula amen diferentziazioa osteoblastoetara zuzentzen da [11]. 5. irudian ikus daiteke gantz-ehunetik lortu diren ama zelulak hidroxiapatita duten zelula-euskarri polimerikoetan itsatsita. Hidroxiapatita-partikulak polimeroaren matrizean ondo banatuta eta ama zelulak materialean guztiz integratuta agertzen dira.



**5. irudia.** Gantz-ehunetik lorturiko ama zelulak hidroxiapatita duten polimeroaren zelula-euskarrietan itsatsita.

Laburpen gisa, 6. irudian aurkezten da kaltetutako hezur bat birsortzeko egin beharreko prozesuaren adibidea. Ikus daitekeenez, zelulak pazientearen gorputzetik isolatu ondoren, zelula-euskarri porotsu baten gainean finkatzen dira *in vitro*. Sistema honi, hazkunde faktoreak gehitzen zaizkio, zelulak bizitzeko eta diferentziatzeko behar dituzten elikagaiak jaso ditzaten. Zelulak euskarrian guztiz itsatsita daudenean, hau osatu beharreko hezurrean ipintzen da. Modu honetan, metabolismo prozesuen bitartez polimeroaren euskarria degradatzen den heinean, euskarriak bere funtzioa bete eta helburu den hezurraren birsorpena sustatzen du. Bukaeran, kaltetutako hezurraren orde, guztiz osatutako hezurra aurkituko litzateke eta aldiz, ez legoke euskarri polimerikoaren arrastorik, eta honela, bigarren ebakuntza bat ekidingo litzateke.



**6. irudia.** Hezur akastun bat birsortzeko prozesuaren adibidea [12].

Ikus daitekeenez, 3D zelula-euskarri biodegradagarrien erabilpenaren bidea nahiko konplexua da. Euskarriek arrakasta izan dezaten, ezinbestekoa da jakintza arlo ezberdinetako ikertzaileen arteko elkarrekintza. Etorkizunari begira, 3D euskarri polimeriko biodegradagarrien diseinu egokiaren bilaketa eta hauen eta ama zelulen arteko elkarrekintza ikerkuntzaren garapena eta bermea izango dira ehun-ingeniaritzan iraultza ekarriko dituzten ildoak, eta era berean, medikuntza arloko erronkei aurre egitea ahalbidetuko duten ezinbesteko tresnak.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] LANGER R. eta VACANTI J.P. 1993. «Tissue engineering». *Science* **260**, 920-926.
- [2] OLABERRIETA I. eta SARASUA J.R. 2003. «Polimero biodegarrak eta jangarriak jaki-ontzi eta bildukietarako». *Ekaia* **17**, 45-60.
- [3] MARRA K.G.; SZEM J.W.; KUMPTA P.N.; DIMILLA P.A. eta WEISS L.E. 1999. «In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite

- composites for bone tissue engineering». *Journal of Biomedical Materials Research* **47**, 324-335.
- [4] LEE J.; GUARINO V.; GLORIA A.; AMBROSIO L.; TAE G.; KIM Y.H.; JUNG Y. eta KIM S.H. 2010. «Regeneration of Achilles' Tendon: The Role of Dynamic Stimulation for Enhanced Cell Proliferation and Mechanical Properties». *Journal of Biomaterials Science* **21**, 1173-1190.
- [5] LANZA R., LANGER R., VACANTI J.. 2007, *Principles of tissue engineering*. Elsevier, USA.
- [6] LARRAÑAGA A. eta SARASUA J.R. 2011.«In vitro degradation of lactide based polymers and copolymers». *ANTEC 2011-Proceedings of the 69th Annual Technical Conferences & Exhibition*.1989-1993.
- [7] UGARTEMENDIA J.M. eta SARASUA J.R. 2011. «Effect of aging on mechanical behavior of a biodegradable poly(lactide-caprolactone) copolymer» *ANTEC 2011-Proceedings of the 69th Annual Technical Conferences & Exhibition*.1964-1968.
- [8] FERNANDEZ J.; ETXEBERRIA A.; UGARTEMENDIA J.M.; PETISCO S. eta SARASUA J.R. 2012. «Effects of chain microstructures on mechanical behavior and aging of a poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) biomedical thermo-plastic-elastomer». *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **12C**, 29-38.
- [9] LEE J.; CUDDIHY M.J. eta KOTOV N.A. 2008. «Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art». *Tissue Engineering* **14**, 61-86.
- [10] SANTOS E.; HERNANDEZ R.M.; PEDRAZ J.L. eta ORIVE G. 2012. «Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: translation from 2D to 3D». *Trends in Biotechnology*, **30** (6), 331-341.
- [11] LAO L.; WANG Y.; ZHU Y.; ZHANG Y. eta GAO C. 2011. «Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering». *Journal of Materials Science: Material in Medicine*, **22**, 1873-1884.
- [12] RAMAKRISHNA S.; RAMALINGAM M.; SAMPATH KUMAR T.S. eta SOBOYEJO W.O. 2010. *Biomaterials: A Nano Approach*, CRC Press, Boca Raton, USA.