

Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina

Cell Culture and Tissue Engineering: Biomedical Applications

Johan Morales-Sánchez¹, Andrea Ulloa-Fernández², Silvia Castro-Piedra³, Carolina Centeno-Cerdas⁴, Laura A. Calvo-Castro⁵

Morales-Sánchez, J; Ulloa-Fernández, A; Castro-Piedra, S; Centeno-Cerdas, C; Calvo-Castro, L. Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 56-65.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628>

- 1 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: jmorales@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-2383-5516>
- 2 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: aulloa@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-3071-9564>
- 3 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: scastro@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0003-0689-8336>
- 4 Ingeniera en Biotecnología. ccenteno@tec.ac.cr. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
- 5 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ancalvo@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>



Palabras clave

Medicina regenerativa; piel; músculo; células madre mesenquimales de tejido adiposo; cáncer; fitoquímicos.

Resumen

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) nació en el 2005 con el objetivo de desarrollar terapias celulares para aplicaciones en medicina regenerativa. Actualmente, el LAINTEC aloja más de una decena de proyectos multidisciplinarios, realizados en colaboración con otros centros de investigación y con otras universidades a nivel nacional e internacional. Estas investigaciones se enfocan en el desarrollo y evaluación de implantes, biomateriales y terapias regenerativas de piel, músculo y hueso, incluyendo el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo. Además, se han establecido modelos celulares y tisulares para la evaluación del potencial bioactivo de distintos agentes con potenciales aplicaciones en biomedicina.

Keywords

Regenerative medicine; skin; muscle; mesenchymal adipose stem cells; cancer; phytochemicals.

Abstract

The Tissue Engineering Laboratory (LAINTEC) at the Biotechnology Research Center (CIB) of the Biology School at Costa Rica Institute of Technology (TEC) began in 2005, aiming towards the development of cell-based therapies for applications in regenerative medicine. Currently, LAINTEC accommodates more than a dozen multidisciplinary research projects, carried out in collaboration with other research centers as well as with other national and international universities. These investigations focus on the development and evaluation of implants, biomaterials and regenerative therapies of skin, muscle and bone tissues, including the isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adipose tissue. In addition, cellular and tissue models are used for the evaluation of the bioactive potential of natural and synthetic agents with potential applications in biomedicine.

Introducción

El *cultivo celular* es la técnica mediante la cual una muestra de algún tejido es procesada para extraer las células que lo componen y se colocan en un medio de alimentación bajo las condiciones ambientales adecuadas que les permiten sobrevivir e incluso dividirse. Además de dividirse (usualmente por mitosis), las células cultivadas pueden especializarse en otros tipos celulares con funciones específicas (proceso conocido como diferenciación), con lo cual son capaces de desempeñar funciones análogas a las que tendrían en distintos tejidos u órganos del cuerpo [1].

El cultivo y propagación de células animales son fundamentales para diversos ensayos en la investigación biomédica y preclínica. El rápido crecimiento en áreas como la terapia génica, la genómica y la proteómica ha dado lugar a un aumento notable en las actividades de cultivo celular [2]. Las técnicas de cultivo celular pueden ser utilizadas para estudiar el impacto biológico de sustancias químicas en condiciones controladas de laboratorio y así determinar

efectos tales como citotoxicidad, genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis en tipos específicos de células. Además, los cultivos celulares se pueden usar como hospederos de virus y bacterias para estudiar su mecanismo de infección o bien, para buscar posibles agentes antivirales o antibacterianos. Los cultivos celulares también pueden ser utilizados como modelos para el estudio de diversas enfermedades y su desarrollo, y son base para la elaboración de vacunas, desarrollo de medicamentos, terapias celulares y otros [2]. De interés para este artículo, destaca la *Ingeniería de Tejidos*, un área directamente relacionada al desarrollo que se ha dado en medicina y biología durante las últimas décadas [3].

El término “ingeniería de tejidos”, fue creado para representar un campo de la ciencia enfocado en la regeneración de tejidos, utilizando células en conjunto con biomateriales, andamios y factores de crecimiento [4]. Hasta mediados de la década de 1980, ese término fue utilizado de manera regular para describir únicamente el uso de dispositivos prostéticos y biomateriales; a partir de 1987 se utiliza la definición actual, refiriéndose de manera más clara, a la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y de ciencias de la vida, hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función en mamíferos, y al desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren esa función [3]. Por el tipo de aplicaciones de la Ingeniería de Tejidos, esta disciplina a su vez está enlazada con la cirugía reconstructiva, trasplantes, microcirugía, biología celular, bioquímica, genética, entre otros [3].

Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) inició en el 2005 con el proyecto “Implementación de un sistema de producción de piel humana *in vitro* para mejorar la recuperación de pacientes con afecciones epidérmicas en Costa Rica”, el cual fue financiado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y el TEC, e implementado por el Dr. Miguel Rojas Chaves, la M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes y la M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo. Esta iniciativa permitió construir y equipar un espacio de laboratorio especializado para el cultivo celular en el CIB, el cual fue inaugurado en el 2006 y donde se iniciaron los primeros cultivos de células humanas con el objetivo de desarrollar terapias celulares para afecciones de la piel. Otros seis proyectos, desarrollados de forma consecutiva entre el 2006 y el 2014, permitieron establecer, optimizar y evaluar, mediante marcadores moleculares y en modelos animales, el cultivo de piel humana con fines regenerativos [5]–[7].

De forma complementaria, se realizaron dos proyectos (2007-2011) en conjunto con la Universidad Nacional (UNA), donde se evaluó el uso de membranas de biomateriales (elaboradas a partir de desechos de quitosano de camarón y colágeno de tilapia) como andamio para el cultivo de células de piel y con miras a desarrollar apósitos biológicos con potencial regenerativo [8]. Además, se ejecutaron dos proyectos (2009-2014) para el establecimiento de procedimientos e instalaciones de irradiación con miras a la creación de Bancos de Tejidos en la región, también con apoyo del OIEA y como parte de un programa de colaboración latinoamericano [9].

El desarrollo de estos proyectos impulsó la consolidación del área de investigación “Área de Biomedicina” en el CIB, la cual se transformó en el área de “Aplicaciones Biomédicas” (2014), enmarcada dentro del eje de conocimiento estratégico “Salud” del TEC y una de las tres áreas formales de investigación del CIB (junto con Biotecnología Vegetal y Biotecnología Ambiental).

A partir del 2012, las áreas de investigación en el LAINTEC se han diversificado considerablemente, incluyendo proyectos multidisciplinarios con otros centros de investigación del TEC y con otras universidades a nivel nacional e internacional. Estas iniciativas se han enfocado en proyectos de ingeniería de tejidos, con miras al desarrollo de implantes, biomateriales y terapias regenerativas

de piel, músculo y hueso en humanos, además de continuar con estudios en regeneración de heridas, incorporando el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo y la evaluación de distintos agentes con potenciales aplicaciones en biomedicina.

En el LAINTEC también se cuenta con un pequeño banco de líneas celulares de distintos tipos de cáncer y algunas líneas de tejidos normales, y se han establecido modelos de cultivos tisulares tridimensionales de piel humana, los cuales se utilizan como modelos de estudio para realizar ensayos de citotoxicidad y de determinación de la actividad biológica (basado en marcadores moleculares de proliferación, viabilidad y muerte celular) de sustancias de origen natural. En estos modelos se ha evaluado –mayoritariamente– el potencial anticancerígeno de diversos extractos de plantas, incluyendo plantas medicinales (moringa, tempate, chilillo) y especies frutales (mora, mango, manzana, guayaba) [10]–[17]. En el caso de los modelos tisulares, al tratarse de reconstrucciones 3D, los constructos de piel recrean de forma más cercana el tejido *in vivo*, por lo que permiten generar información pre-clínica de alta calidad y de mayor potencial predictivo.

A la fecha, estos proyectos han permitido capacitar a más de diez investigadores, quienes han recibido entrenamiento con expertos en centros médicos y de investigación especializados en Argentina, Uruguay, España, Estados Unidos, Inglaterra y Alemania. Gracias a esto, el equipo de trabajo ha crecido para incorporar a la Dra. Laura A. Calvo Castro (Ingeniería de Tejidos y Biología Celular y Molecular, 2008), M.Sc. Carolina Centeno Cerdas (Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, 2009), M.Sc. Montserrat Jarquín Cordero (Mejoramiento genético y Biotecnología, 2012), Ing. María Inés Chaves Rodríguez (Biotecnología, 2013-2018), M.Sc. Andrea Ulloa Fernández (Ingeniería de Tejidos, 2014), Ing. Johan Morales Sánchez (Ingeniería de Tejidos, 2014), M.Sc. Silvia Castro Piedra (Ingeniería de Tejidos, 2014), y María Clara Soto Bernardini (Neurociencias, 2017). El LAINTEC también ha alojado numerosos trabajos de graduación de estudiantes de la carrera de Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología (TEC), varios proyectos y pasantías de estudiantes nacionales e internacionales, así como tesis de maestría.

En la actualidad, el LAINTEC cuenta con tres laboratorios especializados: un laboratorio dedicado para la docencia –debido al incremento en la demanda de personal científico calificado con experiencia en el manejo de cultivo de células humanas y animales *in vitro*–, y dos laboratorios utilizados para actividades de investigación, en donde se desarrollan 12 proyectos (figura 1) relacionados con ingeniería de tejidos y bioactividad, en los que se utilizan cultivos celulares de piel, células madre mesenquimales, músculo, hueso, y líneas celulares de distintos tipos de cáncer, y experimentos con biomateriales como insumos primarios.

Cultivo de piel *in vitro*

Las experiencias de cultivo de piel humana *in vitro* y de ingeniería de tejidos de piel realizadas en el LAINTEC, así como recomendaciones para la crioconservación de piel cadavérica, fueron reportadas previamente en esta misma revista [5]–[9]. Estas prácticas permitieron establecer las condiciones y técnicas generales para el cultivo primario de células de piel de origen humano y animal, escalando hacia la reconstrucción de modelos tridimensionales de este tejido. Actualmente, en el LAINTEC se estudia el potencial quimioterapéutico de diversos agentes bioactivos en modelos de piel *in vitro*.

Por otro lado, mediante colaboraciones internacionales (Universidad Técnica de Múnich, y Universidad Ludwig Maximilliam, Alemania), se han estudiado métodos alternativos para la regeneración de la piel, garantizando su apropiada oxigenación y promoviendo su vascularización mediante el uso de microalgas genéticamente modificadas para la liberación de oxígeno y factores de crecimiento humano como VEGF, PDGF y SDF-1 alfa [18], [19].

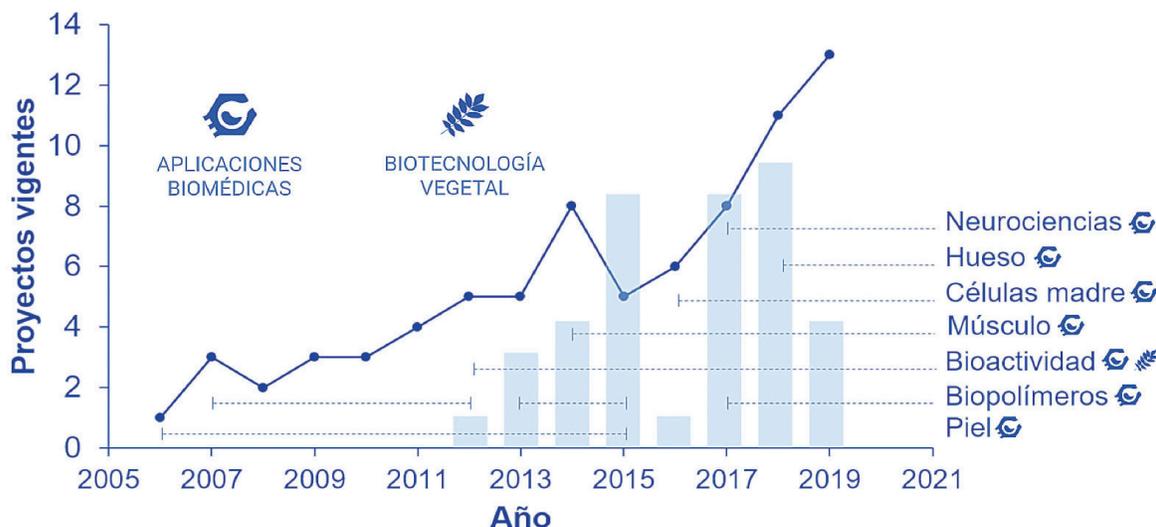


Figura 1. Cantidad de proyectos por año (línea continua) realizados en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) desde su creación (2006) a la actualidad (2019). La línea punteada indica el área de investigación de los proyectos vigentes por período. Las columnas indican la cantidad de publicaciones científicas por año. El área de neurociencias se describe en otro artículo de esta misma edición.

Células madre mesenquimales

Otra de las líneas de investigación del LAINTEC está relacionada al uso de células madre. En las últimas dos décadas, el tejido adiposo ha pasado de ser considerado un tejido de reserva energética, a uno mucho más dinámico con numerosas cualidades, entre las que destaca el ser materia prima para determinadas terapias celulares [1].

Cuando el tejido adiposo es disgregado en el laboratorio, libera una mezcla de células que se conocen como la Fracción Estromal Vascular (FEV) [2]. Este coctel de células incluye células madre mesenquimales (CMM), células precursoras endoteliales, células endoteliales, macrófagos, células de músculo liso, linfocitos, pericitos y preadipocitos. Bajo las condiciones adecuadas, las CMM son capaces de adherirse y proliferar en condiciones de cultivo celular [20].

Tanto la FEV como las CMM han mostrado tener gran potencial en la regeneración de heridas cutáneas, por lo que están siendo estudiados a nivel internacional con el fin de obtener todas las evidencias científicas necesarias para demostrar su inocuidad y eficacia [21]. Costa Rica no es la excepción, ya que desde el 2015 en el TEC, se ha venido estableciendo el aislamiento y caracterización molecular de estas células, con miras a ofrecer opciones terapéuticas alternativas a quienes sufran de heridas agudas o crónicas en la piel y otras patologías.

A la fecha, se ha logrado exitosamente establecer los protocolos que permiten obtener tanto la FVE como las CMM y se ha demostrado su potencial de diferenciación en varios tipos celulares. Por otro lado, se han realizado pruebas en animales con el fin de observar su efecto regenerativo *in vivo*. El próximo paso consiste en realizar pruebas en seres humanos, para lo cual el TEC busca alianzas estratégicas con el sector salud, que permitan desarrollar de forma responsable y ética cada una de las fases de investigación correspondientes, de manera que se pueda transferir estas estrategias como una terapia para atender diversas afecciones de la piel.

Músculo Esquelético

El músculo esquelético estriado es el tejido más abundante del cuerpo y presenta el potencial de ser regenerado tras una herida o enfermedad [22]. Sin embargo, la pérdida masiva de tejido muscular, así como el padecimiento de diferentes distrofias, hace que esta regeneración se vea comprometida, pues se requiere de técnicas especializadas para su reconstrucción, muchas de ellas basadas en terapia celular e ingeniería de tejidos [23]. No obstante, los tratamientos actuales basados en trasplante autólogo de músculo esquelético o la inyección de células en suspensión o vía intravenosa han sido poco exitosos [24].

Las células encargadas de la regeneración muscular reciben el nombre de células satélite. A partir del año 2014, se inició la investigación en el CIB para establecer el aislamiento de este tipo de células, a través de técnicas de cultivo celular. El objetivo que se busca es la creación de modelos tridimensionales *in vitro* de las distrofias musculares más comunes en el país, así como mejorar la calidad de vida de pacientes con grandes pérdidas de tejido muscular a través de terapia celular. La recreación *in vitro* de tejido muscular requiere de un esfuerzo multidisciplinario y la utilización de biomateriales que simulen la arquitectura del tejido, además de la generación de estímulos mecánicos y eléctricos, lo cual es fundamental para lograr el desarrollo de fibras musculares funcionales [24].

De esta manera, se ha trabajado en conjunto con el Centro de Investigación y Extensión de Ingeniería de los Materiales (CIEMTEC) y las escuelas de Física y Química del TEC, así como con otros centros de investigación nacionales como el Instituto Clodomiro Picado (ICP) y el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Estas colaboraciones se han enfocado en diferentes factores que contribuirán a reproducir en el laboratorio las condiciones bajo las cuales este tejido se regenera *in vivo*. Dentro del trabajo actualmente en desarrollo, se incluye un biorreactor que realiza estímulos mecánicos a cultivos celulares inoculados sobre matrices de policaprolactona (PCL) y un sistema de generación de impulsos eléctricos; ambos permitirían incrementar la diferenciación muscular sobre andamios tridimensionales.

Estos proyectos se desarrollan con miras a generar constructos de músculo esquelético tridimensionales que permitan el estudio del mecanismo de acción y reparación del tejido muscular ante la exposición a toxinas que destruyen el músculo esquelético, así como para modelar las distrofias musculares más comunes en Costa Rica, y su uso como modelo de estudio para generar terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes con distintas afecciones del tejido músculo esquelético.

Hueso

El tejido óseo comprende cerca del 15% del peso corporal y es el responsable de brindarle estructura al cuerpo y proteger los órganos internos, además de almacenar nutrientes y producir otros tejidos como la sangre [25]. Al igual que el resto del cuerpo, este tejido puede sufrir lesiones, fracturas, enfermedades que dificulten la movilidad e incluso conlleven a la pérdida de un segmento óseo. Tradicionalmente, cuando algún segmento es severamente dañado, este se reemplaza por algún material que simule la estructura perdida, pero no los componentes biológicos. En la actualidad, se tiende a la utilización de materiales más bioactivos y reabsorbibles que puedan ser recolonizados por las células que componen el tejido óseo y reestablecer la funcionalidad completa de la zona dañada [25], [26].

En conjunto con instituciones del campo de la Salud como el Hospital del Trauma del Instituto Nacional de Seguros, el Laboratorio de Entrenamiento e Investigación en Cirugía Mínimamente Invasiva (LEICIMI), la Universidad Técnica de Múnich y la Escuela de Física, el TEC está desarrollando el área de investigación en tejido óseo. A la fecha, se trabaja en la validación

preclínica de las condiciones de irradiación y esterilización de tejido óseo para su uso en banco de tejidos, así como en el desarrollo de andamios hechos a partir de biomateriales reabsorbibles, que permitan simular la biología celular del tejido óseo bajo condiciones *in vitro*.

El desarrollo de la ingeniería de tejidos de hueso conlleva un proceso altamente dinámico y complejo que implica el reclutamiento, proliferación, migración y diferenciación de células osteoprogenitoras, las cuales, además de estar embebidas en un material poroso, este debe tener las propiedades mecánicas adecuadas que permitan un comportamiento lo más similar al hueso real [27]. Debido a lo anterior, junto con el CIEMTEC, se están desarrollando diferentes mezclas de biomateriales y recubrimientos para la creación de estructuras porosas por medio de impresión 3D, que permitan simular la estructura tridimensional de tejido óseo.

Una de las premisas para el correcto desarrollo de andamios biocompatibles para la regeneración ósea, como se menciona anteriormente, es que el material debe poseer propiedades mecánicas altamente equivalentes al hueso nativo [27]. Con este fin, en el mismo biorreactor mencionado en la sección anterior, se pretende inocular células osteogénicas embebidas en andamios que simulen la estructura porosa del hueso, a fin de estudiar las propiedades mecánicas del material bajo condiciones similares a lo que ocurre *in vivo*, además de estudiar el comportamiento celular ante diferentes estímulos mecánicos y cómo estos inciden sobre la diferenciación celular.

Biocompatibilidad con otros materiales

Se denomina biomateriales a aquellas sustancias que han sido diseñadas como estructura de soporte o como intermediarios para mediar la interacción con componentes de sistemas vivos en procedimientos terapéuticos o de diagnóstico [28]. Los andamios generados con biomateriales deben de cumplir una serie de propiedades mecánicas, tales como biodegradabilidad controlada y la habilidad de imitar las estructuras biológicas y la función de la matriz extracelular [29].

En ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, los andamios juegan un papel crítico, por lo que son diseñados para ser biocompatibles con cierto grado de porosidad y una superficie que permita la adhesión, migración, proliferación, diferenciación e infiltración de las células [29]. Mediante diferentes técnicas biomecánicas, de microscopía, de cultivo celular y biología molecular, todas estas características son analizadas en los diferentes biomateriales que se estudian en el laboratorio.

En el pasado, se realizaron en el CIB pruebas con quitosano (obtenido a partir de exoesqueleto de camarón) y colágeno (obtenido de piel de tilapia), para generar un apósito con miras a su aplicación clínica en afecciones de la piel, por lo que fue necesario asegurarse de que tuviera las características necesarias para que células epiteliales pudieran interactuar con él [8]. De la misma manera, se ha trabajado además una serie de materiales de origen biológico que funcionan como soporte para el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos (células de la piel) o bien CMM, todos ellos con miras a la aplicación clínica.

Actualmente, tanto en los estudios que se realizan a nivel de tejido óseo como en los estudios que utilizan células musculares, LAINTEC realiza ensayos de biocompatibilidad para verificar la interacción que se da entre los materiales y el componente biológico. Otro de los biomateriales que se encuentra en estudio es una aleación metálica nanoestructurada con recubrimientos biofuncionales, producida por CIEMTEC, y con la cual se busca generar dispositivos médicos o parte de ellos.

Modelos celulares y tisulares para análisis de actividad biológica

Los cultivos de piel humana *in vitro*, tanto a nivel de monocapa como en constructos tridimensionales de piel completa (dermis-epidermis), han resultado útiles como modelo en pequeña escala para el estudio del efecto de sustancias naturales y de materiales con características bioactivas, con miras al desarrollo de alimentos funcionales, nutraceuticos y fitofármacos. Los análisis realizados incluyen: determinación de efecto antioxidante (método de DPPH), concentración de polifenoles totales (método de Folin-Ciocalteu), citotoxicidad en líneas celulares de distintos tipos de cáncer en humanos (cuantificación de viabilidad celular por medio del reactivo MTT y de células totales por tinción de DAPI), evaluación del potencial regenerativo (ensayo de migración celular), y análisis de marcadores moleculares de proliferación, viabilidad y muerte celular (mediante Western Blot, inmunocitoquímica, e inmunofluorescencia). Esto permite proporcionar herramientas clave para facilitar la medicina personalizada, al tiempo que ahorra dinero y reduce la cantidad de animales utilizados para la investigación. A la fecha, estos estudios han permitido confirmar el potencial biomédico de sustancias bioactivas presentes en extractos de diversas plantas en Costa Rica, tales como la mora [10], manzana, anona y ciruelo [13]–[15], [30], guayaba [11] y varias plantas medicinales (*Phyllanthus*, *Senna reticulata*, *Pettiveria alliaceae*, *Moringa*) [12], [16], [17], [31], [32].

Conclusión

La investigación en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa ofrece soluciones novedosas en el área de Biomedicina, tanto para la generación de evidencia preclínica, así como para la creación de nuevas estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas. Con una trayectoria de más de 10 años, los proyectos desarrollados en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del CIB en el TEC han contribuido a la capacitación de recurso humano en técnicas de cultivo y expansión de células humanas y reconstrucción de tejidos humanos *in vitro*, con miras a aplicaciones prácticas en el área de la salud. La perspectiva a futuro que se ha planteado el LAINTEC es contribuir además al establecimiento y desarrollo en el país de la medicina traduccional, un concepto reciente que busca el traslado de los avances alcanzados en el laboratorio a la práctica clínica diaria, con el beneficio directo para los pacientes y la sociedad en general.

Referencias

- [1] D. E. Lynn, "Cell culture" in *Encyclopedia of Insects*, Segunda ed. Burlington: Academic Press, 2009.
- [2] C. Helgason and C. Miller, Eds., *Basic Cell Culture Protocols*. Totowa: Humana Press, 2013.
- [3] U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, and H. P. Wiesmann, Eds., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [4] F. Akter, *What is tissue engineering? in Tissue Engineering Made Easy*. Cambridge, UK: Academic Press Inc. (London) Limited, 2016.
- [5] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, C. Centeno-Cerdas, M. I. Chaves-Rodríguez, N. Chaves-Solano, and M. Rojas-Chaves, "Cultivo in vitro de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 33–45, 2015.
- [6] M. I. Chaves-Rodríguez, L. A. Calvo-Castro, R. Alvarado-Meza, O. Madrigal-Monge, A. Ulloa-Fernández, and C. Centeno-Cerdas, "Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 46–57, 2015.
- [7] A. Ramírez-Téllez, C. Centeno-Cerdas, M. Conejo-Solís, and L. A. Calvo-Castro, "Irradiación subletal de fibroblastos murinos 3T3 con rayos X para su utilización como capa celular alimentadora," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 15–26, 2015.

- [8] S. E. Castro-Piedra *et al.*, "Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas : evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 58–68, 2015.
- [9] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, A. Ulloa-Fernández, R. Portuguese-Barboza, C. Centeno-Cerdas, and M. Rojas-Chaves, "Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 62–82, 2015.
- [10] L. Calvo-Castro *et al.*, "Protective effect of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model," *Photochem. Photobiol.*, vol. 89, no. 5, pp. 1199–1207, Sep. 2013.
- [11] K. Sánchez-zúñiga, S. Castro-piedra, I. Moreira-, E. Arnáez-serrano, and M. Navarro-hoyos, "Evaluación de las propiedades citotóxicas de un extracto de frutos de guayaba (*Psidium* Cytotoxic evaluation of properties in guava fruit," 2017.
- [12] I. Moreira-González *et al.*, "Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica," *Rev. Tecnol. en Marcha*, pp. 69–77, 2014.
- [13] M. Navarro *et al.*, "Polyphenolic Characterization and Antioxidant Activity of *Malus domestica* and *Prunus domestica* Cultivars from Costa Rica," *Foods*, vol. 7, p. 15, 2018.
- [14] M. Mirtha Navarro *et al.*, "Estudio preliminar del potencial bioactivo de la *Annona cherimola* (anona) y *Prunus domestica* (ciruelo) cultivadas en Costa Rica," *Rev. en Marcha*, vol. 27, no. 2, pp. 37–44, 2014.
- [15] M. Navarro *et al.*, "Chemical Profiling of Polyphenolic Compounds in the Fruit Skin of *Prunus Domestica* Plums from Costa Rica," *J. Res. Anal.*, vol. 3, pp. 42–51, 2017.
- [16] M. Navarro *et al.*, "Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd.," *Plants*, vol. 6, p. 50, 2017.
- [17] M. Navarro *et al.*, "Flavonoids and Ellagitannins Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Phyllanthus acuminatus* Vahl.," *Plants (Basel, Switzerland)*, vol. 6, p. 62, 2017.
- [18] T. Ludwig *et al.*, "Biomaterials Towards autotrophic tissue engineering : Photosynthetic gene therapy for regeneration Tom a," vol. 75, pp. 25–36, 2016.
- [19] C. Centeno-cerdas *et al.*, "Acta Biomaterialia Development of photosynthetic sutures for the local delivery of oxygen and recombinant growth factors in wounds," *Acta Biomater.*, vol. 81, pp. 184–194, 2018.
- [20] C. Tremolada, V. Colombo, and C. Ventura, "Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells : State of the Art and Lipogems® Technology Development," *Curr. Stem Cell Reports*, vol. 2, pp. 304–312, 2016.
- [21] P. Bora and A. S. Majumdar, "Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine : a brief review on biology and translation," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, p. 145, 2017.
- [22] F. S. Tedesco, A. Dellavalle, J. Diaz-manera, G. Messina, and G. Cossu, "Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 1, pp. 11–19, 2010.
- [23] M. Juhas *et al.*, "Incorporation of macrophages into engineered skeletal muscle enables enhanced muscle regeneration," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 2, pp. 942–954, 2018.
- [24] B. J. Kwee and D. J. Mooney, "Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 47, pp. 16–22, 2017.
- [25] T. T. Madanagopal, S. V. Agarwalla, and V. Rosa, *Carbon nanocomposites for implant dentistry and bone tissue engineering*. Elsevier Inc., 2019.
- [26] P. Wolff *et al.*, "Oxygen-distribution within 3-D collagen I hydrogels for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 95, pp. 422–427, 2019.
- [27] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [28] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009.
- [29] Y. H. Murugan Ramalingam, Ziyad Haidar, Seeram Ramakrishna, Hisatoshi Kobayashi, Ed., *Integrated Biomaterials in Tissue Engineering*. Scrivener Publishing LLC, 2012.
- [30] M. Navarro-Hoyos *et al.*, "Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica," *Rev. Tecnol. en Marcha*, vol. 30, no. 1, pp. 3–13, 2017.

- [31] M. Sequeira-Obando, L. Ca, Ivo-Castro, I. Moreira-González, E. Arnáez-Serrano, and M. Navarro, "Cytotoxic effect of an ethanol extract of *Phyllanthus accuminatus* leaves on human epithelial cancer cells," *Pharmacol. Online*, vol. 12, p. 22, 2014.
- [32] K. Sánchez-Zúñiga, L. Calvo-Castro, I. Moreira-González, M. Sequeira-Obando, E. Arnáez-Serrano, and M. Navarro, "Preliminary evaluation of the cytotoxic capacity of an ethanol extract from *Moringa oleifera* leaves," *Pharmacol. Online*, vol. 12, p. 103, 2014.