COMPARACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL EN ANDAMIOS IMPRESOS EN 3D Y BIOIMPRESOS CON UNA BIOTINTA DE ALGINATO, GELATINA, NANOHIDROXIAPATITA Y L-PRF.

LINA MARIA ANAYA SAMPAYO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
2024

COMPARACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL EN ANDAMIOS IMPRESOS EN 3D Y BIOIMPRESOS CON UNA BIOTINTA DE ALGINATO, GELATINA, NANOHIDROXIAPATITA Y L-PRF.

LINA MARIA ANAYA SAMPAYO

TESIS DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR:
Dabeiba Adriana García Robayo, PhD.

CO-DIRECTORES:

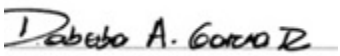
Luis María Rodríguez Lorenzo, PhD.
Nelly Stella Roa Molina, PhD.
Constanza Martínez Cardozo, PhD.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
2025

COMPARACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL EN ANDAMIOS IMPRESOS EN 3D Y BIOIMPRESOS CON UNA BIOTINTA DE ALGINATO, GELATINA, NANOHIDROXIAPATITA Y L-PRF.

LINA MARIA ANAYA SAMPAYO

APROBADO



Dabeiba Adriana García Robayo, PhD
Directora



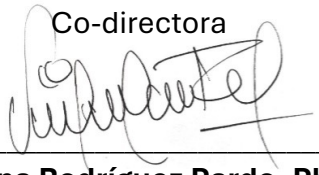
Luis Maria Rodríguez, PhD
Co-director



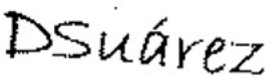
Nelly Roa Molina, PhD
Co-directora



Constanza Martínez Cardozo, PhD
Co-directora



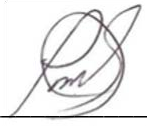
Viviana Rodríguez Pardo, PhD
Jurada



Daniel Suárez, PhD
Jurado



Javier Navarro Rueda, PhD
Jurado



Raúl Rosáles Ibañez, PhD
Jurado

Camilo Alfonso Rodríguez, PhD
Jurado

COMPARACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL EN ANDAMIOS IMPRESOS EN 3D Y BIOIMPRESOS CON UNA BIOTINTA DE ALGINATO, GELATINA, NANOHIDROXIAPATITA Y L-PRF.

LINA MARIA ANAYA SAMPAYO

APROBADO

Alba Alicia Trespalacios, PhD
Decana
Facultad de Ciencias

Jhon Jairo Sutachán Rubio, PhD
Director de Posgrado
Facultad de Ciencias

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
2025

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia"

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia, en especial a mi padre, por su amor incondicional y apoyo constante a lo largo de este proceso. A Nicolás, mi pareja, por su comprensión, amor y acompañamiento en cada paso de este camino, sin ti este logro no habría sido posible.

A mis tutores, la Dra. Adriana García, la Dra. Nelly Roa, la Dra. Constanza Martínez y el Dr. Luis Rodríguez, por su invaluable guía, sabiduría y paciencia. Gracias por creer en mí y por brindarme las herramientas necesarias para avanzar en mi investigación.

A todo el equipo del Centro de Investigaciones Odontológicas por abrirme sus puertas y permitirme trabajar en un ambiente tan enriquecedor.

A la Universidad Javeriana, por el financiamiento y el apoyo brindado durante este proceso, y al Ministerio de Ciencias y Tecnología de Colombia por el apoyo a través de la beca, que me permitió llevar a cabo esta tesis.

Finalmente, agradezco a Dios por darme la fortaleza, la sabiduría y la paciencia para culminar esta etapa.

Gracias a todos los que, de una manera u otra, contribuyeron a que este logro fuera posible.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS **17**

RESUMEN **18**

ABSTRACT **20**

1. INTRODUCCIÓN **22**

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN **24**

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN **28**

4. MARCO TEÓRICO **29**

4.1. Regeneración ósea en la cavidad oral 29
4.2. Ingeniería de tejido óseo 31
4.2.1. Biotintas utilizadas en impresión 3D para la fabricación de andamios *5*
4.2.2. Factores de crecimiento *11*
4.2.3. Células madre para regeneración de tejido óseo *12*
4.2.4. Diferenciación de osteoblastos y función *12*

5. OBJETIVOS **14**

5.1. Objetivo general 14
5.2. Objetivos específicos 14

6. METODOLOGÍA **15**

6.1. Objetivo 1: Identificar la biotinta y la estrategia de impresión de alginato, gelatina y nanohidroxiapatita, para obtener andamios por bioimpresión e impresión 3D. 15
6.1.1. Obtención del L-PRF *15*
6.1.2. Preparación de las tintas *16*
6.1.3. Caracterización reológica *17*
6.1.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) *18*
6.1.5. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA). *18*
6.1.6. Evaluación de citotoxicidad en HDFn y DPSC *19*
6.2. Objetivo 2: Caracterizar, física, biológica y estructuralmente andamios generados mediante impresión en 3D y bioimpresión. 19
6.2.1. Impresión 3D *19*
6.2.2. Bioimpresión 3D *22*
6.3. Objetivo 3: Comparar la diferenciación osteogénica In vitro de células madre de pulpa dental humana en un andamio generado mediante impresión 3D y en un andamio bioimpreso, ambos a base de la biotinta optimizada. *24*
6.3.1. Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) *24*
6.4. Análisis de resultados *25*

7. RESULTADOS **26**

7.1. Caracterización de la tinta 26
7.2. Comportamiento reológico de las biotintas 27
7.3. Análisis de grupos funcionales mediante FT-IR 30
7.4. Análisis termogravimétrico (TGA) 32
7.5. Análisis calorimétrico diferencial (DSC) 34
7.6. Citotoxicidad de las tintas 35

OBJETIVO 2 ..... **37**

7.7. IMPRESIÓN 3D 37
7.7.1. COMPORTAMIENTO DE HINCHAMIENTO Y DEGRADACIÓN DE LOS ANDAMIOS IMPRESOS EN 3D 37
7.7.2. Caracterización física de los andamios mediante SEM 38
7.7.3. Cuantificación de factores de crecimiento mediante Luminex 39
7.7.4. Proliferación Celular 41
7.8. BIOIMPRESIÓN 3D 44
7.8.1. Presiones 44
7.8.2. Live/Dead 46
OBJETIVO 3 48
7.9. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA 48
8. DISCUSIÓN 52
9. CONCLUSIONES 61
10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS 63
REFERENCIAS 64
ANEXOS 82

Índice de tablas

Tabla 1. Métodos utilizados para la obtención de andamios. 31
Tabla 2. Técnicas para la fabricación de andamios óseos, incluyendo sus ventajas y desventajas. 5
Tabla 3. Composición de aminoácidos de la gelatina de piel de cerdo a partir de resultados de (Farris et al., 2010). 8
Tabla 4. Nomenclatura de las tintas preparadas. 16
Tabla 5. Condiciones de impresión. Impresora CellInk. 19
Tabla 6. Primers. 24
Tabla 7. Nomenclatura, composición y parámetros de la ley de potencia de las biotintas preparadas. 26

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Determinación del comportamiento de hinchamiento donde Ps es el peso seco de cada andamio y Ph es el peso hinchado de cada andamio en diferentes momentos. 20
Ecuación 2. Determinación del comportamiento de degradación, donde Ps es el peso seco de cada andamio y Pi es el peso después de cada tiempo de incubación. 20
Ecuación 3. Cálculo del caudal de la jeringa de impresión en el cartucho y en la punta del cabezal. Q : Caudal ; R : Radio ; V : Velocidad. 22
Ecuación 4. Distribución de la tensión cortante en el cartucho y en la punta del cabezal. Donde: Q: Caudal; R: Radio máximo; r: radio mínimo; V: Velocidad, distribución de estrés. 23
Ecuación 5. Cálculo del esfuerzo cortante. Donde τ es el esfuerzo de corte, K es el índice de consistencia del flujo y n es el índice de la ley de potencia. 23

Ecuación 6. Determinación de la viabilidad celular en andamios bioimpresos..... 23

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de la gelatina. Figura tomada de (Deshmukh et al., 2017). 8
Figura 2. Estructura química del alginato. (a) Bloques homopoliméricos de ácido poli-α-1,4-L-gulurónico (GG); (b) bloques homopoliméricos de poli-β-1,4-D-ácido manurónico (MM); (c) bloques heteropoliméricos de residuos M y G alternos. Figura tomada de (Abka-khajouei et al., 2022). 9
Figura 3. Representación esquemática de la diferenciación de osteoblastos (OB). MSC, células troncales mesenquimales. BMP, proteína morfogenética ósea. FGF, factor de crecimiento de fibroblastos. RUNX2, factor de transcripción 2 relacionado con runt. PTH, hormona paratiroidea. TGF, factor de crecimiento transformante. Hh, erizo. SATB2, proteína especial de unión a secuencia rica en AT 2. ATF4, factor de transcripción activador 4. CREB, unión a elemento sensible a cAMP. ALP, fosfatasa alcalina. OPN, osteopontina. OCN, osteocalcina. ONN, osteonectina. BSP, sialoproteína ósea. COL1A1, cadena alfa 1 de colágeno tipo 1. Figura tomada de (Amarasekara et al., 2021). 13
Figura 4. Biotintas sintetizadas con diferentes composiciones. (A) 5 % de alginato y 5 % de gelatina (ALG5-GEL5); (B) 5 % de alginato, 5 % de gelatina e nanohidroxiapatita al 1 % (ALG5-GEL5-nHA1); (C) 5 % de alginato, 5% de gelatina e nanohidroxiapatita al 5 % (ALG5-GEL5-nHA5); (D) 5 % de alginato, 5 % de gelatina e nanohidroxiapatita al 10 % (ALG5-GEL5-nHA10). (E) Coágulo de L-PRF; (F)L-PRF liofilizado; (G) 5 % de alginato, 5 % de gelatina, nanohidroxiapatita al 10 % y L-PRF al 10 % (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF 10 %). ALG para alginato, GEL para gelatina y NHA para nanohidroxiapatita. Cada imagen incluye una barra de escala de 1 cm para facilitar la referencia de tamaño. . 27
Figura 5. Análisis reológico de las biotintas preparadas. A) Incremento de esfuerzo de cizallamiento; B) Recuperación de esfuerzo de cizallamiento; C) Porcentaje de recuperación; D) Barrido de frecuencias; E) Tan δ; F) Gelificación a 37 °C para todas las biotintas. ALG: Alginato, GEL: Gelatina, nHA: Nanohidroxiapatita, L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos, G': Módulo de almacenamiento, G'': Módulo de pérdida. *** p < 0.0001, **** p < 0.0001. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 29
Figura 6. Grupos funcionales detectados en las biotintas de biomateriales mediante análisis FT-IR. (A) Polvo de nanohidroxiapatita; (B) L-PRF liofilizado (C) Polvo de gelatina; (D) Polvo de alginato de sodio; (E) ALG5-GEL5 (alginato 5%–gelatina 5% sin nanohidroxiapatita); (F–H) biotintas con concentraciones crecientes de nanohidroxiapatita al 1, 5 y 10%: ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5 y ALG5-GEL5-nHA10, respectivamente, (I) ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF y (J) ALG5 reticulado con CaCl2. Abreviaturas: ALG, alginato; L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos. GEL, gelatina; nHA, nanohidroxiapatita; $CaCl_2$, cloruro de calcio. 31
Figura 7. Análisis termogravimétrico (TGA) de los materiales estudiados destacó la alta estabilidad térmica de la nanohidroxiapatita (nHA). (A) Alginato, (B) Gelatina, (C) Nanohidroxiapatita, (D) L-PRF, (E) Biotinta de alginato, gelatina e nanohidroxiapatita

(ALG5-GEL5-nHA10) y (F) Biotinta de alginato, gelatina e nanohidroxiapatita y L-PRF (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF). Los resultados muestran el comportamiento térmico y la estabilidad de cada material y sus combinaciones..... 33
Figura 8. Análisis calorimétrico diferencial (DSC) de los materiales estudiados destacó la alta estabilidad térmica de la nanohidroxiapatita (nHA) en la adición a las biotintas. (A) Alginato, (B) Gelatina, (C) Nanohidroxiapatita, (D) L-PRF, y (E) Combinación de los materiales (alginato, gelatina, nanohidroxiapatita y L-PRF). Los resultados muestran las transiciones térmicas y las características térmicas de cada material y sus combinaciones. 34
Figura 9. Viabilidad celular. No se observó citotoxicidad en ninguna de las biotintas evaluadas utilizando Alamar Blue en HDFn. (A) Viabilidad celular al día 1, mostrando mayor viabilidad en todas las composiciones en comparación con el control ($p < 0.0001$), con diferencias significativas entre las composiciones. (B-C) Viabilidad celular al día 3 y 7, demostrando que un mayor contenido de nanohidroxiapatita (nHA) aumentó significativamente la viabilidad celular en las composiciones ALG5-GEL5-nHA10, ALG5-GEL5-nHA5 y ALG5-GEL5-nHA1 en comparación con ALG5-GEL5 y el control ($p < 0.0001$). Todos los andamios fueron no citotóxicos, con una tendencia positiva relacionada con la fase inorgánica. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 36
Figura 10. Evaluación de la citotoxicidad de biotintas en DPSC mediante MTS. (A) Al día 1, todas las biotintas mostraron viabilidad celular significativamente mayor en comparación con el control ($p < 0.0001$), con diferencias significativas entre ellas. (B-C) Al día 3 y 7, la biotinta ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF presentó la mayor viabilidad celular. Estos resultados confirman que ninguna biotinta fue citotóxica y resaltan la influencia positiva del L-PRF en la viabilidad celular.. ALG: Alginato, GEL: Gelatina, HA: Nanohidroxiapatita. L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos. ***$p < 0.0001$ ****$p < 0.0001$. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 37
Figura 11. Perfiles de hinchamiento y degradación de los andamios impresos. A) ALG5-GEL5; B) ALG5-GEL5-NHA1; C) ALG5-GEL5-NHA5; D) ALG5-GEL5-NHA10; E) Cuantificación del porcentaje de hinchamiento; F) Cuantificación del porcentaje de degradación. ALG: Alginato, GEL: Gelatina, nHA: Nanohidroxiapatita, L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos. *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 38
Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los andamios bioimpresos en 3D. (A) Estructura general del andamio a un aumento de 40x, mostrando una distribución porosa con poros de tamaño de 1 mm. (B) Interconexiones entre fibras del andamio a un aumento de 80x, con textura definida de las paredes de los poros y una estructura rugosa característica de los andamios con nanohidroxiapatita. (C) Partículas de nanohidroxiapatita observadas a un aumento de 800x. (D) Análisis de dispersión de energía por rayos X (EDX), donde se observan elementos como el carbono (C) en un porcentaje de X% y el oxígeno (O) en un porcentaje de Y%, confirmando la composición de los andamios. 39

Figura 13. Liberación de factores de crecimiento por los andamios impresos en 3D con L-PRF durante un período de 21 días mediante LUMINEX. (A) PDGF-BB (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas). (B) EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico). (C) VEGF-C (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular). (D) FGF-B (Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico). (E) BMP-2 (Proteína Morfogenética Ósea-2). ****p < 0.0001, ***p < 0.001. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 41
Figura 14. Proliferación celular evaluado mediante tinción inmunohistoquímica con Ki-67. En medio concentrado liofilizado de andamios de ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF a: (A, B) Día 1; (C, D) Día 3; (E, F) Día 7; (G, H) Día 14; (I, J) Día 21; (K, L) Medio condicionado con coágulo de L-PRF; (M, N) SFB al 10%; (O, P) Control negativo; (Q) Porcentaje de células proliferando en los días 1, 3, 7, 14 y 21. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 44
Figura 15. Análisis de presión en la punta de la boquilla y la jeringa durante la extrusión. (A) Impresora Cellink Inkredible. (B-D, F) Diferentes formulaciones de andamios evaluadas: ALG5-GEL5, ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5, ALG5-GEL5-nHA10 y ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF. (E). Impresora CellInk Bio x. (G) Simulación de la distribución de presión dentro del cartucho y en la punta de la boquilla, realizada con MATLAB, destacando las fuerzas mecánicas ejercidas sobre las células durante el proceso de extrusión. (H) Comparación de las presiones de extrusión en la punta de la boquilla y en la jeringa para distintas formulaciones de biotintas: ALG5-GEL5, ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5, ALG5-GEL5-nHA10 y ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF. Los niveles de significancia estadística están indicados como: ** p = 0.025, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. n=3. 45
Figura 16. Imágenes representativas del ensayo Live/Dead y cuantificación de viabilidad celular. Las imágenes muestran células HDFn en formulaciones de biotintas después de (A, D) 24 h y (B, E) 7 días de bioimpresión, con las siguientes composiciones: (A, D) ALG5-GEL5-nHA1, (B,E) ALG5-GEL5-nHA5 y (C,F) ALG5-GEL5-nHA10. El análisis cuantitativo de la viabilidad celular se presenta en (G) para 24 h y en (H) para 7 días post-bioimpresión. Abreviaturas: ALG (alginato), GEL (gelatina), nHA (nanohidroxiapatita). La significancia estadística se indica como ** p < 0.001, *** p < 0.0001. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos (Anaya-Sampayo, Roa, et al., 2024, Anexo 5). 47
Figura 17. Viabilidad celular en andamios bioimpresos con biotinta ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF evaluada mediante el ensayo LIVE/DEAD a los 1, 3, 14 y 21 días después de la impresión. Los andamios impresos en 3D a (A 24 horas; (B) 3 días; (C) 14 días y (D) 21 días. Los andamios bioimpresos a (E) 24 horas; (F) 3 días; (G) 14 días y (H) 21 días. Cálculo de la viabilidad de andamios impresos en 3D y bioimpresos a los (I) 24 h; (J) 7 días; (K) 14 días; (L) 21 días. * p < 0.001, *** p < 0.0001. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 48
Figura 18. Expresión relativa de los genes RUNX2, ALP, COL1A1, BMP-2, TGF-β, VEGF, OPN, OPG, OSX, OCN y RANKL en andamios bioimpresos e impresos en 3D. La expresión génica se evaluó a los 1, 7, 14 y 21 días de cultivo. (A). Runx2; (B)ALP ;(C) COL11; (D) BMP-2; (E) TGF-B; (F) OPN; (G)OPG; (H) OSX; (I) OCN; (J) RANKL. *p < 0.05,

**p < 0.01, ***p < 0.001, **** p<0.0001. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. 51

ALG	Alginato de sodio
GEL	Gelatina
nHA	Nanohidroxiapatita
L-PRF	Fibrina rica en plaquetas y leucocitos
DPSC	Células madre de pulpa dental
CaCl2	Cloruro de calcio
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
TGA	Análisis Termogravimétrico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
FGF-B	Factor de crecimiento fibroblástico B
PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
BMP-2	Proteína morfogenética ósea
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
VEGF-C	Factor de crecimiento endotelial vascular
OSX	Osterix
ALP	Fosfatasa alcalina
OSC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta

La pérdida ósea en la cavidad oral afecta la calidad de vida de las personas y puede ser causada por diversas alteraciones sistémicas y locales. Aunque en los tratamientos clínicos para reemplazar este tejido perdido se usan biomateriales sintéticos y matrices desmineralizadas de hueso, sus limitaciones en eficiencia, costos y potencial osteogénico impulsaron el desarrollo de la ingeniería de tejidos como una alternativa prometedora. Esta disciplina utiliza matrices tridimensionales biocompatibles combinadas con células y factores de crecimiento para promover la formación de tejidos funcionales. Para abordar la regeneración de tejidos perdidos en la cavidad oral, se exploran diversas técnicas con el objetivo de diseñar un andamio ideal. La impresión 3D y la bioimpresión surgieron como tecnologías emergentes que permitieron crear biotintas para generar constructos impresos con materiales como nanohidroxiapatita, quitosano, gelatina y alginato, proporcionando un ambiente propicio para la adhesión y crecimiento de células. Estas células pueden ser inyectadas o integradas en el material durante la impresión. Entre los factores de crecimiento estudiados para impulsar el crecimiento y la proliferación celular destaca la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF). Asimismo, las células madre de pulpa dental humana (DPSC) demostraron ser altamente prometedoras debido a su capacidad de diferenciación, especialmente hacia el linaje osteoblástico para la formación de tejido óseo. Sin embargo, son escasos los estudios que integraron una matriz biocompatible, factores de crecimiento y células madre de origen dental con propiedades osteogénicas para aplicaciones en cirugía oral. Por ello, el objetivo principal de esta tesis fue comparar la diferenciación osteogénica *In vitro* de DPSC sobre andamios construidos mediante impresión 3D y bioimpresión, utilizando alginato, gelatina, nanohidroxiapatita y L-PRF. La tesis se desarrolló en tres etapas. En la primera, se sintetizaron diversas biotintas, que fueron caracterizadas mediante análisis reológicos, de imprimibilidad y viabilidad celular. Las técnicas de impresión 3D y bioimpresión se realizaron con la impresora CellInk Inkredible, integrando las células con el material. La segunda etapa consistió en la caracterización físico-química y biológica de los andamios impresos, utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar su morfología, espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) para identificar grupos funcionales, pruebas de biodegradabilidad y evaluación de la biocompatibilidad. Finalmente, en la tercera etapa, se evaluó la diferenciación osteogénica mediante la expresión génica por RT-qPCR, la liberación de factores de crecimiento mediante LUMINEX y la proliferación celular con Ki-67 mediante inmunofluorescencia. Los resultados mostraron que las biotintas compuestas por alginato-gelatina-nanohidroxiapatita-L-PRF eran pseudoplásticas, con un porcentaje de recuperación del 80%, lo que las hizo idóneas para la impresión. El módulo de almacenamiento predominó sobre el módulo de pérdida y, en combinación con cloruro de calcio ($CaCl_2$), formaron un material resistente y adecuado para el crecimiento celular. Los análisis FT-IR identificaron grupos funcionales clave (-PO_4, -COO, -OH), confirmando el entrecruzamiento con

$CaCl_2$. La SEM reveló una fidelidad geométrica del 90%. Los andamios mostraron una degradación controlada, conservando más del 50% de su estructura a los 30 días, y un hinchamiento del 130% a las 24 horas, favoreciendo la diferenciación celular a los 14 días. Las pruebas de viabilidad celular mediante MTS confirmaron la ausencia de citotoxicidad, y el ensayo LIVE/DEAD mostró una alta viabilidad (>80%) tanto en andamios impresos en 3D como en bioimpresos. Además, los factores de crecimiento (PDGF-BB, FGF-B, EGF, VEGF-C y BMP-2) se liberaron hasta los 21 días y su actividad biológica fue confirmada mediante inmunohistoquímica con Ki-67, evidenciando su papel en la proliferación celular. El análisis de expresión génica por RT-PCR indicó una mayor expresión de genes osteogénicos en los andamios bioimpresos en comparación con los impresos en 3D y las células de pulpa sin diferenciar, incluyendo RUNX2, OSX, OPG, OPN, VEGF-β, TGF-β, BMP-2, COL1A1 y ALP, lo que sugirió una capacidad osteogénica superior en los andamios bioimpresos. En conclusión, este estudio desarrolló andamios de alginato-gelatina-nanohidroxiapatita-L-PRF mediante impresión 3D y bioimpresión, demostrando su biocompatibilidad, degradación controlada y capacidad para promover la osteogénesis de DPSC. Los andamios bioimpresos destacaron por su mayor viabilidad celular, subrayando el papel clave del L-PRF en la regeneración ósea, posicionándolos como una solución prometedora para aplicaciones clínicas en odontología regenerativa a futuro.

ABSTRACT

Bone loss in the oral cavity affects individuals' quality of life and can result from various systemic and local conditions. Although synthetic biomaterials and demineralized bone matrices are used in clinical treatments to replace lost tissue, their efficiency, cost, and osteogenic potential limitations have driven the development of tissue engineering as a promising alternative. This discipline employs three-dimensional biocompatible scaffolds combined with cells and growth factors to promote the formation of functional tissues. Various techniques have been explored to design an ideal scaffold to address tissue regeneration in the oral cavity. 3D printing and bioprinting have emerged as innovative technologies that allow the creation of bioinks for fabricating printed constructs using hydroxyapatite, chitosan, gelatin, and alginate, providing an environment conducive to cell adhesion and growth. These cells can be either injected or integrated into the material during printing. Among the growth factors studied to enhance cell growth and proliferation, leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) stands out. Similarly, human dental pulp stem cells (DPSCs) have shown great promise due to their differentiation potential, particularly towards the osteoblastic lineage for bone tissue formation. However, there is a lack of studies that integrate a biocompatible matrix, growth factors, and dental-derived stem cells with osteogenic properties for applications in oral surgery. Thus, the main objective of this study was to compare the in vitro osteogenic differentiation of DPSCs on scaffolds fabricated using 3D printing and bioprinting, employing alginate, gelatin, nanohydroxyapatite, and L-PRF. The project was developed in three stages. In the first stage, various bioinks were synthesized and characterized through rheological analysis, printability assessments, and cell viability tests. 3D printing and bioprinting techniques were performed using the CellInk Inkredible printer, integrating cells with the material. The second stage involved the physicochemical and biological characterization of the printed scaffolds, utilizing scanning electron microscopy (SEM) to analyze morphology, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) to identify functional groups, biodegradability tests, and biocompatibility evaluations. Finally, in the third stage, osteogenic differentiation was assessed through gene expression analysis via RT-qPCR, growth factor release using LUMINEX, and cell proliferation using Ki-67 immunofluorescence. The results showed that bioinks composed of alginate-gelatin-nanohydroxyapatite-L-PRF exhibited pseudoplastic behavior with an 80% recovery rate, making them suitable for printing. The storage modulus predominated over the loss modulus, and, in combination with calcium chloride ($CaCl_2$), they formed a robust material conducive to cell growth. FT-IR analyses identified key functional groups (-PO_4, -COO, -OH), confirming cross-linking with $CaCl_2$. SEM revealed a 90% geometric fidelity. The scaffolds exhibited controlled degradation, retaining over 50% of their structure at 30 days, and showed 130% swelling within 24 hours, favoring cell differentiation at 14 days. Cell viability assays using MTS confirmed the absence of cytotoxicity, and LIVE/DEAD assays demonstrated high viability (>80%) in both 3D-printed and bioprinted scaffolds. Additionally, growth factors (PDGF-BB, FGF-B, EGF, VEGF-C, and BMP-2) were released up to 21 days, and their biological activity was confirmed via immunohistochemistry using Ki-67,

evidencing their role in cell proliferation. Gene expression analysis by RT-PCR indicated higher osteogenic gene expression in bioprinted scaffolds compared to 3D-printed scaffolds and undifferentiated pulp cells, including RUNX2, OSX, OPG, OPN, VEGF-β, TGF-β, BMP-2, COL1A1, and ALP, suggesting superior osteogenic capacity in bioprinted scaffolds. In conclusion, this study developed alginate-gelatin-nanohydroxyapatite-L-PRF scaffolds using 3D printing and bioprinting, demonstrating their biocompatibility, controlled degradation, and ability to promote DPSC osteogenesis. The bioprinted scaffolds stood out for their higher cell viability, highlighting the key role of L-PRF in bone regeneration, positioning them as a promising solution for clinical applications in regenerative dentistry.

1. INTRODUCCIÓN

Diversas condiciones sistémicas y locales pueden llevar a la pérdida del tejido óseo del proceso alveolar, incluyendo las secuelas que genera la enfermedad periodontal, el cáncer oral y el trauma local. La pérdida del hueso alveolar que constituye uno de los tejidos de soporte de los dientes, puede llevar incluso a su pérdida, afectando la función masticatoria y el bienestar psicológico de los pacientes (Hasmun et al., 2020).

Entre las principales consecuencias del desarrollo progresivo de la enfermedad periodontal se encuentra el edentulismo o pérdida total de dientes (Y. Liu et al., 2022). Para abordar este problema, se han implementado diferentes tratamientos, tanto quirúrgicos como no quirúrgicos, con el objetivo de reparar o regenerar el tejido periodontal dañado y evitar la pérdida de piezas dentales (Swanson et al., 2022). En el ámbito clínico, se han empleado biomateriales como matrices desmineralizadas de hueso y otros materiales sintéticos. Sin embargo, su eficacia está limitada por su capacidad osteoconductora, que facilita el crecimiento óseo sobre una superficie existente, pero carecen de propiedades osteoinductoras, esenciales para estimular la diferenciación de células madre en osteoblastos y promover activamente la formación de hueso (Al-Moraissi et al., 2020; Y. Liu et al., 2022).

La medicina regenerativa se presenta como una alternativa prometedora para la regeneración ósea, mediante el uso de matrices tridimensionales, células y factores de crecimiento o diferenciación (Abdollahiyan et al., 2021; Guller & Igrunkova, 2022). Las tecnologías de ingeniería de tejidos implican la morfogénesis de nuevos tejidos utilizando construcciones formadas por células aisladas y factores de crecimiento estimulantes dentro de un andamio biocompatible (Fernandes & Yang, 2016; Lauritano et al., 2020).

Recientemente, han surgido tecnologías innovadoras como la impresión tridimensional (3D) asistida por láser, la cual ha permitido avances significativos en la fabricación de andamios. No obstante, esta técnica presenta limitaciones en cuanto a la siembra y la distribución homogénea de las células dentro del andamio (Mobaraki et al., 2020; Muskan et al., 2022). La bioimpresión 3D se plantea como una solución prometedora, debido a que permite la impresión simultánea de células y del material del andamio. No obstante, este enfoque enfrenta desafíos, como la posible disminución de la viabilidad celular durante el proceso de extrusión, debido a la presión ejercida durante la bioimpresión (Lauritano et al., 2020; Piard et al., 2015).

Para abordar esta problemática, se ha propuesto encapsular las células en hidrogeles, lo que permite protegerlas y mantenerlas en un ambiente favorable, evitando el esfuerzo cortante no deseado que puede afectar la viabilidad durante la bioimpresión. Ejemplos de hidrogeles utilizados para este fin incluyen fibrina, alginato y metacrilato de gelatina (GelMA) (Kanwar & Vijayavenkataraman, 2021).

Los polímeros como el alginato, colágeno, gelatina y quitosano son destacados como materiales ampliamente utilizados en la formulación de biotintas debido a su versatilidad y biocompatibilidad. No obstante, su limitada resistencia mecánica representa un desafío. En contraste, los materiales inorgánicos, como la nanohidroxiapatita, el fosfato tricálcico, el fosfato bifásico y el vidrio bioactivo, ofrecen propiedades mecánicas superiores (Ausenda et al., 2019; Iviglia et al., 2019). La combinación de polímeros con materiales cerámicos resulta esencial para potenciar la capacidad de regeneración ósea. No obstante, aunque estas mezclas se asemejen a la composición del tejido original, no logran reproducir completamente sus propiedades funcionales. Por ello, es crucial explorar nuevas formulaciones que integren materiales innovadores y factores de crecimiento, orientadas a promover una regeneración ósea efectiva y funcional (Liang et al., 2020).

Los andamios actúan como matrices artificiales que proporcionan el soporte necesario para la proliferación celular y la conservación de sus funciones diferenciadas (Y. Zhang et al., 2020). El uso de concentrados plaquetarios, como el plasma rico en plaquetas (PRP) y la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF), ha demostrado mejorar la adhesión y la biocompatibilidad de estos andamios, siendo ampliamente utilizados en la regeneración de tejidos (Crisci et al., 2018). El L-PRF, como material autólogo, aporta una gran cantidad de factores de crecimiento y citocinas (Ulusoy et al., 2019) y se ha utilizado con éxito en la regeneración periodontal, solo o en combinación con otros biomateriales para acelerar la regeneración ósea (Dragonas et al., 2019). Varios estudios han demostrado que los biomateriales que contienen factores de crecimiento pueden mostrar mayor osteoconductividad y biocompatibilidad (Baca-Gonzalez et al., 2022; Bhattacharya et al., 2020; Xue et al., 2021).

En la última década, las células troncales y estromales mesenquimales han sido empleadas en la regeneración ósea debido a su potencial para diferenciarse, especialmente hacia un linaje osteogénico, lo cual es crucial en el proceso de formación de tejido óseo. Estas células también influyen en el destino de otras células a través del proceso de señalización paracrina, proporcionando un entorno osteoinductor y osteoconductor para la diferenciación de las células circundantes (Mosaddad et al., 2022).

Por lo anterior, el objetivo de esta tesis es comparar la diferenciación osteogénica *In vitro* de células madre de la pulpa dental humana (DPSC) en un andamio generado mediante impresión 3D (sin células) y en un andamio bioimpreso con células. Ambos andamios estarán compuestos por una biotinta optimizada que incluye alginato, gelatina, nanohidroxiapatita, modificada con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF), para su potencial uso en la cavidad oral. Estos materiales serán caracterizados física y biológicamente para evaluar su potencial implementación en la regeneración del tejido óseo en la cavidad oral.

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

El hueso está compuesto por una matriz orgánica compuesta por colágeno tipo I, proteínas no colágenas y una matriz inorgánica de nanohidroxiapatita (Reynolds et al., 2010). Es un tejido dinámico en constante remodelación, manteniendo un equilibrio dinámico de formación y reabsorción. En la cavidad oral, el tejido óseo hace parte de los tejidos de soporte de los dientes, presentando características histológicas particulares como su mayor recambio celular e interacción permanente con el ligamento periodontal que es un reservorio de células pluripotenciales que pueden diferenciarse para la homeóstasis de los diferentes tejidos de soporte de los dientes como lo son precursores de fibroblastos, cementoblastos del cemento radicular y osteoblastos del hueso alveolar (Hathaway-Schrader & Novince, 2021). El complejo dentoalveolar desempeña un papel crucial en el movimiento dental ortodóncico y en la homeostasis del aparato de soporte dental, los cuales son alterados en situaciones clínicas como extracciones dentales traumáticas, enfermedad periodontal y cáncer oral, entre otros (Gugliandolo et al., 2021).

La capacidad innata de cicatrización o regeneración del tejido óseo puede verse drásticamente reducida o inhibida, dependiendo de la naturaleza, extensión y profundidad de la lesión que lo afecte (Loi et al., 2016). El uso de injertos autólogos para el tratamiento de defectos óseos continúa siendo el tratamiento de elección; pero, estos injertos presentan importantes desventajas como una fuente limitada de tejido, incremento de la morbilidad en el sitio donante, la necesidad de un segundo sitio quirúrgico y el riesgo de una respuesta inmunitaria exacerbada (Heo et al., 2016).

La bioingeniería de tejidos óseos ha surgido como una alternativa prometedora para superar estos desafíos, mediante la creación de constructos que incluyen: (a) andamios compuestos por biomateriales que imitan las propiedades de la matriz extracelular del tejido óseo (Koons et al., 2020), (b) moléculas bioactivas, como factores de crecimiento, que modulan las actividades biológicas asociadas a la regeneración tisular como la migración, proliferación, diferenciación celular y angiogénesis y (c) células madre o estromales mesenquimales, capaces de diferenciarse y permitir la formación del nuevo tejido. La adecuada interacción entre estos tres factores es fundamental para lograr la regeneración ósea (Buyuksungur et al., 2021; Patel et al., 2011).

Para la obtención de los andamios que imitan la matriz extracelular, se emplean técnicas convencionales como fundición con disolventes, lixiviación de partículas, formación de espuma con gas y electrohilado (Chocholata et al., 2019). A pesar de lo anterior, estas técnicas presentan limitaciones en la reproducibilidad de parámetros clave como la forma geométrica, el tamaño e interconectividad de los poros y la arquitectura interna, esenciales para su aplicación en regeneración ósea (Nyberg et al., 2017). En respuesta a estas limitaciones, se ha propuesto más recientemente la impresión 3D, una técnica de fabricación aditiva que, mediante sistemas de diseño y

fabricación asistidos por computadora (CAD/CAM), permite construir estructuras complejas capa por capa utilizando materiales bioestables o biodegradables (Prem Ananth & Jayram, 2024). No obstante, esta técnica requiere de la siembra celular sobre los andamios ya sintetizados, generando una baja eficiencia de siembra y distribución heterogénea de las células dentro del andamio, lo que constituye una limitación.

Con el avance de las tecnologías de impresión 3D, es posible imprimir células junto con el material del andamio en un proceso llamado bioimpresión 3D, el cual permite la distribución homogénea de las células en el andamio y la capacidad de posicionar distintos tipos celulares en ubicaciones específicas dentro de la misma estructura (Piard et al., 2015). Durante la bioimpresión, las células están inmersas en un material conocido como biotinta, generalmente compuesto por hidrogeles que las protegen del estrés mecánico y los daños ocasionados por la presión durante el proceso de extrusión (Boularaoui et al., 2020).

Los hidrogeles son redes tridimensionales altamente hidratadas que mantienen su integridad estructural en agua, proporcionando un entorno propicio para el crecimiento y proliferación celular y reduciendo el riesgo de inflamación o respuestas adversas tras la implantación gracias a su biocompatibilidad y capacidad para minimizar la interacción con el sistema inmune del huésped (Zhu & Marchant, 2011). Por ello, es esencial diseñar andamios con biomateriales biocompatibles que no solo protejan a las células durante la extrusión, sino que también favorezcan los procesos biológicos asociados a la regeneración tisular (Zamani et al., 2021).

El alginato de sodio es un hidrogel, ampliamente utilizado para la bioimpresión debido a su biocompatibilidad y capacidad para gelificar rápidamente en presencia de iones divalentes como el calcio, lo que facilita la creación de estructuras estables y altamente hidratadas, propicias para mantener la viabilidad celular (Hernández-González, Téllez-Jurado, & Rodríguez-Lorenzo, 2020a; Rodríguez-Lorenzo et al., 2012). No obstante, su naturaleza inerte no permite estimular las actividades biológicas asociadas a la regeneración como la adhesión y proliferación celular, por lo que suele combinarse con otros biomateriales.

La adición de nanohidroxiapatita (nHA) ha demostrado mejorar significativamente la proliferación celular y las propiedades mecánicas de los andamios, debido a que la nHA imita la matriz inorgánica del tejido óseo, promoviendo la osteoconductividad (Rajula et al., 2021; R. Zhao et al., 2024). Otro hidrogel utilizado en andamios para regeneración tisular es la gelatina, que contribuye a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares y mejora la interacción con la nHA, lo que incrementa la estabilidad estructural del andamio y facilita la adhesión celular (Ma et al., 2021; E. Wu et al., 2024).

Para lograr una estrategia exitosa de regeneración ósea se requiere el uso de biomoléculas bioactivas. En particular, la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF)

un concentrado plaquetario usado en diferentes procedimientos clínicos odontológicos es una fuente abundante de factores de crecimiento y citocinas, que no solo favorecen la proliferación y diferenciación celular, sino que también estimulan la angiogénesis y la regeneración tisular (Farmani et al., 2021). Recientemente, se ha reportado en una revisión sistemática que el uso de L-PRF mejora significativamente los resultados clínicos del tratamiento de defectos intraóseos que se presentan como secuelas de la enfermedad periodontal (Miron et al., 2024). Por lo tanto, el uso de L-PRF en los andamios usados para regeneración tisular es una fuente de biomoléculas, incluidos factores de crecimiento que pueden estimular y modular las actividades biológicas celulares involucradas en este proceso.

Finalmente, el uso de células madre y/o estromales mesenquimales, ha sido ampliamente estudiados en estrategias basadas en regeneración tisular por su capacidad de proliferación y diferenciación, desempeñando un papel fundamental en la formación de nuevo tejido (Shang et al., 2021). Las primeras células madre dentales identificadas fueron las células madre de pulpa dental humana (DPSC) (Gronthos et al., 2002). Estas DPSC son una fuente accesible y abundante de células, obtenidas a partir de pulpas de terceros molares o dientes supernumerarios humanos extraídos (Citterio et al., 2020; Tsutsui, 2020). Estas DPSC tienen la capacidad de diferenciarse hacia linaje óseo *In vitro* e *In vivo* favoreciendo la formación de hueso nuevo, lo que permite su uso para regeneración ósea basada en bioingeniería de tejidos (Amghar-Maach et al., 2019).

Actualmente, existen pocos estudios que incluyan constructos impresos que cuenten con los tres componentes necesarios requeridos en la bioingeniería de tejidos, como son una matriz biocompatible, moléculas bioactivas y células mesenquimales de origen dental con propiedades osteogénicas para su potencial uso clínico en odontología y que permitan favorecer los procesos regenerativos que incluyen la angiogénesis, la adhesión, migración proliferación y diferenciación celular (de Melo et al., 2020).

Previamente, nuestro grupo de investigación sintetizó andamios tipo hidrogel que contenían nanohidroxiapatita, quitosano, gelatina y/o alginato modificado o no con PRF liofilizado, como lo han propuesto otros autores (Maji et al., 2015), demostrando que la combinación de estos polímeros naturales y el uso de DPSC fueron biocompatibles y se observó presencia de poros interconectados con tamaños en el rango de 100 a 250 micras. De este estudio se dedujo, que el andamio compuesto de nanohidroxiapatita, gelatina, alginato y PRF mostró las mejores características físicas y biológicas prometedoras para la regeneración ósea (Anaya-Sampayo et al., 2024); sin embargo, con el proceso de liofilización, no fue posible lograr poros y una distribución celular homogénea.

Por lo tanto, en la presente tesis se propone, construir andamios impresos en 3D y bioimpresos con una biotinta de alginato, gelatina, nanohidroxiapatita y L-PRF y

evaluar la diferenciación osteogénica *In vitro* de células madre de pulpa dental para su uso en regeneración ósea con futuras aplicaciones clínicas, superando la limitación presentada en los estudios previos.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de un andamio generado mediante impresión 3D comparado con un andamio bioimpreso compuesto de alginato, gelatina, nanohidroxiapatita, suplementados con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) en la diferenciación osteogénica *In vitro* de células madre de pulpa dental humana?

4.1. Regeneración ósea en la cavidad oral

La pérdida ósea en la cavidad oral se genera por diversas injurias, que incluyen extracciones dentales, traumatismos orales y patologías locales y sistémicas, siendo la periodontitis la más prevalente (Becerra-Ruiz et al., 2022). Esta enfermedad afecta tanto al hueso alveolar como a los tejidos de soporte de los dientes (Chatzopoulos et al., 2024). La terapia periodontal pretende controlar y estimular la reparación de las estructuras afectadas por la enfermedad. Sin embargo, la regeneración completa de los tejidos perdidos sigue siendo un desafío sin resolver (Vaquette et al., 2019). En la práctica odontológica, el tratamiento de elección para la pérdida de tejido óseo siendo el uso de injertos autólogos de donantes vivos o incluso de cadáveres o de materiales de relleno óseo, a pesar de las desventajas asociadas, como el riesgo de infecciones y el rechazo del injerto (Matichescu et al., 2020). En este contexto, la medicina regenerativa ha surgido como una alternativa prometedora, enfocándose en la regeneración, reparación o sustitución de tejidos mediante la ingeniería de tejidos (Tatullo et al., 2019).

La complejidad e interacción permanente de los tejidos de soporte del diente otorga al periodonto una capacidad limitada de regeneración. No obstante, se han desarrollado técnicas quirúrgicas y el uso de biológicos, entre estos factores de crecimiento, proteínas derivadas del esmalte y L-PRF junto con biomateriales de relleno óseo para estimular la regeneración de los tejidos periodontales perdidos, incluyendo la formación de hueso (Chen & Jin, 2010). No obstante, la capacidad de regeneración de estos tejidos es muy limitada y una vez perdidos, no existe ningún tratamiento que permita su completa regeneración (Rojas et al., 2019).

Investigaciones recientes han dado lugar a nuevas estrategias para mejorar la regeneración y reparación eficiente del tejido periodontal. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de nuevos materiales, factores de crecimiento y la utilización de células, impulsando la ingeniería de tejidos en la regeneración periodontal (Vaquette et al., 2019). Aunque los eventos que ocurren durante el proceso de curación no se comprenden completamente, se sabe que las células progenitoras deben migrar y adherirse a la superficie radicular del diente para luego proliferar y diferenciarse en las estructuras que contribuyen a la regeneración del periodonto. Además, la evidencia científica ha demostrado que proporcionar una estructura tridimensional (3D) en el defecto óseo puede mejorar el proceso de curación y regeneración tisular (Nibali et al., 2021; Seciu et al., 2019).

A pesar de los avances en la ingeniería de tejidos, persisten desafíos importantes en la obtención de células y la modificación de biomateriales, lo que requiere soluciones

innovadoras. La ingeniería de tejidos está proporcionando herramientas valiosas para el tratamiento de defectos periodontales (Raveau & Jordana, 2020). Un injerto óseo, que es un material implantado, idealmente debería promover la reparación ósea mediante los mecanismos de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, ya sea solo o en combinación con otros materiales (Gong et al., 2015). La selección adecuada del injerto óseo depende de múltiples factores, como el tamaño del defecto, las propiedades biomecánicas, el manejo del injerto y la viabilidad del tejido, entre otros (Sheikh et al., 2017). Existen cuatro categorías principales de materiales para injertos óseos: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y sustitutos de injertos óseos (Sheikh et al., 2017).

Más crucial aún, es necesario considerar cuatro características fundamentales para la selección de materiales de injerto: (1) Osteogénesis, que es la capacidad de generar nuevo tejido óseo a partir de osteoblastos diferenciados provenientes de células osteoprogenitoras (Infante & Rodríguez, 2018); (2) Osteoinductividad, la capacidad del material de injerto para promover la producción de células formadoras de hueso (Di Martino et al., 2011); (3) Osteoconductividad, donde el injerto actúa como un andamio que guía el crecimiento del nuevo hueso (Pugliese et al., 2021); y (4) Osteointegración, la habilidad de unirse directamente al tejido óseo circundante sin la formación de tejido fibroso intermedio, lo que es esencial para lograr una regeneración ósea exitosa (Q. Zhang et al., 2021a).

Hoy en día se emplean diversos tipos de materiales para tratar defectos óseos. Los autoinjertos son trasplantes de tejido óseo, ya sea esponjoso o cortical, que se extraen de una parte del cuerpo y se implantan en otra del mismo individuo (Baldwin et al., 2019). Se ha demostrado que los autoinjertos frescos contienen células viables y factores osteoinductores como BMP-2, BMP-7, FGF, IGF y PDGF. Además, al no presentar inmunogenicidad ni riesgo de transmisión viral y al mantener la viabilidad celular inmediatamente después del trasplante, los autoinjertos son considerados el material de injerto óseo más eficaz disponible (Titsinides et al., 2019).

No obstante, la necesidad de una cirugía adicional para obtener los autoinjertos presenta limitaciones como mayor dolor, morbilidad, complicaciones en el sitio donante, fracturas patológicas y defectos óseos masivos (Janicki & Schmidmaier, 2011). Por estas razones, se han explorado otros materiales para superar estos inconvenientes, siendo los aloinjertos una opción común. Los aloinjertos consisten en tejido óseo obtenido de un donante y trasplantado a otro individuo de la misma especie (Baldwin et al., 2019). Estos pueden estar formados por hueso cortical, esponjoso o una combinación de ambos y se utilizan en formas fragmentadas o estructurales (Benlidayi et al., 2018).

Aunque los aloinjertos se obtienen de donantes vivos o cadáveres y están disponibles comercialmente, presentan ciertas desventajas, como la falta de células viables, lo que disminuye su potencial osteogénico. Además, existe el riesgo de transmisión de

infecciones bacterianas y enfermedades virales, como VIH y hepatitis B y C, una menor tasa de curación y la posibilidad de provocar reacciones inmunológicas (Olesen et al., 2015; Oryan et al., 2013). Actualmente, los biomateriales osteoconductores más utilizado en la clínica son los xenoinjertos bovinos de uso comercial, es decir permiten que se forme tejido a través de ellos, pero no estimulan su formación de novo (Alqahtani, 2023).

Para superar estas limitaciones, se han investigado sustitutos de injertos óseos, que consisten en andamios tisulares fabricados a partir de materiales naturales como colágeno, quitosano, alginato, elastina y celulosa, así como materiales sintéticos, incluidos fosfatos mono, bi y tricálcicos, como la nanohidroxiapatita (nHA), fosfato β-tricálcico (β-TCP) y cementos de fosfato de calcio, junto con vitrocerámicas (Bose et al., 2012; Donnaloja et al., 2020). Estos materiales tienen la capacidad de estimular procesos clave como la proliferación, migración y diferenciación de células óseas necesarias para la regeneración (Abbasi et al., 2020).

4.2. Ingeniería de tejidos y tejido óseo

La ingeniería de tejidos es un área de la biomedicina que tiene un enfoque interdisciplinario que combina el uso de células, factores de crecimiento y biomateriales para restaurar la funcionalidad de los tejidos dañados o perdidos, incluyendo al tejido óseo. (Koons et al., 2020). Dentro de este campo, la construcción de andamios que den el soporte para la formación del nuevo tejido es fundamental, ya que estas estructuras tridimensionales (3D) actúan como una matriz tridimensional que permite la adhesión celular y otras actividades biológicas necesarias para la formación de tejido óseo (Preethi Soundarya et al., 2018). Para evaluar el desempeño de los andamios, se consideran diversos criterios como la porosidad y el tamaño de los poros, la resistencia mecánica y la biocompatibilidad, todos ellos destinados a fomentar la adhesión celular y la angiogénesis (Bose et al., 2012).

Actualmente, se utilizan varios métodos para la fabricación de andamios óseos porosos, como la liofilización y la difusión de solventes, entre otros (Haleem et al., 2020). A continuación, se describen estos métodos junto con sus ventajas y limitaciones:

Tabla 1. Métodos utilizados para la obtención de andamios.

Técnica	Ventajas	Limitaciones	Referencia
Gas-Foaming	Método simple y de bajo costo, no requiere uso de solventes.	Baja interconectividad en poros superficiales, las estructuras obtenidas tienen poros cerrados.	(Han et al., 2021)

Separación de fases inducidas térmicamente	Propiedades como: morfología, bioactividad y velocidad de degradación son fácilmente controlables.	Debido al tamaño de poros obtenidos (10-100 micras) no es adecuado para tejido óseo, usar solventes para generación de fase líquido-líquido.	(Preethi Soundarya et al., 2018)
Electrospinning	Tienen una alta porosidad y gran superficie. Excelente similitud a las fibras de colágeno y a la matriz extracelular	Requiere de un equipo especial para lograr el hilo, mejor desempeño y resultado en ambientes controlados con temperaturas y humedades específicas.	(Qasim et al., 2019)
Biorreactor	Facilita la perfusión directa del medio de cultivo, se imitan las condiciones fisiológicas durante el cultivo.	Técnica costosa, requiere insumos y factores de crecimiento precisos.	(Chocholata et al., 2019)
Modelado por deposición fundida	Alta porosidad, completa interconectividad de poros, posibilidad de controlar tamaño de poros, control de forma macro, buena resistencia a la compresión, libre de solvente.	Altas temperaturas en proceso, rango limitado de materiales a usar, inconsistencia en poros.	(Chocholata et al., 2019)
Sinterización por láser selectiva	Obtención de estructuras complejas, posibilidad de controlar porosidad y tamaño de poros, amplia gama de materiales en polvo, libre de solventes.	Altas temperaturas en proceso, solo se pueden usar polímeros térmicamente estables, limitado para tamaño de poros pequeños.	(Chocholata et al., 2019)
Sinterización de microesferas	Excelentes propiedades mecánicas.	Baja interconectividad y porosidad, temperatura y tiempo de sinterización, uso de solventes.	(Shi et al., 2011)

Criolitografía	Alta rigidez a la compresión, alta viabilidad celular.	Resolución limitada, materiales limitados para la técnica.	(Ukpai et al., 2019)
Electro hidrodinámico	Alta resolución, proceso de inyección continuo, biotintas de alta viscosidad (hasta 20% w/v).	Usa altos voltajes, puede haber daño celular en la biotinta debido al voltaje.	(Altun et al., 2019)
Magnetoforésis	Altas densidades celulares.	Efectos a largo plazo sobre salud celular debido a fluidos ferromagnéticos.	(Tocchio et al., 2018)

Las metodologías convencionales han permitido avances significativos en la obtención de andamios para la ingeniería de tejidos óseos, pero presentan limitaciones, como la variabilidad en la forma y distribución de los poros, además de una interconectividad deficiente (Buenzli et al., 2020). En respuesta a estos desafíos, la fabricación aditiva ha surgido como un enfoque innovador que ofrece un control superior sobre estas características, mejorando la reproducibilidad y escalabilidad de los andamios, como es el caso de la impresión 3D (Jia et al., 2016). Tecnologías como la impresión 3D, la fabricación sólida de forma libre (SFF) y la creación rápida de prototipos permiten producir estructuras complejas directamente a partir de diseños asistidos por computadora, lo que amplía las posibilidades de personalización y precisión en el diseño de los andamios (Bose et al., 2012).

El uso de la impresión 3D ha demostrado mejoras en los resultados clínicos, especialmente cuando se utilizan materiales optimizados (Sigron et al., 2020). Investigaciones recientes han explorado diferentes geometrías que fomentan la proliferación de células madre mesenquimales humanas (hMSC) y su diferenciación hacia líneas condrogénicas, destacando la capacidad de la impresión 3D para crear estructuras adecuadas para la regeneración ósea y la diferenciación celular dirigida (Aliabouzar et al., 2018)

En la impresión 3D, los materiales y células se depositan en ubicaciones específicas para formar estructuras tridimensionales, lo que permite crear andamios porosos con una precisión notable y un control riguroso sobre su geometría (Su et al., 2021). Las tecnologías de fabricación aditiva permiten construir estructuras capa por capa sin necesidad de herramientas o moldes específicos, lo que facilita la creación de diseños complejos y altamente personalizados (Mitra et al., 2021). Estas técnicas se dividen en cuatro categorías principales: (a) extrusión (deformación + solidificación), (b) polimerización, (c) sinterización asistida por láser y (d) procesos basados en escritura directa (Tabla 2).

En la ingeniería de tejido óseo, es fundamental considerar la interacción de tres pilares esenciales: (i) los andamios, que están formados por biomateriales diseñados para facilitar la diferenciación y proliferación celular, replicando las características de la matriz extracelular (Ojansivu et al., 2019); (ii) los factores de crecimiento y señales, que son cruciales para promover y mejorar las funciones celulares; y (iii) las células, que incluyen células madre y células progenitoras (Borrelli et al., 2020). Esta sinergia entre los andamios, los factores de señalización y las células es vital para lograr una regeneración ósea exitosa.

Tabla 2. Técnicas para la fabricación de andamios óseos, incluyendo sus ventajas y desventajas.

Técnica	Ventajas	Desventajas	Referencias
3D Plotting/ink writing	• Permite el trazado de fármacos y biomoléculas (proteínas y células vivas) en condiciones leves.	• El calentamiento o procesamiento posterior de algunos materiales restringe la incorporación de biomoléculas.	(Ahlfeld et al., 2019)
Bioimpresión asistida por láser	• Aplicable a materiales orgánicos, inorgánicos y células. • Control cuantitativo del proceso.	• Se necesitan cintas homogéneas	(Moroni et al., 2018)
SLS (Sinterización Selectiva por Láser)	• No necesita soporte • No se necesita un tratamiento posterior.	• La resolución depende del diámetro del rayo láser	(Castilho et al., 2020)
SLA (Estereolitografía)	• Permite la obtención de estructuras muy complejas. • Posibilidad de añadir factores de crecimiento, proteínas y células.	• Aplicable sólo a fotopolímeros.	(Van Hoorick et al., 2019)
FDM (Modelado por Deposición Fundida)	• No necesita plataforma o soporte.	• Restricciones en los materiales debido a la necesidad de una fase fundida.	(Turnbull et al., 2018)
EXTRUSIÓN	• Permite una buena reproducibilidad y control del flujo de material. • Ideal para la fabricación de estructuras porosas.	• Puede ser limitado por la viscosidad del material y la velocidad de extrusión.	(Boularaoui et al., 2020)

4.2.1. Biotintas utilizadas en impresión 3D para la fabricación de andamios

Los andamios se fabrican para imitar las funciones de la matriz extracelular y suelen estar constituidos por matrices poliméricas biocompatibles, como hidrogeles, poliésteres y cerámicas (Nicolas et al., 2020). Se ha demostrado que la aplicación de hidrogeles en biotintas es adecuada para aplicaciones biomédicas, debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta hidrofilicidad, permeabilidad, métodos de fabricación sencillos y su capacidad para soportar y mantener células vivas (Fuchs et al., 2020).

En el ámbito de la bioimpresión 3D, se utilizan biotintas para desarrollar tejidos y órganos con el uso de andamios (cell-scaffolds), donde la biotinta está compuesta por biomateriales junto con células vivas. En este caso, el biomaterial se degrada con el tiempo, permitiendo que las células encapsuladas crezcan y ocupen el espacio, formando así las estructuras prediseñadas (Gopinathan & Noh, 2018).

En un enfoque basado en andamios celulares (cell-scaffolds), la formulación ideal de biotintas debe cumplir con ciertos requisitos biológicos y de biomateriales. A continuación, se presentan las características necesarias para la aplicación de biotintas en ingeniería de tejidos:

a. **Imprimibilidad**: Las biotintas deben tener un rango de viscosidad adecuado y una rápida cinética de transición del estado líquido a gel (M. H. Kim et al., 2019). En la bioimpresión por extrusión, se espera que las biotintas sean líquidos extruibles en un flujo laminar, manteniendo suficiente resistencia mecánica para autosoportarse en múltiples capas, con geometría y porosidad controladas (Gillispie et al., 2020).

b. **Biocompatibilidad**: El andamio no debe provocar reacciones adversas y debe fomentar activamente la adhesión y proliferación de osteoblastos. Esto facilita la formación de una matriz extracelular en la superficie y los poros del andamio, induciendo gradualmente el desarrollo de nuevo tejido óseo (Bedell et al., 2020). Además, el microambiente dentro del andamio debe promover la angiogénesis, lo que proporciona condiciones favorables para el transporte de nutrientes, oxígeno y eliminación de desechos (Wu et al., 2021).

c. **Biodegradabilidad**: Se espera que el andamio impreso se degrade *In vivo* durante un tiempo determinado. Idealmente, la tasa de degradación de los andamios debe coincidir con la tasa de producción de la matriz extracelular y los productos de degradación no deben tener efectos adversos en el huésped (Hospodiuk et al., 2017).

d. **Características de la superficie**: La interacción entre el andamio y el tejido a reparar es crucial para el éxito de la regeneración, debido a que se producen numerosas reacciones e interacciones. Por lo tanto, es importante prestar atención a las características de la superficie del andamio, como la porosidad y la morfología. Por ejemplo, el diámetro de los poros interconectados debe ser de al menos 100 µm para permitir la difusión de nutrientes y oxígeno, esenciales para la supervivencia celular, así como la eliminación de desechos (Auger et al., 2013).

Las propiedades de la biotinta y el andamio resultante no son independientes en ninguna etapa del proceso. Desde la biotinta en su estado líquido hasta el andamio construido y, finalmente, el implante funcional; estas características están interrelacionadas y pueden influirse mutuamente a lo largo de transformaciones físicas y químicas. Por lo tanto, comprender estas propiedades es crucial para asegurar una implementación exitosa (Li et al., 2021).

En este contexto, la reología desempeña un papel fundamental en la bioimpresión y el diseño de biotintas. La reología se refiere al estudio del flujo y deformación de materiales, y es especialmente relevante para garantizar que las biotintas se comporten adecuadamente durante el proceso de impresión (Paxton et al., 2017; Sonnleitner et al., 2021). A continuación, se presentan algunas de las caracterizaciones reológicas más importantes a considerar en el desarrollo de biotintas:

1. **Estrés de cizallamiento vs. Viscosidad**: Esta relación describe cómo la viscosidad de la biotinta varía con el estrés de cizallamiento aplicado. Es esencial que las biotintas tengan una viscosidad adecuada para ser extruidas con facilidad durante el proceso de impresión, manteniendo al mismo tiempo suficiente resistencia para soportar la forma del andamio tras la deposición (Chopin-Doroteo et al., 2021; Paxton et al., 2017).

2. **Pruebas de recuperación**: Estas pruebas evalúan la capacidad de la biotinta para recuperar su estructura inicial después de haber sido sometida a un esfuerzo de cizallamiento. Un buen rendimiento en estas pruebas indica que la biotinta puede soportar el proceso de impresión sin comprometer su integridad estructural (Sonnleitner et al., 2021).

3. **Barrido de frecuencia (Frequency sweep)**: Este análisis permite evaluar cómo la viscosidad y el módulo elástico de la biotinta cambian en función de la frecuencia del esfuerzo aplicado. Esta caracterización es fundamental para entender el comportamiento de la biotinta bajo diferentes condiciones de impresión y determinar su idoneidad para formar un andamio sólido y funcional (Paxton et al., 2017).

Al considerar estas caracterizaciones reológicas, se puede optimizar el diseño de biotintas para asegurar su funcionalidad en la bioimpresión, facilitando la creación de andamios que imiten adecuadamente las propiedades de la matriz extracelular y promuevan la regeneración del tejido óseo.

Existen diferentes biomateriales utilizados en biotintas, entre los cuales las cerámicas y polímeros, o la mezcla entre ambos, son los más comunes (Abdulghani & Mitchell, 2019). Las cerámicas más utilizadas son los fosfatos de calcio, sulfatos de calcio y vidrios bioactivos. Mientras que los polímeros pueden ser naturales, como los polisacáridos, o sintéticos, como el ácido poliláctico (Koons et al., 2020). A continuación, se presentan algunos:

I. Polímeros.

Los polímeros son materiales orgánicos compuestos por subunidades repetidas, conocidas como monómeros, unidas entre sí mediante enlaces covalentes y que contienen principalmente átomos de carbono (Pugliese et al., 2021). Estos materiales son versátiles y han demostrado ser tanto biocompatibles como biodegradables, con la capacidad de modificar sus propiedades mecánicas al alterar su estructura química. Por ejemplo, pueden presentarse como un polímero de hidrogel, muy viscoso, o ser más rígidos para producir andamios más resistentes, como la policaprolactona (PCL) (Pugliese et al., 2021).

Los materiales poliméricos pueden clasificarse en naturales o sintéticos. Los polímeros naturales incluyen proteínas como la seda, gelatina y colágeno, así como polisacáridos como alginato, agarosa y quitosano. Los polímeros de polisacáridos ofrecen una antigenicidad más baja, pero sus propiedades mecánicas son generalmente inferiores a las de los polímeros de proteínas (Tiwari et al., 2018). Por otro lado, los polihidroxiácidos son polímeros sintéticos, como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico-glicólico (PLGA). Estos polímeros son eficaces en la producción de andamios porosos, pero se biodegradan tras la implantación, generando ácido láctico y dióxido de carbono. Aunque estos subproductos pueden eliminarse fácilmente del cuerpo, su producción simultánea genera un ambiente ácido que puede favorecer la inflamación en lugar de la cicatrización (Jin et al., 2021).

a) Gelatina

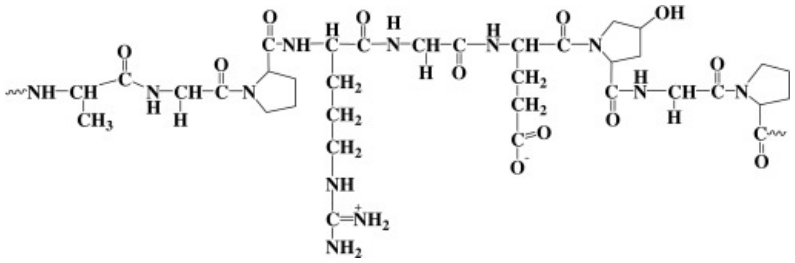


Figura 1. Estructura química de la gelatina. Figura tomada de (Deshmukh et al., 2017).

La gelatina es un tipo de proteína obtenida a partir de la hidrólisis parcial del colágeno nativo y según el proceso utilizado, se puede clasificar en dos tipos: tipo A, que se produce mediante hidrólisis ácida y tipo B, que resulta de la hidrólisis alcalina (Asim et al., 2023). Este material presenta propiedades interesantes, como su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Además, al ser un producto desnaturalizado, la gelatina tiene una menor antigenicidad en comparación con el colágeno. Esto se debe a que el tropocolágeno de triple hélice se descompone en cadenas simples de diferente peso molecular, dependiendo de factores como la temperatura, el pH y el tiempo durante el proceso de extracción. Esta desnaturalización reduce la formación de radicales aromáticos, lo que contribuye a que la gelatina sea menos antigénica (Asim et al., 2023).

La gelatina ofrece numerosas ventajas que la convierten en un material ideal para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos, incluyendo su biocompatibilidad y biodegradabilidad, naturaleza elástica, rentabilidad y disponibilidad en comparación con el colágeno, menor antigenicidad, y la presencia de secuencias de arginina-glicina-aspártico (RGD) que mejoran la adhesión celular mediada por integrinas. Además, sus grupos funcionales accesibles permiten modificaciones químicas que pueden optimizar sus propiedades para aplicaciones específicas (Gautam et al., 2021).

***Tabla 3. Composición de aminoácidos de la gelatina de piel de cerdo a partir de resultados de** (Farris et al., 2010).*

Aminoácido	Porcentaje	Aminoácido	Porcentaje
Glicina	32.20	Treonina	1.80
Prolina	13.10	Fenilalanina	1.38
Alanina	11.05	Isoleucina	1.02
Hidroxiprolina	9.80	Hidroxilisina	0.75
Glutamato	7.10	Asparagina	0.60
Arginina	4.96	Histidina	0.45
Ácido aspártico	4.42	Tirosina	0.35

Serina	3.40	Metionina	0.32
Lisina	2.65	Triptófano	–
Leucina	2.35	Cisteína	–
Valina	1.90		

b) Alginato

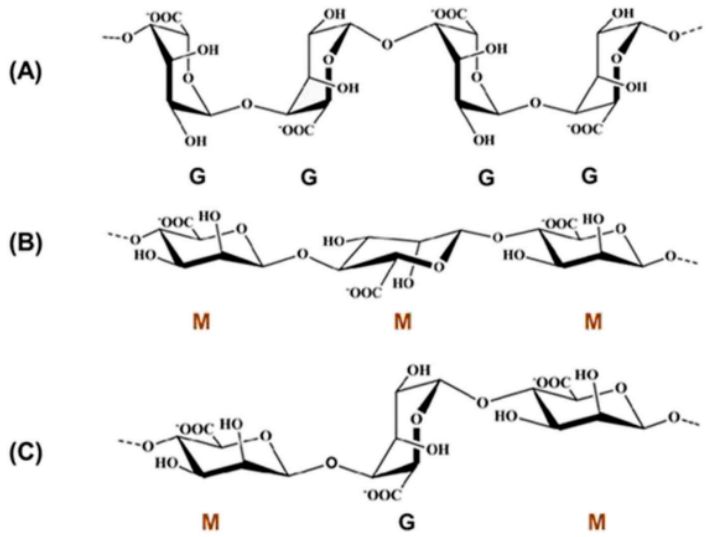


Figura 2. Estructura química del alginato. (a) Bloques homopoliméricos de ácido poli-α-1,4-L-gulurónico (GG); (b) bloques homopoliméricos de poli-β-1,4-D-ácido manurónico (MM); (c) bloques heteropoliméricos de residuos M y G alternos. Figura tomada de (Abka-khajouei et al., 2022).

El alginato es un polímero natural que se extrae de las algas pardas o se sintetiza a través de bacterias mediante un proceso de biosíntesis. Este biopolímero lineal está compuesto por unidades de (1,4) β-D-manuronato y α-L-guluronato (Abka-khajouei et al., 2022). Los segmentos de bloque M presentan una conformación lineal y flexible, mientras que los enlaces (1→4) del ácido gulurónico generan un impedimento estérico alrededor de los grupos carboxilo, lo que provoca que los segmentos del bloque G adquieran una conformación estructural plegada y rígida, responsable de la notable rigidez de las cadenas moleculares (Abka-khajouei et al., 2022).

Los alginatos con alto contenido de M también son inmunogénicos y tienen una mayor capacidad para inducir la producción de citoquinas en comparación con aquellos que presentan un alto contenido de G (J. Lee et al., 2020). Este material se utiliza en aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades sobresalientes, que incluyen la capacidad de gelificación *In situ*, solubilidad en agua, naturaleza mucoadhesiva, liberación prolongada de agentes activos y protección para los sistemas de liberación de células y partículas (J. Lee et al., 2020). Así, los hidrogeles de alginato se aplican en

diversas áreas, como portadores de fármacos, apósitos para heridas y matrices para aplicaciones periodontales (Ojansivu et al., 2019).

A pesar de esto, su principal desventaja es la baja resistencia mecánica, similar a otros polímeros naturales, lo que requiere combinarlos con materiales como la gelatina, el quitosano y biocerámicas como la nanohidroxiapatita (Sharma et al., 2016). Además, los hidrogeles de alginato combinados con nanohidroxiapatita han demostrado ser eficaces en la regeneración periodontal, induciendo la diferenciación celular hacia osteoblastos (Sancilio et al., 2018).

II. Cerámicos

Los materiales de fosfato de calcio son muy utilizados en el área de ingeniería de tejidos, dada su gran similitud en composición con la fase mineral del hueso natural. Por lo general, estos materiales tienden a generar una respuesta biológica similar a la que se genera durante la remodelación ósea, es decir, se reabsorbe el hueso y se forma nuevo hueso (Pupilli et al., 2022).

Dado que estos materiales son químicamente similares al hueso natural, sus productos de degradación no son tóxicos y son metabolizados de forma natural en los mamíferos (S. E. Kim & Park, 2020). Estos materiales se pueden encontrar en diferentes formas, siendo piezas sólidas, andamios, partículas, pastillas, entre otros. La nanohidroxiapatita (nHA), el fosfato tricálcico y sus diferentes combinaciones son los más usados en las terapias de regeneración periodontal (S. E. Kim & Park, 2020).

- **Nanohidroxiapatita (nHA)**

La nanohidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) es el componente inorgánico más abundante del hueso natural, siendo aproximadamente el 65% de la fase inorgánica. Se han encontrado diversas aplicaciones para relleno óseo en el área clínica. Diversos estudios han encontrado que se forma un enlace químico entre el tejido óseo y el injerto de nanohidroxiapatita, dando lugar a una matriz ósea (Fiume et al., 2021). Esta matriz se compone principalmente por depósitos minerales y una red de fibras de colágeno, que permiten una mejor unión interfacial (Anita Lett et al., 2021).

Los osteoblastos pueden unirse a la superficie de la nanohidroxiapatita para luego comenzar con la formación de un osteoide mineralizado que luego madura a un hueso completamente mineralizado (Ou & Huang, 2021). Los cristales de apatita que aparecen en la superficie que pueden interactuar con otros iones como los grupos carbonato aparecen en estos injertos e imitan la apatita biológica el hueso alveolar. Por ende, este es un material osteoconductor, aunque presente una tasa de degradación lenta (Q. Zhang et al., 2021b).

4.2.2. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas que promueven la migración, división y diferenciación celular y angiogénesis, todas actividades biológicas cruciales para la regeneración tisular. La incorporación de estas moléculas bioactivas en biomateriales y andamios ha sido propuesta como una estrategia eficaz (Yun et al., 2012). Entre estas moléculas, los factores de crecimiento como el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) favorecen la angiogénesis, mientras que otros, como BMP, FGF y el IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina-1), mejoran la diferenciación osteogénica y la formación ósea (Salah et al., 2020). Entre los más utilizados para acelerar la regeneración ósea se encuentran la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) (do Lago et al., 2020; Dragonas et al., 2019).

Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF)

El L-PRF es un biomaterial autólogo obtenido de la sangre venosa autóloga y en odontología ampliamente utilizado como membrana para estimular la regeneración de defectos óseos periodontales (Quirynen et al., 2024; E. D. Ribeiro et al., 2024). Constituye la segunda generación de concentrados plaquetarios y su protocolo de obtención incluye un protocolo determinado previamente en el que la sangre sea recolectada en tubos sin aditivos y debe ser centrifugada a 408 X G durante 12 minutos en una centrifuga en la que los tubos se mantengan a una angulación de 33 grados. (Quirynen et al., 2023). Una vez finalizada la centrifugación se obtiene un coágulo de fibrina enriquecido con las plaquetas y leucocitos del donante que es recolectado con pinzas y del que deben eliminarse los eritrocitos, este coágulo puede comprimirse para obtener membranas de 1mm de diámetro. Además, se ha reportado su uso para acelerar la cicatrización de tejidos blandos en cirugía oral y maxilofacial, gracias a su contenido de componentes esenciales de la sangre que facilitan la curación de heridas (E. D. Ribeiro et al., 2024).

Este material consiste en una matriz de fibrina polimerizada que contiene factores de crecimiento como el VEGF, el EGF (factor de crecimiento epidérmico) y el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), entre otros (Baca-Gonzalez et al., 2022; M. Dohan Ehrenfest et al., 2012). En combinación con injertos óseos, el L-PRF contribuye a promover la cicatrización, el crecimiento y la maduración ósea (do Lago et al., 2020; Ivanovski et al., 2024; Pinto et al., 2024).

4.2.3. Células madre para regeneración de tejido óseo

Las células madre mesenquimales son células pluripotenciales y no diferenciadas que son capaces de: (i) autorrenovarse, es decir, tienen la capacidad de generar células hijas idénticas a ellas y (ii) diferenciarse a varios linajes, entre estos el condrogénico, osteogénico y adipogénico (Hoang et al., 2022; Slack, 2018). Estas propiedades hacen que sean muy prometedoras en la regeneración y reparación de tejidos dañados. Su uso se puede optimizar mediante la integración con andamios bioactivos y la adición de factores de crecimiento (Gelmi & Schutt, 2021).

En la cavidad oral, existen varias fuentes de células madre la encía, el periostio, las glándulas salivares, el ligamento periodontal y la pulpa dental (S.-M. Lee et al., 2014). Las proteínas secretadas por estas células desempeñan un papel crucial en procesos biológicos como la proliferación, el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis y la señalización celular (González-González et al., 2020). A continuación, se destacan algunas de las más utilizadas en el ámbito odontológico:

i. Células madre de pulpa dental (hDPSC): Estas fueron las primeras células madre de origen dental identificadas y son una fuente importante para la regeneración periodontal. Se aíslan de la pulpa dental de dientes primarios o permanentes y tienen una alta capacidad de diferenciación hacia odontoblastos, osteoblastos, mioblastos y adipocitos (Kwack & Lee, 2022).

ii. Células madre de ligamento periodontal (PDLSCs): Localizadas en la superficie del hueso alveolar y la raíz dental, juegan un papel clave en la regeneración del ligamento periodontal y el cemento radicular. Pueden diferenciarse en células similares a osteoblastos, cemento y células formadoras de colágeno (Queiroz et al., 2021).

iii. Células madre de papila apical (SCAP): Se encuentran en la papila apical de dientes con raíces inmaduras. Presentan una mayor capacidad proliferativa que las hDPSC y pueden diferenciarse en linajes como células odontogénicas, condrogénicas, osteogénicas y neurogénicas (Calabrese, 2022).

4.2.4. Diferenciación de osteoblastos y función

Los osteoblastos (OB) son células pequeñas mononucleadas de origen mesenquimal, cuya diferenciación se produce por la acción de redes de citocinas y factores de transcripción (Liao et al., 2022). El proceso de diferenciación de las células del linaje osteoblástico pasa por tres etapas: (1) proliferación celular, (2) secreción y maduración de matriz extracelular (MEC) y (3) mineralización de la matriz (Rutkovskiy et al., 2016).

En la **primera etapa**, los precursores osteoblásticos proliferan y expresan colágeno, fibronectina y osteopontina (OPN), junto con receptores como TGF-βR1 (Rutkovskiy et al., 2016). Durante la **segunda etapa**, los OB inmaduros secretan COL1A1, el principal componente de la MEC, y expresan fosfatasa alcalina (ALP) para madurar la matriz (Rutkovskiy et al., 2016). Finalmente, en la **tercera etapa**, la matriz se mineraliza con la expresión de OPN, osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP), regulando la formación de cristales de nanohidroxiapatita (Lin et al., 2019).

Una vez completada la mineralización, los OB pueden sufrir apoptosis, quedarse atrapados dentro de la matriz mineralizada como osteocitos (OS) o convertirse en células de revestimiento óseo (Rutkovskiy et al., 2016). Los OB también regulan la remodelación ósea mediante la producción de RANKL y M-CSF, que inducen la diferenciación y activación de los osteoclastos (OC) (Amarasekara et al., 2021). Además, los OB secretan osteoprotegerina (OPG), que inhibe la osteoclastogénesis al bloquear la interacción RANKL-RANK, manteniendo el equilibrio en la homeostasis ósea (Boyce & Xing, 2008).

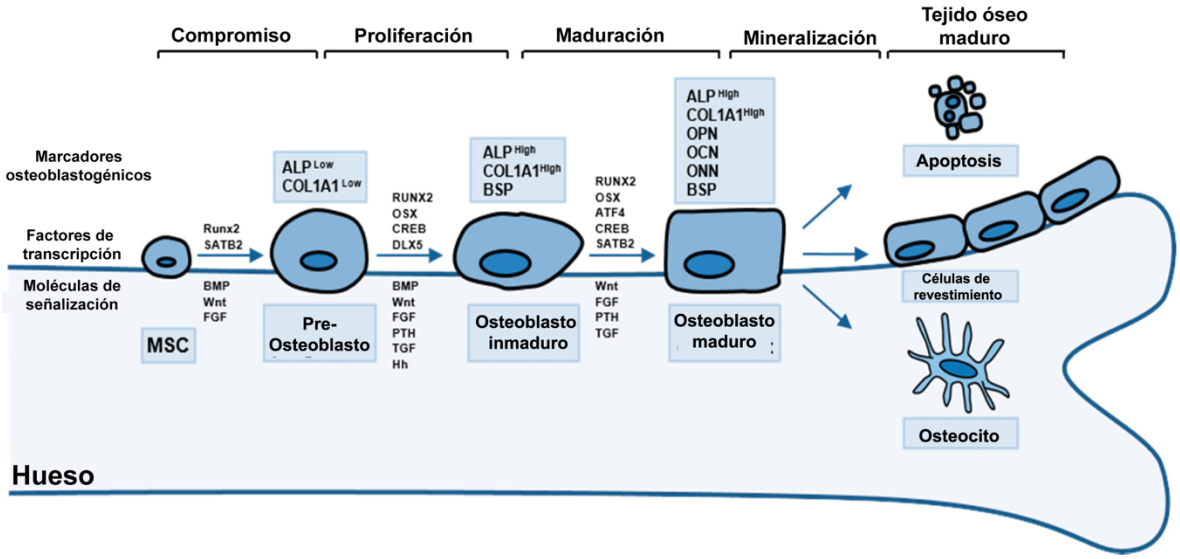


Figura 3. Esquema ilustrativo de la diferenciación de osteoblastos (OB) a partir de células troncales mesenquimales (MSC). Se muestran los principales factores y proteínas involucrados en este proceso: BMP (proteína morfogenética ósea), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), RUNX2 (factor de transcripción 2 relacionado con runt), PTH (hormona paratiroidea), TGF (factor de crecimiento transformante), Hh (proteína erizo), SATB2 (proteína especial de unión a secuencia rica en AT 2), ATF4 (factor de transcripción activador 4) y CREB (proteína de unión a elemento sensible a cAMP). Los marcadores de diferenciación incluyen ALP (fosfatasa alcalina), OPN (osteopontina), OCN (osteocalcina), ONN (osteonectina), BSP (sialoproteína ósea) y COL1A1 (cadena alfa 1 de colágeno tipo I). Adaptado de (Amarasekara et al., 2021).

5.1. Objetivo general

Evaluar la diferenciación osteogénica *In vitro* de células madre de pulpa dental humana (DPSC) en andamios construidos mediante impresión 3D y bioimpresión con una biotinta de alginato, gelatina, nanohidroxiapatita, y suplementado con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF).

5.2. Objetivos específicos

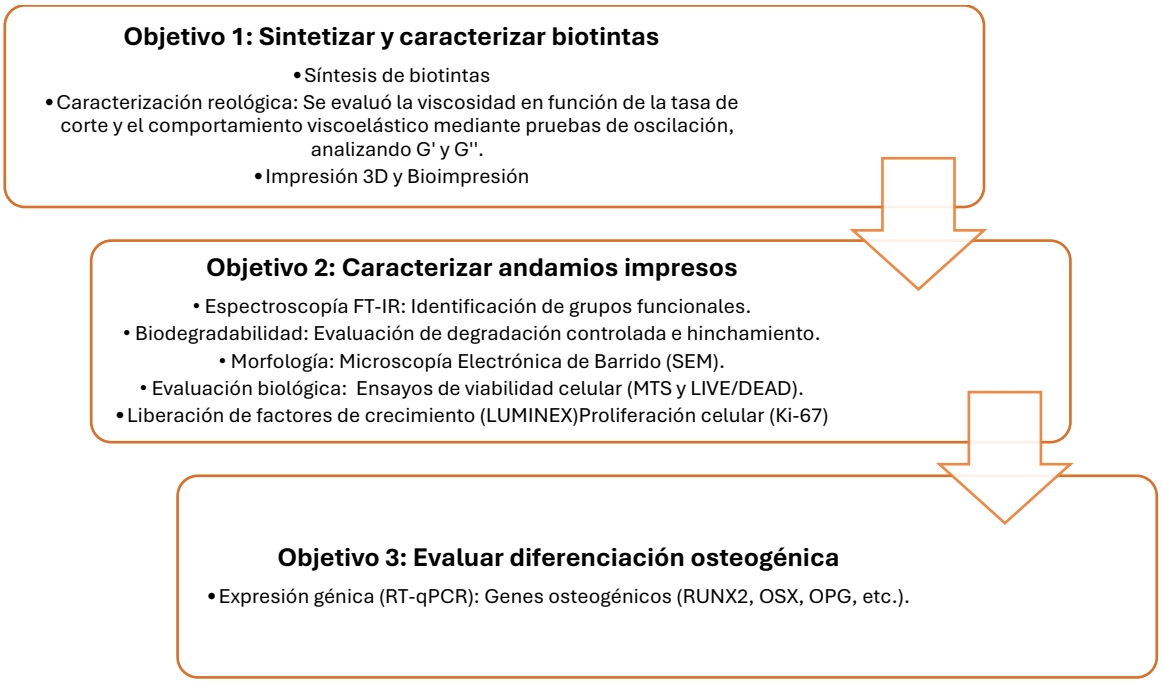
- Obtener y caracterizar una biotinta de nanohidroxiapatita, gelatina, y alginato, suplementada con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) para obtener andamios por bioimpresión e impresión 3D.

- Caracterizar física, estructural y biológicamente los andamios generados mediante impresión 3D y bioimpresión con una biotinta de alginato, gelatina, nanohidroxiapatita, suplementada con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF).

- Comparar la la expresión de marcadores osteogénicos *In vitro* de células madre de pulpa dental humana en andamios generados mediante impresión 3D y bioimpresión con una biotinta de alginato, gelatina, nanohidroxiapatita, suplementada con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF).

6. METODOLOGÍA

A continuación, se presenta un flujograma general de la metodología realizada de acuerdo a los objetivos específicos planteados:



6.1. Objetivo 1: Identificar la biotinta y la estrategia de impresión de alginato, gelatina y nanohidroxiapatita, para obtener andamios por bioimpresión e impresión 3D.

6.1.1. Obtención del L-PRF

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana (CIEFOPUJ, Acta #004 de 2023, Anexo 1). Tras la firma del consentimiento informado, se recolectaron muestras de sangre de tres donantes sistémicamente sanos en el Hospital Universitario San Ignacio. El L-PRF se obtuvo siguiendo el protocolo (Dohan Ehrenfest et al., 2018a).

Se recolectaron 9 ml de sangre en tubos sin anticoagulante (BD Vacutainer® Serum Tubes, silicone-coated) y se centrifugaron a 2700 rpm durante 12 minutos (aprox. 400g) en una centrifugadora Intra-Spin (Intra-Lock, Florida, USA). El coágulo de fibrina fue retirado de la porción media del tubo y los eritrocitos fueron eliminados con una espátula. Posteriormente cada coágulo de L-PRF fue almacenado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, congelado a -70°C durante 24 horas y liofilizado a -51°C durante 24 horas (Free Zone 2.5, Labconco) (Z. Liu et al., 2019). Posteriormente, el L-PRF se maceró y almacenó a temperatura ambiente en recipientes estériles.

6.1.2. Preparación de las tintas

6.1.2.1. Obtención de tintas con nanohidroxiapatita

Se realizaron diferentes mezclas para obtener tintas con cuatro composiciones distintas, combinando alginato (ALG, sal sódica de ácido algínico de algas pardas; Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, Francia, número CAS: 9005-38-3; Mw: 8945 g/mol, con una relación de manuronato/guluronato de 0,63) (Hernández-González, Téllez-Jurado, & Rodríguez-Lorenzob, 2020), gelatina tipo B (GEL, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, Francia, número CAS: 9000-70-8; Mw: 60 kDa) e nanohidroxiapatita (nHA) y utilizando Cloruro de Calcio ($CaCl_2$, Sigma, CAS: 10035-04-8) como agente entrecruzante. La nanohidroxiapatita (nHA) fue preparada mediante la reacción de $Ca(OH)_2$ con H_3PO_4 a pH 9.4. Una descripción detallada de la síntesis y caracterización puede encontrarse en (Fernández-Montes Moraleda et al., 2013). El área superficial específica es de 62 m^2/g **que significa que son partículas con un diámetro esférico equivalente de 31 nm** y el **tamaño de aglomerado** D50 es de 4.034 µm*. Todos los materiales se disolvieron en DMEM de baja glucosa (Gibco™, número de catálogo: 11965092). El ALG fue disuelto al 10% p/v a 4°C durante 24 horas. Luego, la GEL fue preparada al 10% p/v a 40°C durante 1 hora y se añadió y dispersó la nHA al 1%, 5% y 10% p/v, agitándose por 1 hora adicional. Después de eso, se añadió la solución de ALG y se homogeneizó por 1 hora. Todas las tintas se prepararon en un volumen final de 10 ml de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco™ Suero Fetal Bovino, número de catálogo: 15575309) y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100 µg/ml y 0,25 µg/ml de anfotericina B, Gibco™, número de catálogo: 15240062). La concentración final de ALG y GEL fue del 5% para todas las tintas, almacenadas a 4°C. Se realizó una medición y ajuste de pH (7.0) antes de su uso. Se obtuvieron cuatro composiciones, como se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Nomenclatura de las tintas preparadas.

Código	Alg (wt. %)	GEL (wt. %)	nHA (wt. %)
ALG5-GEL5	5	5	0
ALG5-GEL5-nHA1	5	5	1
ALG5-GEL5-nHA5	5	5	5
ALG5-GEL5-nHA10	5	5	10

* El diámetro esférico equivalente de partícula se calcula a partir de las medidas de superficie especifica (SSA). El tamaño de aglomerado se mide mediante un analizador de tamaño por dispersión/difracción de laser (Coulter). SSA= A/W = A/Vρ=

$4\pi r^2/(4/3\pi r^3)\rho = 3/r\rho = 6d\rho$ donde A es el área superficial en m^2, W es el peso en gramos, V es el volumen en centímetros cúbicos, □ es la densidad en gramos por centímetro cúbico, r es el radio en micrómetros y d es el diámetro esférico equivalente en micrómetros.

6.1.2.2. Adición de L-PRF a tinta escogida

La tinta de nanohidroxiapatita al 10% (ALG5-GEL5-nHA10), previamente sintetizada, fue seleccionada para su posterior modificación con L-PRF liofilizado. El L-PRF fue añadido en una concentración del 10% p/v, previamente disuelto en medio DMEM y la mezcla fue homogenizada durante 1 hora a temperatura ambiente para asegurar una distribución uniforme en la biotinta. La tinta fue almacenada a 4°C.

6.1.3. Caracterización reológica

Las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro AR-G2 (TA Instruments, DE, EE. UU.) equipado con geometría de platos paralelos (diámetro: 25 mm, separación: 1000 µm). Las muestras se cargaron en la placa pre-calentada del reómetro utilizando una jeringa y se midieron después de 30 segundos de estabilización. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

6.1.3.1. Barrido de tasa de cizallamiento y rampa de esfuerzo

Para determinar el comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento de las biotintas, se incrementó la tasa de cizallamiento ($\dot{\gamma}$) y se registró el esfuerzo cortante junto con la viscosidad aparente (η) de los biomateriales. Este paso es importante para comprender la pseudoplasticidad de las biotintas durante el proceso de extrusión (Cooke & Rosenzweig, 2021). Se midió un barrido de tasa de cizallamiento de 0.1 a 300 s^{-1} para todas las biotintas. Además, se midió el punto de esfuerzo de fluencia (donde el material comienza a fluir) como la intersección entre la viscosidad y el esfuerzo cortante (Paxton et al., 2017).

6.1.3.2. Prueba de tixotropía

La prueba de tixotropía se utilizó para determinar los comportamientos dependientes del tiempo de las biotintas en relación con la viscosidad y la tasa de cizallamiento [30]. La recuperación rotacional se midió en cada biotinta sometiéndola a una tasa de cizallamiento de 1 s^{-1} durante 60 segundos, seguida de una tasa de 100 s^{-1} durante 30 segundos. Este proceso se realizó tres veces a la tasa máxima de cizallamiento (100 s^{-1}) y dos veces a la mínima (1 s^{-1}) para evaluar el comportamiento de recuperación del material (Paxton et al., 2017).

6.1.3.3. Barrido de frecuencia

El barrido de frecuencia se utilizó para determinar las propiedades viscoelásticas de gel similar a sólido o líquido de las biotintas. Un barrido de esfuerzo oscilatorio determinó la región lineal viscoelástica (LVR) al 1% de deformación en todas las muestras, con un barrido de frecuencia entre 0.01 y 100 Hz con un 1% de deformación a 25 °C. El módulo de almacenamiento (G') indica un comportamiento similar a sólido, y el módulo de pérdida (G'') indica un comportamiento similar a líquido (Cooke & Rosenzweig, 2021). Además, cada muestra se entrecruzó con 1.5% de $CaCl_2$ y se analizó con un barrido de frecuencia en un rango de 0.01 Hz a 100 Hz y 1% de deformación a 37 °C para evaluar si el biomaterial presentaba un comportamiento similar a sólido debido al agente entrecruzante (Cooke & Rosenzweig, 2021; Paxton et al., 2017).

6.1.3.4. Cálculos índices de consistencia y de flujo

Los fluidos con adelgazamiento por cizallamiento también se caracterizan por el modelo de la ley de potencia de Ostwald–de Waele. Esta ecuación se expresa como $\tau = K(\dot{\gamma})^n$, donde τ se refiere al esfuerzo cortante y $\dot{\gamma}$ al índice de cizalla, el cual está vinculado a la viscosidad del fluido. El parámetro K define la consistencia del flujo y *n* es el índice de comportamiento del flujo. El esfuerzo cortante versus el índice de cizalla se graficó en el sofware Origin y se utilizó el modelo alométrico para calcular el índice (Sánchez-Sánchez et al., 2023).

6.1.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Los análisis de FT-IR se realizaron para identificar los grupos funcionales en muestras secas de ALG, GEL, nHA, L-PRF y las tintas sintetizadas. Los espectros se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Spectrum-Two Perkin Elmer acoplado con ATR, escaneando en el rango de 400 a 4000 cm−1 con una resolución de 4.00 cm−1 y 16 escaneos (Nacu et al., 2023).

6.1.5. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA).

Se realizaron análisis térmicos por duplicado en muestras en polvo de nanohidroxiapatita, alginato, gelatina, L-PRF y biotintas formuladas con y sin L-PRF. El ensayo de TGA, llevado a cabo en el equipo TGA 550 de la marca TA Instruments, evaluó la estabilidad térmica hasta 300 °C. Posteriormente, el análisis DSC se realizó utilizando el equipo Discovery 25 de TA Instruments, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, analizando las transiciones térmicas hasta 400 °C. Ambos ensayos se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno (Serna et al., 2019).

6.1.6. Evaluación de citotoxicidad en células HDFn y DPSC

Las células HDFn (Proveedor: Gibco™ C0045C) se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de antibiótico-antimicótico. Las células madre de pulpa dental (DPSC) fueron obtenidas mediante Lonza (PT-5025) y fueron cultivadas con el kit de mantenimiento de Lonza (Human Dental Pulp Stem Cell BulletKit™, PT-3005, Lonza). Se sembraron 5 x 10^3 células por pozo en placas de 96 pozos y se dejaron adherir durante la noche. Posteriormente, se depositaron gotas de tinta de aproximadamente 50 µm en una solución de $CaCl_2$ al 1.5% p/v para la reticulación durante 10 minutos y luego se recuperaron con pinzas. Las tintas se colocaron sobre monocapas de HDFn durante 1, 3 y 7 días. Mientras que las tintas que contenían L-PRF fueron evaluadas en monocapa de DPSC durante 1, 3 y 7 días. En cada tiempo, se eliminó el medio de cultivo celular y se añadieron 10 µl de alamarBlue™ (Catálogo No: DAL1025, Invitrogen) junto con 90 µl de medio de cultivo celular en cada pozo, incubándose durante 2 horas. En el caso de las DPSC, se utilizó el reactivo MTS (10 µl de y 40 µl de medio de cultivo). Después de la incubación, se retiraron los andamios de los pozos y se midió la absorbancia del medio a 570 nm. La monocapa sin tinta sirvió como control negativo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. n=3.

6.2. Objetivo 2: Caracterizar, física, biológica y estructuralmente andamios generados mediante impresión en 3D y bioimpresión.

6.2.1. Impresión 3D

Las tintas preparadas se cargaron en un cartucho de 3 ml (Cellink) precalentado a 37 ºC. Se imprimieron andamios cilíndricos de 15 mm de diámetro con poros de 1.3 mm utilizando la impresora 3D Inkredible (Cellink), con una boquilla cónica de calibre 27 (0.2 mm), en placas de cultivo celular de 6 pozos, a una velocidad de 10 mm/s (Banda Sánchez et al., 2023). Una vez impresos, cada andamio se entrecruzó con una solución de cloruro de calcio al 1.5% p/v ($CaCl_2$, número CAS: 10043-52-4) (pH 7.3) durante 5 minutos y luego se lavó con PBS. Los andamios se mantuvieron en medio de cultivo celular (DMEM + 10% FBS + 1% Antibiótico/antimicótico) e incubados a 37 ºC y 5 % de CO_2. El medio se cambió cada tres días hasta su uso.

Tabla 5. Condiciones de impresión. Impresora CellInk.

Protocolo Impresión	
Dimensiones	20x20x3mm
Altura capa	0.41 mm
Densidad infill	30
Temperatura cabezal	37ºC
Temperatura cama	37ºC

Velocidad impresión	2 mm/s
Presión extrusión	20kPa

6.2.1.1. Prueba de hinchamiento andamios impresos en 3D

Se utilizó una prueba de gravimetría para evaluar el comportamiento de hinchamiento de los andamios impresos (Deo et al., 2020). Los andamios impresos se colocaron y sumergieron en medio de cultivo celular en una placa de cultivo de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se midió el peso seco inicial de cada andamio (Ps), eliminando el exceso de medio de cultivo celular con una toalla de papel. El peso hinchado (Ph) se midió en diferentes momentos (1, 2, 4, 8, 19 y 24 horas). Las muestras fueron analizadas por triplicado. La siguiente ecuación se utilizó para determinar el comportamiento de hinchamiento:

$$\%H = \frac{P_h - P_s}{P_s}$$

Ecuación 1. Determinación del comportamiento de hinchamiento donde Ps es el peso seco de cada andamio y Ph es el peso hinchado de cada andamio en diferentes momentos. n=3

6.2.1.2. Prueba de degradación en andamios impresos en 3D

Se utilizó una prueba de gravimetría para evaluar el comportamiento de degradación de los andamios impresos (Tajvar et al., 2023). Se midió el peso seco inicial (Ps) de los andamios impresos, eliminando el exceso de medio de cultivo celular con una toalla de papel. Luego, los andamios se colocaron y sumergieron en medio de cultivo celular en placas de cultivo de 6 pocillos y se incubaron durante 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 30 días a 37 °C. En cada intervalo de tiempo, se evaluó el porcentaje de degradación midiendo el peso de cada andamio después de la incubación. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%D = \frac{P_i - P_s}{P_i}\ x\ 100$$

Ecuación 2. Determinación del comportamiento de degradación, donde Ps es el peso seco de cada andamio y Pi es el peso después de cada tiempo de incubación. n=3

6.2.1.3. Morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Los andamios fueron procesados con un secador por punto crítico (SANDRI 795) y metalizados con oro. Las imágenes representativas de cada andamio se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss Evo HD 15), con un voltaje

de aceleración de 10 kV y con magnificación de 800X, 40X y 60X. Estas imágenes fueron procesadas mediante el software FIJI (NIH, EE. UU.) para obtener los tamaños de poro promedio de cada andamio. Las muestras fueron analizadas por duplicado. n=2.

6.2.1.4. Liberación de factores de crecimiento de andamios impresos con L-PRF

Los factores de crecimiento presentes en los andamios que contenían L-PRF se midieron mediante un kit de Luminex (LXSAHM-05, R&D Systems, EE. UU.). El kit se preparó como lo indica la casa fabricante. Para el análisis se obtuvieron medios condicionados de los andamios obtenidos, para esto los andamios fueron sumergidos en medio de cultivo sin ningún suplemento y fueron mantenidos en una incubadora para cultivo celular a 37 °C. Los sobrenadantes de los andamios se recolectaron en los días 1, 3, 7, 14 y 21. En cada punto de tiempo, el medio de cultivo fue retirado cuidadosamente y reemplazado por medio fresco para continuar con la incubación. Como control positivo, se utilizó el secretoma de L-PRF (medio condicionado obtenido de un coágulo de L-PRF) recolectado 3 horas después del procesamiento de la muestra y como control negativo se usó medio de cultivo sin suplementar. Los medios condicionados sin diluir y los controles fueron llevados a la placa de inmunoensayo previamente tratada con las perlas magnéticas, incubando la mezcla en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Los niveles de factores de crecimiento BMP-2, PDGF-BB, EGF, FGF-B y VEGF-C se analizaron utilizando el sistema LUMINEX. Las muestras fueron analizadas por duplicado. n=2.

6.2.1.5. Proliferación mediante Ki-67

Con el objetivo de evaluar la actividad de los factores de crecimiento liberados a partir de los andamios suplementados con L-PRF, células madre de pulpa dental (DPSC) fueron sembradas a una densidad de 10.000 cel/pozo en cubreobjetos de vidrio tratados para cultivo celular y en placas de 24 pocillos. Después de 24 horas, se eliminó el suero fetal bovino (SFB) del medio de cultivo durante la noche y, posteriormente, las células fueron tratadas durante 48 horas con medio condicionado proveniente de andamios bioimpresos con L-PRF. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina al 1% y se incubaron durante la noche con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 (1:800). Luego, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con Cy3 (1:400, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y el citoesqueleto celular con faloidina acoplada con Alexa-Fluor 488 (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos de vidrio con medio de montaje para fluorescencia (Fluoromount, Invitrogen) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E200). Se tomaron imágenes representativas para determinar el porcentaje de células positivas para el marcador de proliferación Ki67. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Como controles, se

utilizó medio suplementado con SFB al 10%, medio condicionado con coágulo de L-PRF de 3 horas y medio sin suplementar. n=2.

6.2.2. Bioimpresión 3D

Los fibroblastos dérmicos humanos neonatales (HDFn) se obtuvieron de Gibco™ (Proveedor: Gibco™ C0045C). Las células se cultivaron en medio de cultivo celular (DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico). Las células madre de pulpa dental (DPSC) fueron obtenidas mediante Lonza (PT-5025) y fueron cultivadas con el kit de mantenimiento de Lonza (Human Dental Pulp Stem Cell BulletKit™, PT-3005, Lonza). Cuando las células alcanzaron un 90 % de confluencia, se desprendieron con tripsina/EDTA 1X al 0.25 % (Gibco, 25200056) y se mezclaron a una concentración de $1x10^6$ células por mililitro de biotinta previamente calentada a 37 °C con una espátula. Todo se realizó bajo condiciones estériles dentro de una cabina de flujo laminar (Purifier Logic+ Clase II, Labconco). Se añadió la solución de biotinta cargada con células a un cartucho de 3 ml para la impresión y se obtuvieron andamios cilíndricos de 15 mm de diámetro y cuadrados de 2x2 mm con poros de 1.3 mm utilizando la impresora 3D Inkredible (Cellink) y la impresora BioX (Cellink), como se describió anteriormente para la impresión de andamios 3D. Los andamios se entrecruzaron con cloruro de calcio (1.5% p/v) durante 10 minutos y luego se colocaron en placas de 6 pozos con medio de cultivo celular e incubaron a 37 °C y 5 % de CO_2 hasta su evaluación.

6.2.2.1. Cálculo del esfuerzo de cizallamiento en las células durante la impresión

El estrés cortante experimentado por las células al pasar a través del cartucho y la punta del cabezal de impresión se calculó como se reportó previamente (Banda Sánchez et al., 2023; Blaeser et al., 2016). Primero, se determinó el caudal (Q) en el cartucho o la punta del cabezal de impresión utilizando la siguiente ecuación:

$$Q = \pi R^2 V$$

Ecuación 3. Cálculo del caudal de la jeringa de impresión en el cartucho y en la punta del cabezal. Q : Caudal ; R : Radio ; V : Velocidad.

donde R es el radio (del cartucho o la punta del cabezal de impresión) y V es la velocidad de flujo (definida en el protocolo de la impresora 3D). Luego, se definió la distribución de *la tensión cortante ($\dot{\gamma}^n$) debido* a la deformación a lo largo del cartucho o la punta del cabezal de impresión con la siguiente ecuación:

$$\dot{\gamma}^n = \left(\frac{VR^2}{\left(\frac{n}{3n+1}\right)\left(R\,\frac{3n+1}{n}\right)} \right)^n r$$

Ecuación 4. Distribución de la tensión cortante en el cartucho y en la punta del cabezal. Donde: Q: Caudal; R: Radio máximo; r: radio mínimo; V: Velocidad, distribución de estrés ($\dot{\gamma}^n$).

donde R es el radio máximo (del cartucho o la punta del cabezal de impresión), V es la velocidad de flujo (definida en el protocolo de la impresora 3D), r es el radio mínimo y n es el índice de la ley de potencia. Con los valores del caudal (Q) y la distribución de estrés ($\dot{\gamma}^n$) en el cartucho o la punta del cabezal de impresión, se calculó el estrés cortante (τ) utilizando la siguiente ecuación, como se reportó anteriormente (Banda Sánchez et al., 2023):

$$\tau = K(\dot{\gamma})^n$$

Ecuación 5. Cálculo del esfuerzo cortante. Donde τ es el esfuerzo de corte, K es el índice de consistencia del flujo y n es el índice de la ley de potencia.

6.2.2.2. Ensayo Live/Dead

La viabilidad celular fue evaluada en los andamios impresos en 3D (células sembradas después de la impresión) y en los andamios bioimpresos. Brevemente, los andamios impresos en 3D fueron inyectados con 1x10^6 células/ml, mientras que los andamios bioimpresos ya contenían las células embebidas, como se explicó anteriormente. Los andamios se incubaron durante 24 horas y 7 días, reemplazando el medio de cultivo celular cada dos días. Asimismo, se evaluaron los andamios durante la diferenciación osteogénica, utilizando medio de diferenciación osteogénica (Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium, Catálogo No. 7531, ScienCell, EE. UU.) e incubándolos durante 14 y 21 días. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

Para determinar las células viables y no viables, los andamios fueron tratados con el kit Live/Dead (Invitrogen™ LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, para células mamíferas, Catálogo No. L33224), que contiene calceína AM y etidio homodímero-1, durante 30 minutos. Posteriormente, los andamios bioimpresos se observaron bajo un microscopio invertido de fluorescencia (Leica TCS SP5), donde las células vivas se teñían de verde y las células muertas de rojo. Se tomaron imágenes representativas y se analizaron con el software ImageJ2 v. 2.14.0. La viabilidad celular se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%\ \boldsymbol{Porcentaje\ viabilidad} = \frac{\boldsymbol{Células\ vivas\ (verde)}}{\boldsymbol{Células\ muertas\ (rojo) + Células\ vivas\ (verde)}}\ \boldsymbol{x\ 100}$$

Ecuación 6. Determinación de la viabilidad celular en andamios bioimpresos.

6.3. Objetivo 3: Comparar la diferenciación osteogénica *In vitro* de células madre de pulpa dental humana en un andamio generado mediante impresión 3D y en un andamio bioimpreso, ambos a base de la biotinta optimizada.

6.3.1. Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Los andamios impresos en 3D (con células sembradas tras la impresión) y los andamios bioimpresos se incubaron durante 3 días en medio de cultivo DPSC. Posteriormente, el medio fue reemplazado por un medio de diferenciación osteogénica (Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium, Catálogo No. 7531, ScienCell, EE. UU.) durante períodos de 1, 7, 14 y 21 días. Al finalizar cada tiempo, los andamios fueron preservados en RNAlater™ y congelados hasta su procesamiento.

La digestión enzimática se realizó con Proteinasa-K (20 mg/ml) durante 24 horas a 56 °C. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo Biozol (BSC55, Bioer, China), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aislaron 200 ng/µl de ARN de cada muestra, tratándolas con DNasa I (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen, CAT: 18068-015). A continuación, se llevó a cabo la retrotranscripción con el kit OneScript® (Plus cDNA Synthesis Kit, G592, abm technologies).

Las muestras se cuantificaron mediante Nanodrop® y se prepararon alícuotas de 200 ng/µl para RT-PCR, analizando cada muestra por triplicado. Los primers previamente diseñados y estandarizados (ver Tabla 5) fueron utilizados, empleando el gen β-actina como calibrador. Las PCRs se llevaron a cabo con Sybr-Green en el equipo CFX-96 de BioRad, evaluando los cambios en la expresión génica en relación con la expresión basal del gen calibrador β-actina. El cálculo de la expresión génica relativa mediante $\mathbf{2}^{-\Delta\Delta Ct}$en PCR se realizó obteniendo primero los valores Ct del gen de interés (como RUNX2) y del gen de referencia (actina). Luego, se calculó **ΔCt** restando el Ct del gen de referencia al del gen de interés. Posteriormente, se determinó **ΔΔCt** comparando el ΔCt de la muestra con el ΔCt de un control. Finalmente, se obtuvo la **expresión relativa** utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Un valor mayor a 1 indicó sobreexpresión, un valor menor a 1 reflejó subexpresión, mientras que un valor igual a 1 mostró que no hubo cambios en la expresión génica (F. Zhao et al., 2021). n=3.

Tabla 6. Primers.

Gen	Forward	Reverse
RUNX2	TGGTTAATCTCCGCAGGTCAC	ACTGTGCTGAAGAGGCTGTTTG
OSX	TGCCTAGAAGCCCTGAGAAA	TTTAACTTGGGGCCTTGAGA
ALP	CCAACGTGGCTAAGAATGTCATC	TGGGCATTGGTGTTGTACGTC

OSC	CCATGAGAGCCCTCACACTCC	GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC
OPG	ATGCAACACAGCACAACATA	GTTGCCGTTTTATCCTCTCT
OPN	TGGAACTTGCTTGACTATCGA	GACCACATGGACGACGATG
RANKL	ATACCCTGATGAAAGGAGGA	GGGGCTCAATCTATATCTCG
COL1	AGAACTGGTACATCAGCAAG	GAGTTTACAGGAAGCAGACA
BMP2	TCGAAATTCCCCGTGACCAG	CCACTTCCACCACGAATCCA
TGFB2	GGCTCAACCACCAGGGCATCCAGAT	CTCCCCGAGAGCCTGTCCAGATGCT
VEGF	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA

6.4. Análisis de resultados

Todos los datos de las muestras evaluadas fueron registrados en una base de datos en Excel y analizados mediante los programas R y GraphPad Prism v8. Se realizó un análisis descriptivo de los resultados utilizando medidas de tendencia central ($\bar{x}$: promedio), mediana y de dispersión (±: desviación estándar) para cada uno de los andamios bioimpresos. La distribución de los grupos dependió de las mezclas que, a partir de la formulación inicial, cumplieron con los criterios, características y propiedades de imprimibilidad de un solo paso para la formulación definitiva.

Se evaluó la distribución de los datos de cada grupo utilizando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos que no presentaron normalidad fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que los datos con distribución normal fueron evaluados mediante t-test y ANOVA para analizar las relaciones entre los diferentes grupos. El nivel de significancia estadística se estableció en $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

Objetivo 1

7.1. Caracterización de la tinta

Debido a que no se conocía cómo sería la imprimibilidad de las biotintas, se decidió evaluar primero qué porcentaje de nanohidroxiapatita (nHA) sería óptimo para su formulación. Se probaron diferentes concentraciones de nHA (1%, 5% y 10%), analizando sus propiedades reológicas y biológicas. nHA al 10% fue seleccionado por mostrar las mejores características reológicas (ver Figura 5), como un comportamiento pseudoplástico ideal para la impresión por extrusión y por su desempeño biológico superior, con mayor viabilidad y proliferación celular (ver Figura 16). A esta biotinta se le añadió un 10% de L-PRF liofilizado para incrementar su capacidad de regeneración ósea mediante la liberación de factores de crecimiento. Cinco biotintas con las composiciones descritas en la Tabla 6 fueron preparadas. Su color y características pueden apreciarse en la Figura 4. Macroscópicamente, la biotinta compuesta de ALG 5% y Gel 5% se observó de color rojo (Figura 4A) en comparación con el color rosado en las biotintas que contenían nanohidroxiapatita (Figura 4 B-D).

Tabla 7. Nomenclatura, composición y parámetros de la ley de potencia de las biotintas preparadas.

Tinta	ALG (%p/v)	GEL (%p/v)	nHAp (%p/v)	L-PRF (%p/v)	n	K
ALG5-GEL5	5	5	0	0	1	6.918
ALG5-GEL5-nHAp1	5	5	1	0	0	16.21***
ALG5-GEL5-nHAp5	5	5	5	0	0	22.89***
ALG5-GEL5-nHAp10	5	5	10	0	0	34.81***
ALG5-GEL5-nHAp10 + L-PRF	5	5	10	10	0	64.34***

***p<0.001

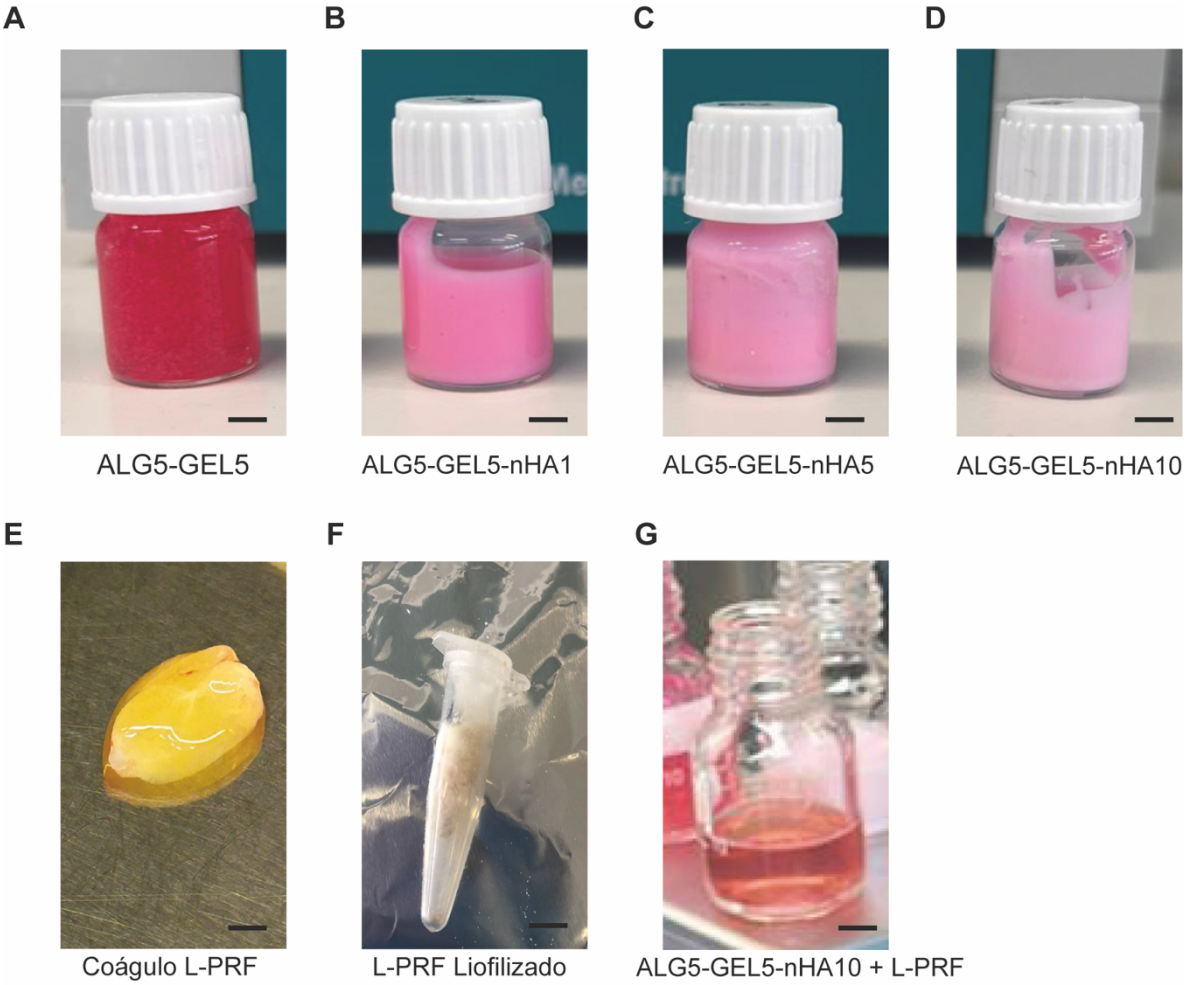


Figura 4. Biotintas sintetizadas con diferentes composiciones. (A) 5 % de alginato y 5 % de gelatina (ALG5-GEL5); (B) 5 % de alginato, 5 % de gelatina e nanohidroxiapatita al 1 % (ALG5-GEL5-nHA1); (C) 5 % de alginato, 5% de gelatina e nanohidroxiapatita al 5 % (ALG5-GEL5-nHA5); (D) 5 % de alginato, 5 % de gelatina e nanohidroxiapatita al 10 % (ALG5-GEL5-nHA10). (E) Coágulo de L-PRF; (F)L-PRF liofilizado; (G) 5 % de alginato, 5 % de gelatina, nanohidroxiapatita al 10 % y L-PRF al 10 % (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF 10 %). ALG para alginato, GEL para gelatina y NHA para nanohidroxiapatita. Cada imagen incluye una barra de escala de 1 cm para facilitar la referencia de tamaño.

7.2. Comportamiento reológico de las biotintas

Todas las biotintas mostraron un comportamiento de adelgazamiento por esfuerzo (pseudoplástico) desde un punto de esfuerzo tan bajo como 0.2 s^{-1} (Figura 5A). La incorporación de L-PRF y nHA en las biotintas aumentó significativamente ($p < 0.0001$) sus valores de viscosidad (Figura 5A), con un aumento de más de 10 veces para ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF en las tasas de cizallamiento más bajas ensayadas, en

comparación con ALG5-GEL5 (Figura 5A). Ninguna de las biotintas demostró un punto de esfuerzo de cedencia ni una disminución drástica en el valor de viscosidad a medida que aumentaba el esfuerzo de cizallamiento (Figura 5A). Para todas las biotintas, la viscosidad disminuyó a medida que aumentaba la tasa de cizallamiento, con un índice $n < 1$ (Tabla 6), lo que corresponde a un comportamiento pseudoplástico. Además, se calculó el índice de consistencia k, que refleja la resistencia inicial del fluido al flujo [28]. El índice k aumentó significativamente con la adición de L-PRF y el aumento de la concentración de nHAp ($p < 0.0001$ Tabla 1, Figura S1) en comparación con la biotinta sin nHA.

Asimismo, concentraciones más altas de nHA influyeron en el porcentaje de recuperación de las propiedades viscoelásticas originales en las biotintas. Se utilizó una prueba de recuperación para determinar la capacidad de las biotintas de recuperarse del estrés inducido durante el proceso de impresión después de 60 y 90 segundos. ALG5-GEL5, ALG5-GEL5-nHA1 y ALG5-GEL5-nHA5 mostraron una recuperación similar en ambos tiempos evaluados (Figura 5 B, C). Sin embargo, la biotinta ALG5-GEL5-nHA10 y la de ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF mostraron un aumento significativo en el porcentaje de recuperación después de 90 segundos en comparación con la recuperación después de 60 segundos ($p < 0.0001$, Figura 5 B, C).

La adición de nHA y L-PRF también cambió el comportamiento sólido en las biotintas evaluadas. Una prueba de barrido de frecuencias evaluó el comportamiento como líquido o sólido bajo diferentes frecuencias de deformación en todas las biotintas. Un comportamiento similar al sólido se caracteriza por el predominio del módulo de almacenamiento (G') sobre el módulo de pérdida (G''), reflejado en los valores de Tan δ (G''/G') menores a 1.

En contraste, un comportamiento similar al líquido presenta predominio del módulo de pérdida (G'') sobre el módulo de almacenamiento (G'), mostrando valores de Tan δ (G''/G') mayores a 1. La biotinta ALG5-GEL5 mostró valores de Tan δ mayores a 1, mientras que las biotintas que contenían nHA solo y en combinación con L-PRF disminuyeron significativamente los valores de Tan δ ($p < 0.0001$, ALG5-GEL5-nHA5, ALG5-GEL5-nHA10, ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF), mostrando valores menores a 1 (Figura 5 D, E). El proceso de gelificación se midió a 37 °C utilizando cloruro de calcio para evaluar el comportamiento de entrecruzamiento de las biotintas. En todas las biotintas evaluadas, el módulo de almacenamiento (G') superó consistentemente al módulo de pérdida (G''), particularmente cuando se entrecruzaron con cloruro de calcio. Esto indica una mejora significativa en la rigidez y la integridad estructural del material. Notablemente, las biotintas que contenían nHA demostraron un predominio pronunciado del módulo de almacenamiento.

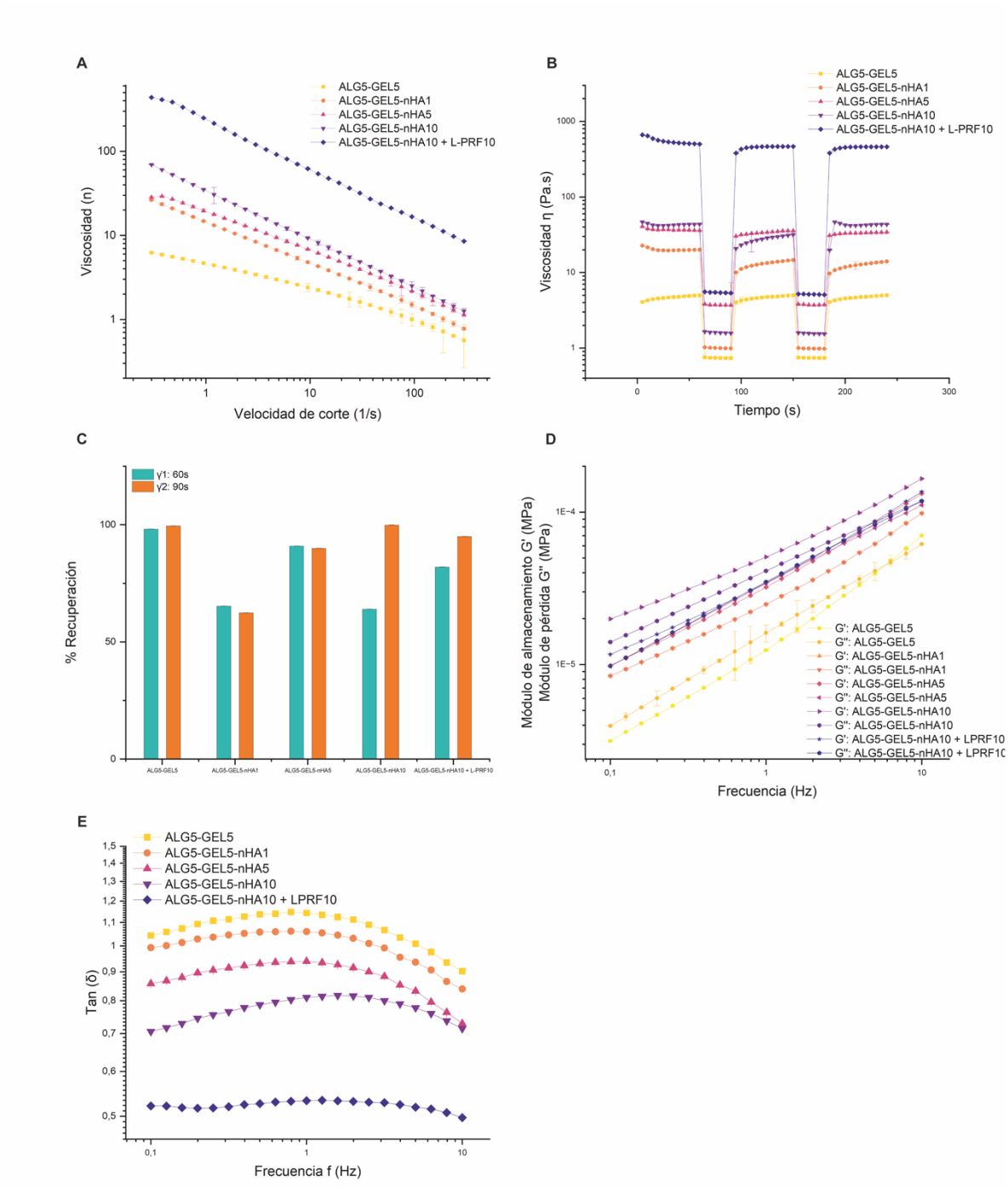


Figura 5. Análisis reológico de las biotintas preparadas. A) Incremento de esfuerzo de cizallamiento; B) Recuperación de esfuerzo de cizallamiento; C) Porcentaje de recuperación; D) Barrido de frecuencias; E) Tan δ; F) Gelificación a 37 °C para todas las biotintas. ALG: Alginato, GEL: Gelatina, nHA: Nanohidroxiapatita, L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos, G': Módulo de almacenamiento, G'': Módulo de pérdida. *** p

< 0.0001, **** p < 0.0001. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos.

7.3. Análisis de grupos funcionales mediante FT-IR

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) identificó los grupos funcionales dentro de las biotintas. En la Figura 6, se representan los espectros de nHA, GEL, ALG, L-PRF y las cinco biotintas preparadas, con una biotinta entrecruzada. El espectro de nHA (Figura 6A) mostró picos a 1087, 1072, 1052 y 1032 cm^{-1} correspondientes a $u_3(PO_4)$. Además, los picos a 961 cm^{-1} y 874 cm^{-1} correspondieron a $u_1(PO_4)$, todos característicos de los fosfatos en un ambiente apático. El espectro de L-PRF (Figura 6B) presentó picos a 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de estiramiento de C-H en los enlaces CH_2 y CH_3, típicos de los grupos metileno en los lípidos. Además, se observó un pico a 1650 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento C=O de las proteínas, un pico a 1405 cm^{-1} que indica la vibración simétrica de los grupos COO^-, y un pico a 1236 cm^{-1} asociado a la vibración C-N de las amidas (Ercan et al., 2022). La gelatina (GEL) mostró picos característicos a 3329 cm^{-1} (ancho) para las vibraciones de estiramiento NH y OH, 1621 cm^{-1} $u_{C=O}$, y 1242 cm^{-1} u_{C-N} de las amidas I, II y III respectivamente.

Adicionalmente, se puede observar la vibración de estiramiento de los enlaces C-N y la vibración de flexión de los enlaces N-H, lo que indica la presencia de la amida III (Figura 6C) (Skopinska-Wisniewska et al., 2021). El espectro de alginato de sodio mostró picos a 3390 cm^{-1} OH, 1621 cm−1 u asim (COO), 1422 cm−1 usim (COO), 1050 cm−1 u (CC + uCO) (Figura 6D). La biotinta ALG5-GEL5 presentó picos a 3329 cm^{-1} y 1621 cm^{-1}; los grupos funcionales de nanohidroxiapatita estaban ausentes (Figura 6D). A continuación, las biotintas compuestas de ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5, ALG5-GEL5-nHA10 y ALG5-GEL5-nHA10+L-PRF mostraron los mismos grupos anteriores, pero, además, con los picos característicos de nanohidroxiapatita, como el 1052 cm−1 u3(PO4) y del L-PRF, en el caso de la combinación (Figura 6E–I).

En resumen, todas las biotintas exhibieron grupos comunes encontrados en gelatina, alginato y L-PRF; a pesar de ello , variaron en la presencia y la intensidad de las bandas de nanohidroxiapatita. La Figura 6J muestra el espectro de una biotinta entrecruzada y revela el desplazamiento de la vibración de estiramiento simétrico $uCOO^-$ asociada con las sales de ácido carboxílico, de 1412–1413 cm^{-1} antes del entrecruzamiento a 1417–1420 cm^{-1} y después del entrecruzamiento (Hernández-González, Téllez-Jurado, & Rodríguez-Lorenzob, 2020). Este desplazamiento se puede atribuir a la unión iónica, lo que muestra que la presencia de gelatina, e nanohidroxiapatita no inhibe la gelación iónica del alginato.

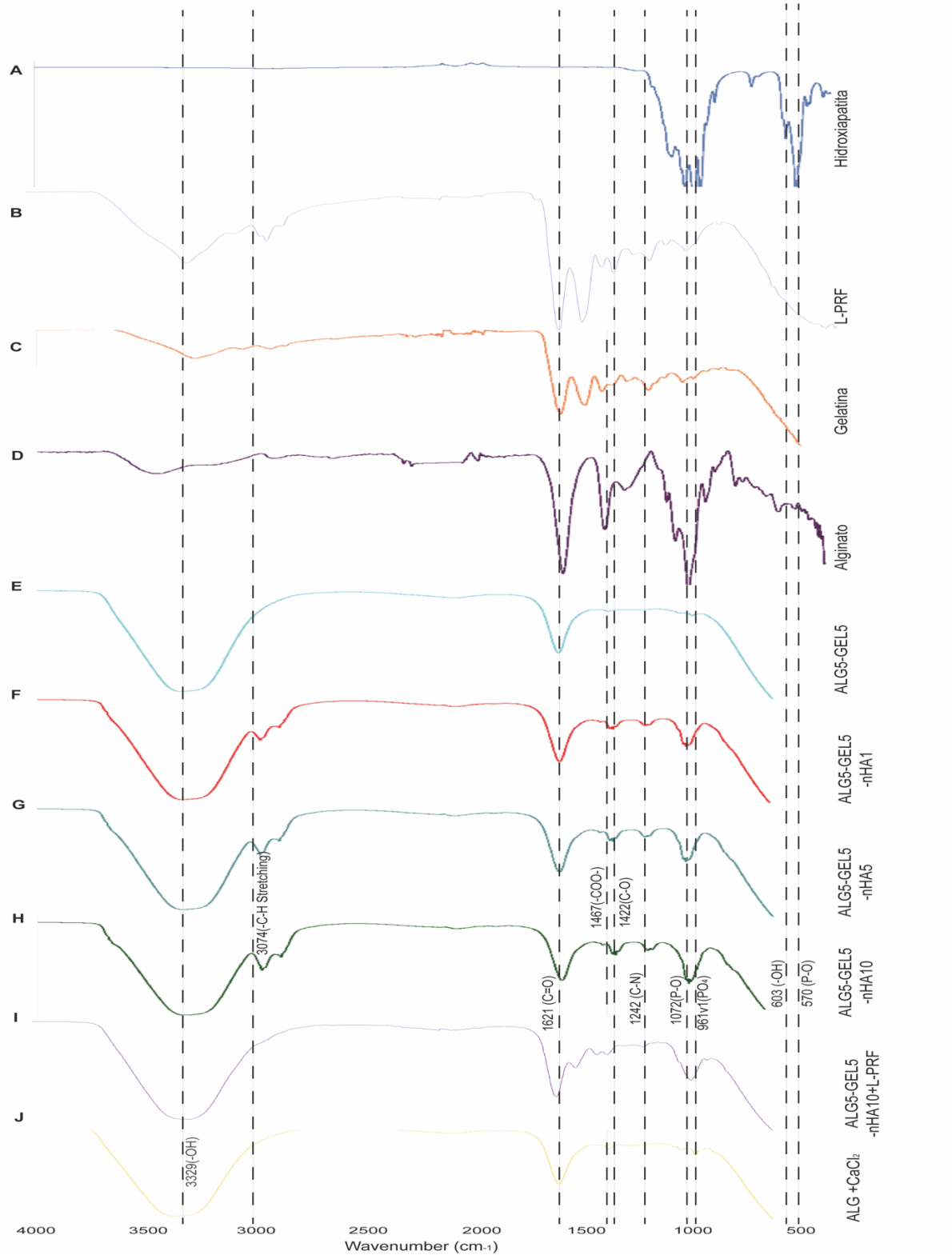


Figura 6. Grupos funcionales detectados en las biotintas de biomateriales mediante análisis FT-IR. (A) Polvo de nanohidroxiapatita; (B) L-PRF liofilizado (C) Polvo de gelatina; (D) Polvo de alginato de sodio; (E) ALG5-GEL5 (alginato 5%–gelatina

5% sin nanohidroxiapatita); (F–H) biotintas con concentraciones crecientes de nanohidroxiapatita al 1, 5 y 10%: ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5 y ALG5-GEL5-nHA10, respectivamente, (I) ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF y (J) ALG5 reticulado con CaCl2. Abreviaturas: ALG, alginato; L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos. GEL, gelatina; nHA, nanohidroxiapatita; $CaCl_2$, cloruro de calcio.

7.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) mostró la estabilidad térmica y la composición de las biotintas, revelando la pérdida de masa asociada con la degradación de sus componentes a diferentes temperaturas (Mirek et al., 2023). El TGA del alginato reveló una pérdida de masa significativa en dos etapas: la primera, a temperaturas cercanas a 227 °C, correspondió a la evaporación de agua adsorbida, con una pérdida de masa aproximada del 10 %, y la segunda, a temperaturas entre 250 °C y 400 °C, estuvo asociada a la descomposición de la cadena polimérica de alginato, con una pérdida de masa de aproximadamente un 35 % (Figura 7A). Por otro lado, el TGA de la gelatina mostró una pérdida de masa considerable a temperaturas entre 50 °C y 200 °C, atribuida a la deshidratación y eliminación de agua libre y vinculada en la estructura.

A temperaturas superiores a los 300 °C, se observó la descomposición térmica de la gelatina, con una pérdida de masa de alrededor del 40%, debido a la ruptura de las cadenas de colágeno (Figura 7B). El TGA de la nanohidroxiapatita mostró una estabilidad térmica superior, con una pérdida de masa mínima (<5%) hasta temperaturas superiores a los 700 °C, lo que indica la alta estabilidad de este material frente a la descomposición térmica (Figura 7C). En cuanto al L-PRF, el TGA mostró una pérdida de masa considerable en dos etapas: la primera, entre 50 °C y 150 °C, se atribuyó a la eliminación de agua libre y algo de contenido lipídico y la segunda, entre 200 °C y 400 °C, estuvo asociada a la degradación de proteínas y otros componentes orgánicos presentes, con una pérdida de masa de aproximadamente un 30% (Figura 7D).

Por otro lado, la biotinta de ALG5-GEL5-nHA10 presentó una pérdida de masa reducida (aproximadamente 30%) en la descomposición térmica (Figura 7E). Finalmente, el TGA de la biotinta con L-PRF en su estructura (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF, Figura 7F) mostró una estabilidad térmica intermedia, con una pérdida de masa inicial significativa debido a la presencia de agua y compuestos orgánicos, mientras que la descomposición térmica a temperaturas más altas ocurrió en varias etapas, con una pérdida de masa total de aproximadamente 35 %. En general, Los resultados de TGA indican que las biotintas muestran un comportamiento térmico intermedio, con la nanohidroxiapatita mejorando la estabilidad térmica y la presencia de L-PRF favoreciendo la degradación a temperaturas más bajas, mientras que la gelatina y el alginato mejoran la estabilidad térmica en combinación con estos materiales.

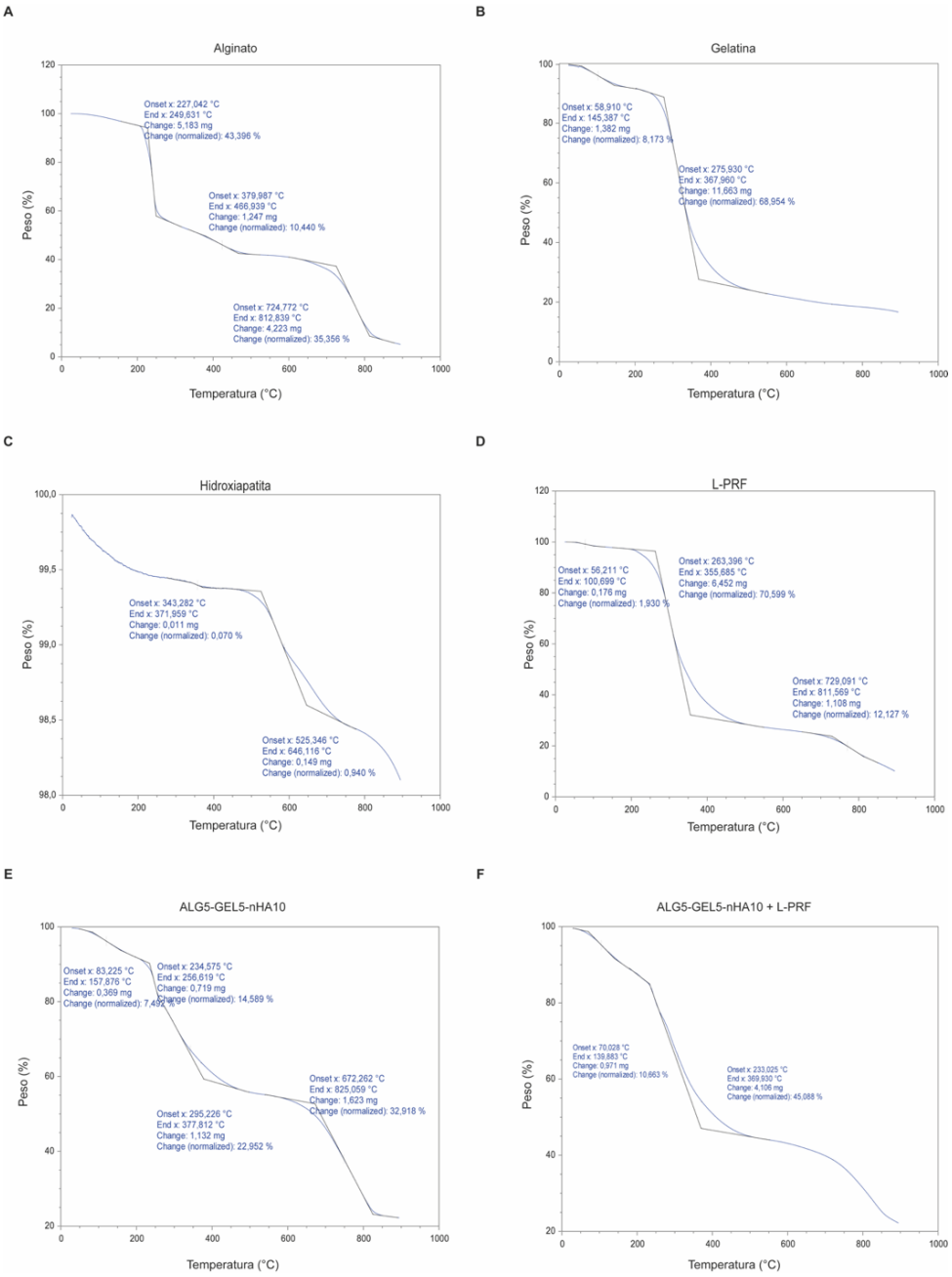


Figura 7. Análisis termogravimétrico (TGA) de los materiales estudiados destacó la alta estabilidad térmica de la nanohidroxiapatita (nHA). (A) Alginato, (B) Gelatina, (C) Nanohidroxiapatita, (D) L-PRF, (E) Biotinta de alginato, gelatina e nanohidroxiapatita (ALG5-GEL5-nHA10) y (F) Biotinta de alginato, gelatina e nanohidroxiapatita y L-PRF (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF). Los resultados muestran el comportamiento térmico y la estabilidad de cada material y sus combinaciones.

7.5. Análisis calorimétrico diferencial (DSC)

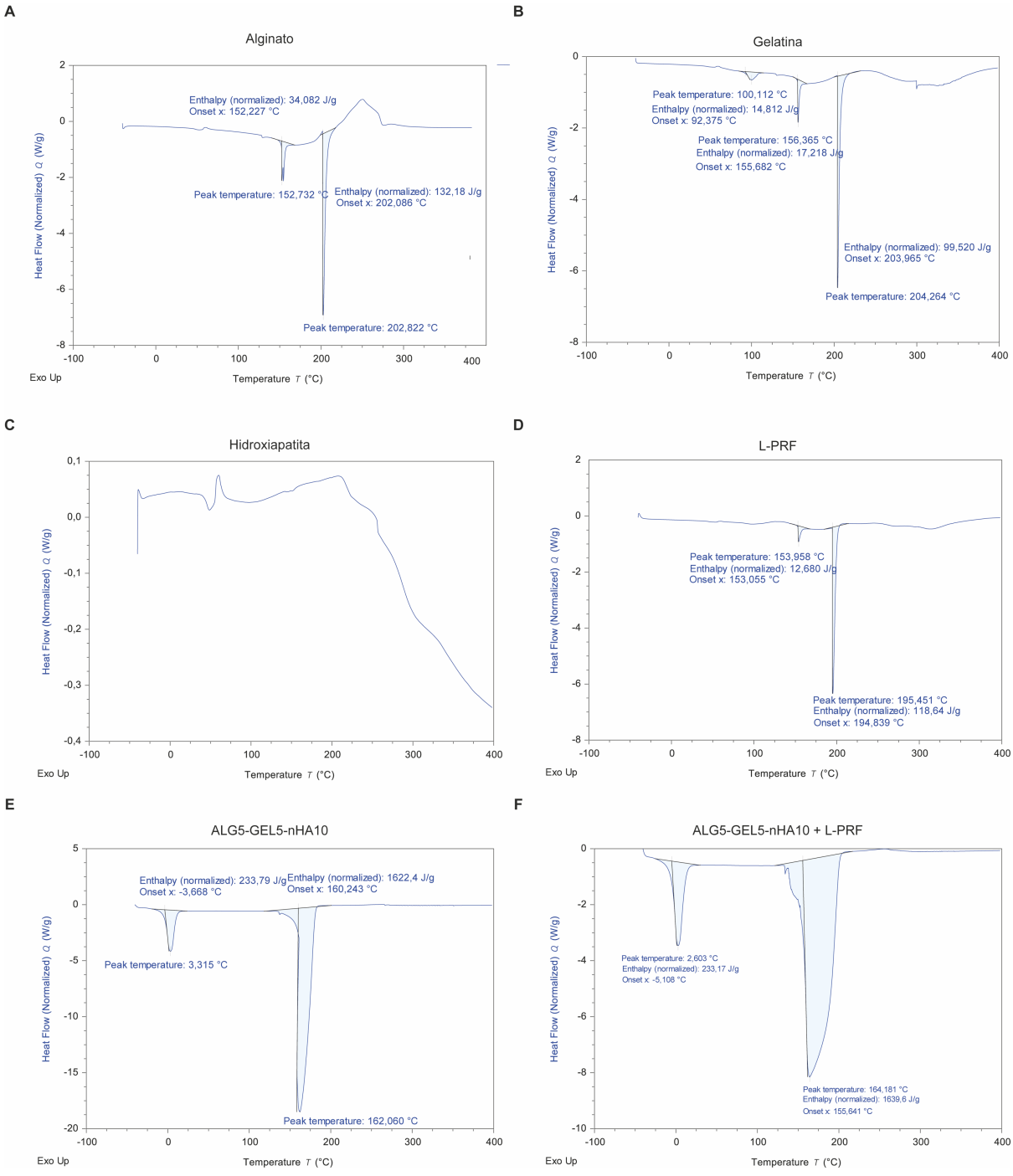


Figura 8. Análisis calorimétrico diferencial (DSC) de los materiales estudiados destacó la alta estabilidad térmica de la nanohidroxiapatita (nHA) en la adición a las biotintas. (A) Alginato, (B) Gelatina, (C) Nanohidroxiapatita, (D) L-PRF, y (E)

Combinación de los materiales (alginato, gelatina, nanohidroxiapatita y L-PRF). Los resultados muestran las transiciones térmicas y las características térmicas de cada material y sus combinaciones.

El análisis calorimétrico diferencial (DSC) se utilizó para evaluar las transiciones térmicas de los materiales, proporcionando información sobre sus temperaturas de fusión, cristalización y transiciones vítreas (Mirek et al., 2023). El DSC del alginato mostró una transición endoterma a aproximadamente 152 °C, que se atribuye a la deshidratación del material, seguida de un segundo pico endoterma a aproximadamente 202 °C, correspondiente a la descomposición térmica de la cadena polimérica de alginato (Figura 8A).

La gelatina mostró un comportamiento térmico caracterizado por un pico endoterma a cerca de 100 °C, asociado a la deshidratación, seguido de un pico exoterma a alrededor de 213 °C, lo que corresponde a la desnaturalización de las proteínas y la ruptura de la estructura del colágeno (Figura 8B). El DSC de la nanohidroxiapatita (nHA) mostró una curva casi plana, lo que indica su alta estabilidad térmica, sin transiciones significativas dentro del rango de temperatura analizado (Figura 8C).

El análisis térmico de L-PRF mostró un pico endoterma a aproximadamente 153 °C, asociado con la eliminación de agua libre y la deshidratación del material. Además, se observó un pico exoterma cerca de 200 °C, correspondiente a la degradación térmica de las proteínas y otros componentes orgánicos presentes en el L-PRF, lo que refleja la descomposición de las fracciones proteicas y lipídicas contenidas en el material (Figura 8D). La biotinta de alginato, gelatina e nanohidroxiapatita (ALG5-GEL5-nHA) mostró una transición térmica similar, pero con un leve desplazamiento hacia temperaturas más altas en la descomposición, lo que sugiere que existe interacción entre los componentes y resulta en un aumento de la estabilidad térmica del sistema (Figura 8E).

Finalmente, la biotinta alginato, gelatina, nHA y L-PRF (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF) mostró un comportamiento térmico más complejo, con varios picos endo y exo térmicos en el rango de temperatura analizado, lo que refleja una mayor interacción de los componentes y la influencia mutua en sus propiedades térmicas (Figura 8F).

7.6. Citotoxicidad de las tintas

La citotoxicidad de las composiciones de los andamios fue evaluada con células HDFn utilizando el reactivo alamarBlue. Al día 1, las células fueron viables en todas las composiciones evaluadas y mostraron una viabilidad significativamente mayor en comparación con el control ($p < 0.0001$); a pesar de esto, hubo diferencias significativas entre las composiciones (Figura 9 A).

Al tercer y séptimo día, se observaron diferencias significativas entre las diferentes composiciones, demostrando que un aumento en la fase inorgánica generaba más células viables: ALG5-GEL5-nHA10 (120.3% y 128%, p<0.0001), ALG5-GEL5-nHA5 (111.7% y 120%, p<0.0001) y ALG5-GEL5-nHA1 (99.08% y 113.7%, p = 0.0028), en comparación con la composición sin nanohidroxiapatita ALG5-GEL5 (94.78% y 108.9%, p=0.002) y el control (100%, p < 0.0001). Estos resultados muestran que todas las composiciones evaluadas no fueron citotóxicas y que el aumento de la fase inorgánica resultó en una mayor viabilidad celular (Figura 9 A-C).

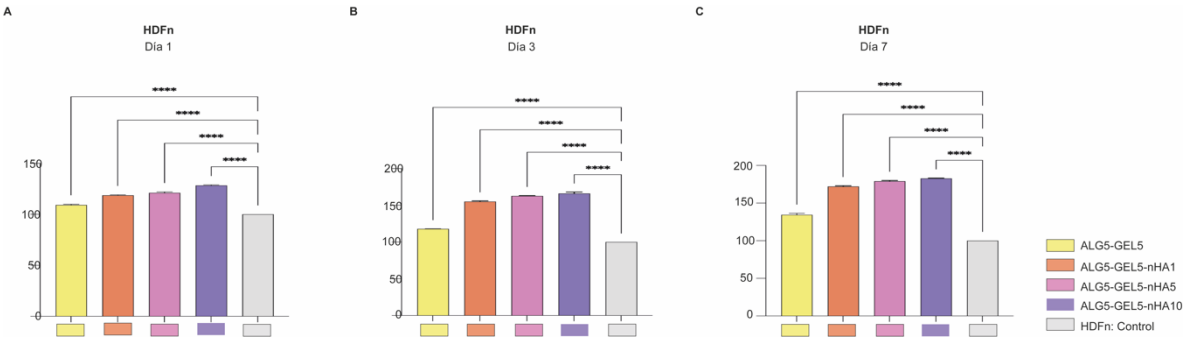


Figura 9. Viabilidad celular. No se observó citotoxicidad en ninguna de las biotintas evaluadas utilizando Alamar Blue en células HDFn. (A) Viabilidad celular al día 1, mostrando mayor viabilidad en todas las composiciones en comparación con el control (p < 0.0001), con diferencias significativas entre las composiciones. (B-C) Viabilidad celular al día 3 y 7, demostrando que un mayor contenido de nanohidroxiapatita (nHA) aumentó significativamente la viabilidad celular en las composiciones ALG5-GEL5-nHA10, ALG5-GEL5-nHA5 y ALG5-GEL5-nHA1 en comparación con ALG5-GEL5 y el control (p < 0.0001). Todos los andamios fueron no citotóxicos, con una tendencia positiva relacionada con la fase inorgánica. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos.

La citotoxicidad en DPSC fue evaluada en la biotinta escogida con L-PRF mediante MTS. Al día 1, las células fueron viables en todas las composiciones analizadas, mostrando una viabilidad significativamente mayor en comparación con el control (p < 0.0001); no obstante, se observaron diferencias significativas entre las biotintas evaluadas (Figura 10 A). Al tercer y séptimo día, las diferencias entre las composiciones fueron aún más marcadas, destacándose la biotinta ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF, que presentó la mayor viabilidad celular (185% y 190.8%, p < 0.0001), seguida de ALG5-GEL5-nHA10 (162.3% y 175.6, p < 0.0001), mientras que ALG5-GEL5 mostró viabilidades menores (123% y 134.3%, p = 0.003). Estos resultados indican que ninguna de las biotintas fue citotóxica y que la incorporación de L-PRF, promovió una viabilidad celular significativamente superior (Figura 10 A-C).

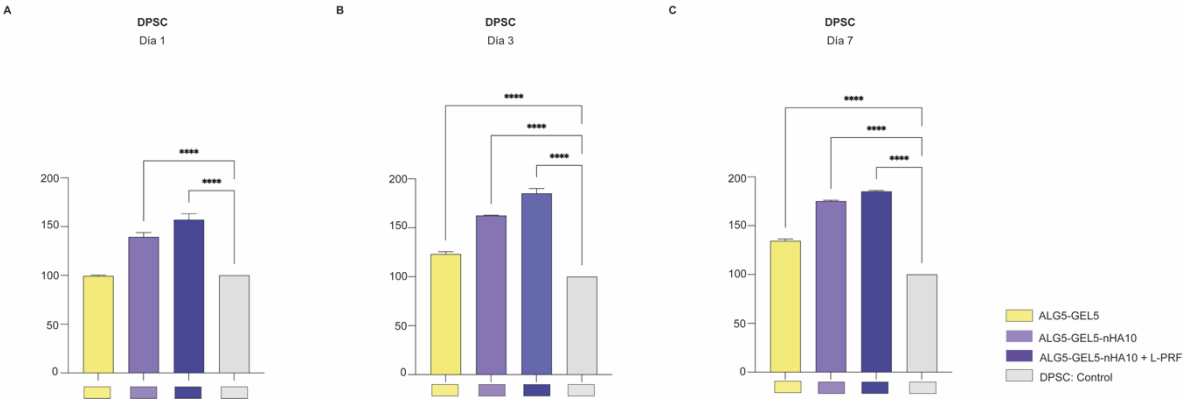


Figura 10. Evaluación de la citotoxicidad de biotintas en DPSC mediante MTS. (A) Al día 1, todas las biotintas mostraron viabilidad celular significativamente mayor en comparación con el control ($p < 0.0001$), con diferencias significativas entre ellas. (B-C) Al día 3 y 7, la biotinta ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF presentó la mayor viabilidad celular. Estos resultados confirman que ninguna biotinta fue citotóxica y resaltan la influencia positiva del L-PRF en la viabilidad celular. ALG: Alginato, GEL: Gelatina, HA: Nanohidroxiapatita. L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos. ***$p < 0.0001$ ****$p < 0.0001$. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos.

Objetivo 2

7.7. Impresión 3D

7.7.1. Comportamiento de hinchamiento y degradación de los andamios impresos en 3D

Los resultados del ensayo de hinchamiento y degradación de los andamios impresos se muestran en la Figura 11 A-E. Todos los andamios mostraron un hinchamiento significativo a las 24 horas ($p < 0.0001$). El mayor porcentaje de hinchamiento fue presentado por la biotinta ALG5-GEL5 (117.41%, $p < 0.0001$), seguido de ALG5-GEL5-nHA1 (108.55%, $p < 0.0001$), ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (103.67%, $p < 0.0001$), ALG5-GEL5-nHA5 (100.58%, $p < 0.0001$), y ALG5-GEL5-nHA10 (98.70%, $p < 0.0001$). Estos resultados sugieren que el aumento de la fase inorgánica (adición de nanohidroxiapatita) reduce la capacidad de hinchamiento de los andamios impresos. Asimismo, que la adición de L-PRF aumenta la capacidad de hinchamiento en la biotinta de ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (Figura 11F)

Posteriormente, se observó que todos los andamios comenzaron su degradación después de tres días de inmersión (Figura 11G). La composición con el mayor

porcentaje de degradación fue ALG5-GEL5 (42%, p < 0.0001), seguida de ALG5-GEL5-nHA1 (23.67%, p < 0.0001), ALG5-GEL5-nHA5 (19.67%, p < 0.0001), ALG5-GEL5-nHA10 (16.67%, p < 0.0001) y ALG5-GEL5-nHA10 (15.17%, p < 0.0001). Estos resultados también sugieren que el aumento de la fase inorgánica redujo la tasa de degradación de los andamios impresos, además de la adición de L-PRF.

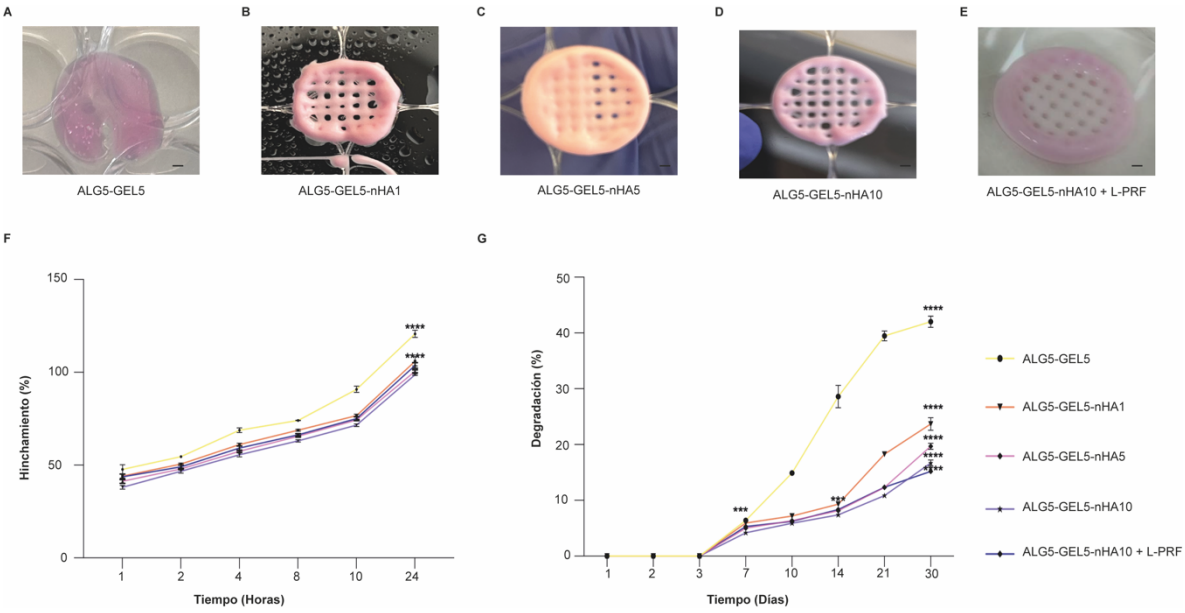


Figura 11. Perfiles de hinchamiento y degradación de los andamios impresos. A) ALG5-GEL5; B) ALG5-GEL5-NHA1; C) ALG5-GEL5-NHA5; D) ALG5-GEL5-NHA10; E) Cuantificación del porcentaje de hinchamiento; F) Cuantificación del porcentaje de degradación. ALG: Alginato, GEL: Gelatina, nHA: Nanohidroxiapatita, L-PRF: Fibrina rica en plaquetas y leucocitos. *** p <0.001 **** p <0.0001. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos. Barra escala: 1 mm.

7.7.2. Caracterización física de los andamios mediante SEM

Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de los andamios bioimpresos en 3D mostraron detalles de su morfología a diferentes aumentos. A un aumento de 40x, se observó la estructura general del andamio, con una distribución porosa característica del diseño impreso en 3D, con poros de tamaño de 1mm (Figura 12 A). A un aumento de 80x, la imagen reveló una resolución mayor de las interconexiones entre las fibras del andamio, mostrando la textura definida de las paredes de los poros y se observó una estructura rugosa propia de andamios con nanohidroxiapatita (Figura 12B). A un aumento de 800x, la resolución permitió observar las partículas de nanohidroxiapatita en la superficie (Figura 12C). En resumen, los resultados obtenidos mediante SEM indican que los andamios impresos en 3D presenta una buena fidelidad de forma y el modelo como el digital. El análisis de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX), donde se observaron

elementos como el carbono (C) en un porcentaje de 60%, el oxígeno (O) en un porcentaje de 30%, el Calcio (Ca) en un porcentaje de 4.1%, el Sodio (Na) en un porcentaje de 2%, elementos presentes en el andamio impreso de ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (Figura 12D).

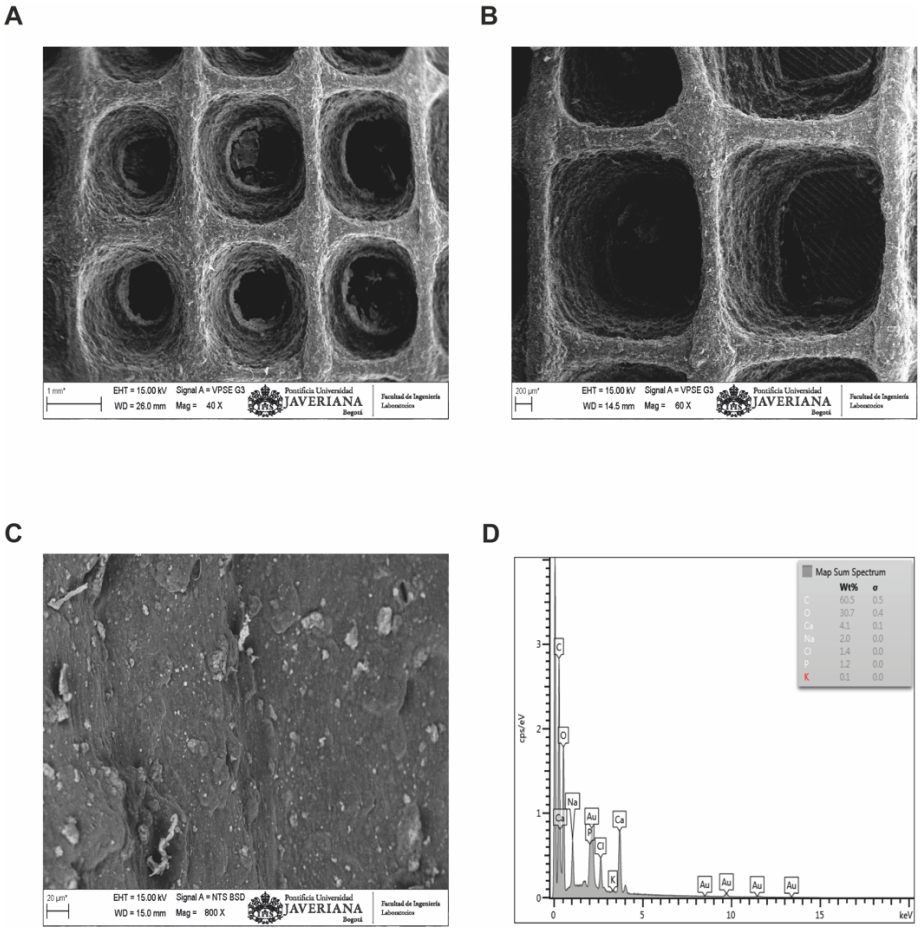


Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los andamios bioimpresos en 3D. (A) Estructura general del andamio a un aumento de 40x, mostrando una distribución porosa con poros de tamaño de 1 mm. (B) Interconexiones entre fibras del andamio a un aumento de 80x, con textura definida de las paredes de los poros y una estructura rugosa característica de los andamios con nanohidroxiapatita. (C) Partículas de nanohidroxiapatita observadas a un aumento de 800x. (D) Análisis de dispersión de energía por rayos X (EDX), donde se observan elementos como el carbono (C) en un porcentaje de X% y el oxígeno (O) en un porcentaje de Y%, confirmando la composición de los andamios.

7.7.3. Cuantificación de factores de crecimiento mediante Luminex

Para cuantificar los factores de crecimiento liberados por el L-PRF presentes en los andamios impresos en 3D se utilizó la técnica Luminex. Para ello, se obtuvieron medios condicionados obtenidos después de 24 horas de inmersión de cada uno de los andamios obtenidos y como control positivo se usó medio condicionado de un coágulo de L-PRF. El PDGF-BB (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas) presentó una liberación significativa durante todo el período de análisis (21 días, Figura 13A). En el día 1, se registraron 820.5 pg/mL ($p < 0.001$), alcanzando su nivel más alto en el día 3 con 911 pg/mL ($p < 0.001$), para luego disminuir gradualmente: 620 pg/mL en el día 7 ($p < 0.001$), 319 pg/mL en el día 14 ($p < 0.0001$) y 99 pg/mL en el día 21 ($p < 0.0001$), aunque aún detectables, lo que sugiere una liberación controlada, en comparación con el control de medio condicionado con L-PRF (1658 pg/mL).

El EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) mostró concentraciones más altas en los primeros días, con 132.5 pg/mL en el día 1 ($p < 0.0001$) y un pico de 155 pg/mL en el día 3 ($p < 0.0001$), seguido de una disminución a 155 pg/mL en el día 7 ($p < 0.0001$), 67 pg/mL en el día 14 ($p < 0.0001$), manteniéndose detectables hasta el día 21 (15.5 pg/mL, $p < 0.0001$), en comparación con el control de medio condicionado con L-PRF (224.3 pg/mL, Figura 13B).

El VEGF-C (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) mostró niveles bajos entre los factores estudiados, con 318 pg/mL en el día 1 ($p < 0.0001$), alcanzando su mayor concentración en el día 3 con 390 pg/mL ($p < 0.0001$), y descendiendo progresivamente a 238.5 pg/mL en el día 7 ($p < 0.0001$), 103 pg/mL en el día 14 ($p < 0.0001$) y 44 pg/mL en el día 21 ($p < 0.0001$), en comparación con el control de medio condicionado con L-PRF (871.3 pg/mL, Figura 13C).

El FGF-B (Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico) mostró niveles relativamente altos en los primeros días: 316.5 pg/mL en el día 1 ($p < 0.0001$) y 427.5 pg/mL en el día 3 ($p < 0.0001$), con una disminución progresiva a partir del día 7 (215.62 pg/mL, $p < 0.0001$), 101.75 pg/mL en el día 14 ($p < 0.0001$) y 50.5 pg/mL en el día 21 ($p < 0.0001$), en comparación con el control de medio condicionado con L-PRF (702 pg/mL, Figura 13D).

El BMP-2 (Proteína Morfogenética Ósea-2) fue el factor con los niveles más bajos, mostrando una liberación sostenida durante los primeros días: 35.45 pg/mL en el día 1 ($p < 0.001$) y 43.5 pg/mL en el día 3 ($p < 0.001$), pero con una disminución significativa hacia el día 7 (16 pg/mL, $p < 0.0001$), y sin presencia detectable en los días 14 y 21, en comparación con el control de medio condicionado con L-PRF (97.2 pg/mL, Figura 13E). En general, estos resultados indican que los andamios impresos en 3D con L-PRF son capaces de liberar de manera controlada y prolongada una variedad de factores de crecimiento, lo que podría tener un impacto significativo en la regeneración de tejidos y la reparación ósea.

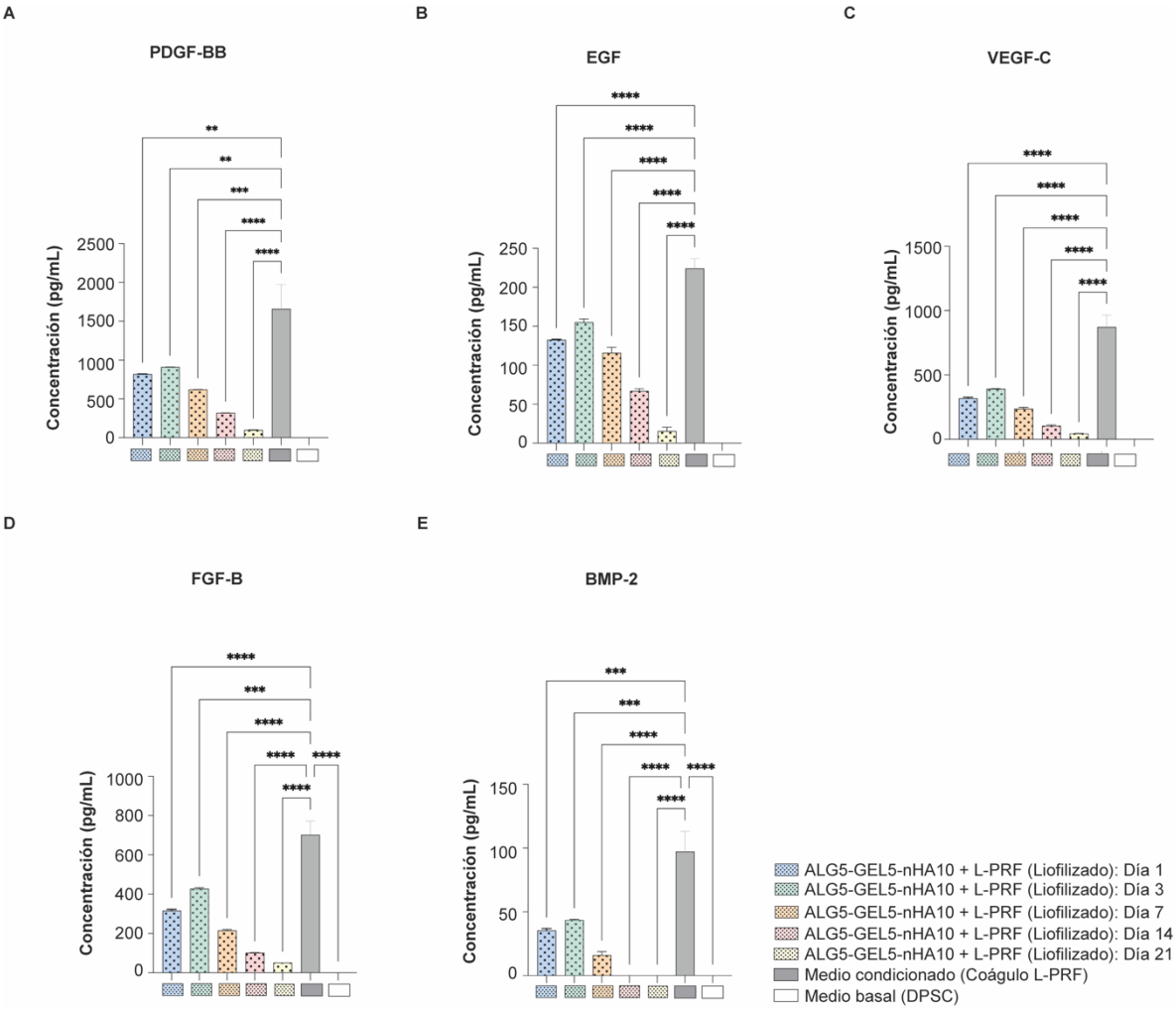


Figura 13. Liberación de factores de crecimiento por los andamios impresos en 3D con L-PRF durante un período de 21 días mediante LUMINEX. (A) PDGF-BB (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas). (B) EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico). (C) VEGF-C (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular). (D) FGF-B (Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico). (E) BMP-2 (Proteína Morfogenética Ósea-2). ****p < 0.0001, ***p < 0.001. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos.

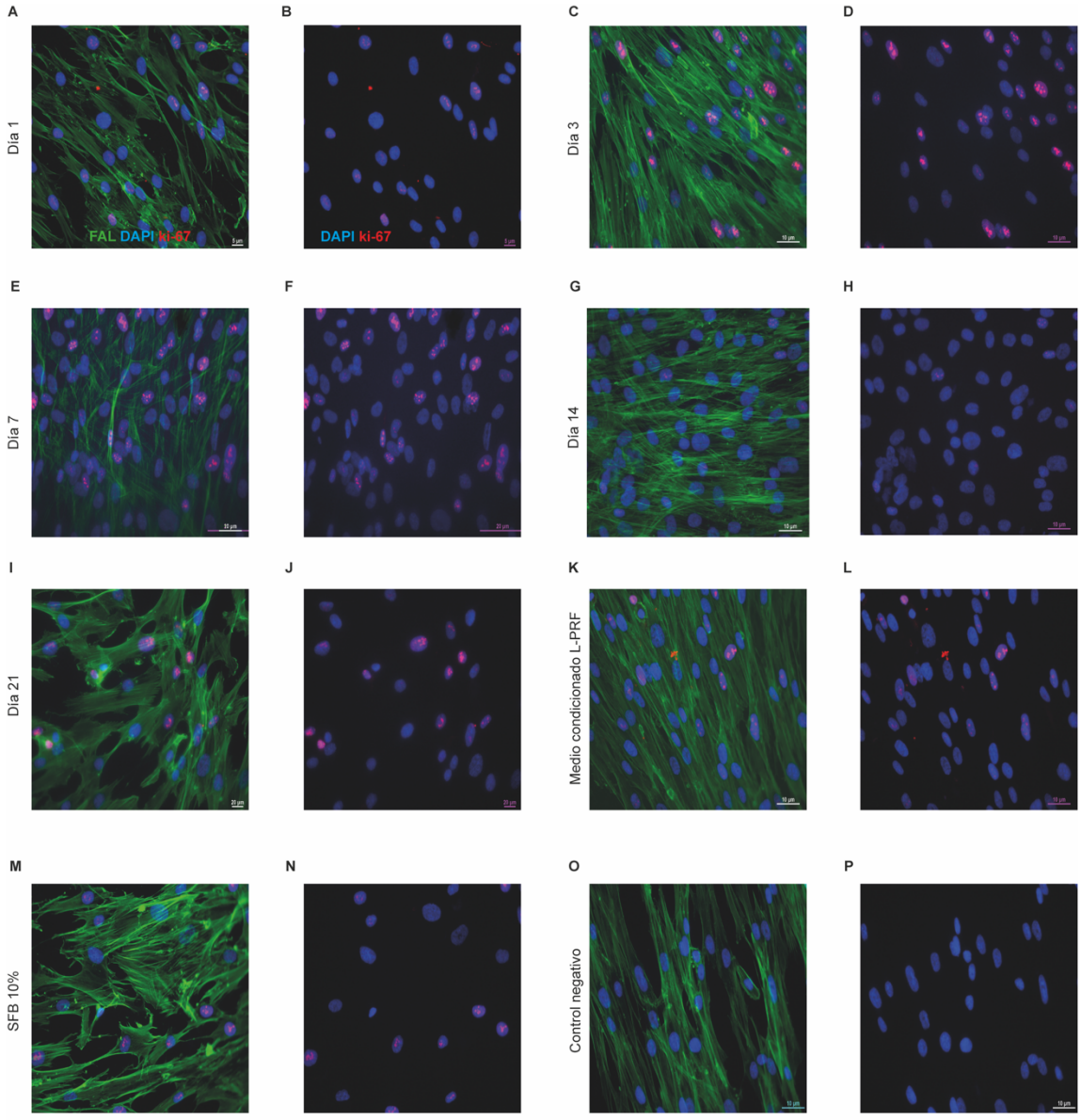
7.7.4. Proliferación Celular

Para evaluar la actividad biológica de los factores de crecimiento previamente evaluados por Luminex en los medios condicionados obtenidos de los andamios, se usó el marcador de proliferación Ki-67 mediante inmunofluorescencia. Se evaluaron los medios condicionados de los andamios impresos de ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF recolectados en los días 1, 3, 7, 14 y 21.

En el día 1, se observó un porcentaje significativamente mayor de proliferación celular (66.6%, $p < 0.0001$, Figura 14A) en comparación con los días posteriores. En el día 3, se redujo el porcentaje de proliferación celular a un 47.3% ($p<0.0001$, Figura 14B), lo que indica que, aunque los factores de crecimiento seguían siendo efectivos, su impacto sobre la proliferación celular comenzó a disminuir con el tiempo. Para el día 7, el porcentaje de proliferación celular se mantuvo relativamente alto (52.6% $p <0.0001$, Figura 14C), pero continuó disminuyendo en los días 14 (27.6%, $p <0.0001$, Figura 14D) y 21 (13.3%, $p<0.0001$, Figura 14E), lo que sugiere una disminución progresiva en la actividad de los factores de crecimiento a medida que pasaban los días.

En el control positivo, es decir el tratamiento con el medio condicionado obtenido a partir de un coágulo de L-PRF se evidenció un porcentaje de proliferación celular significativamente mayor (75.6%, $p<0.0001$, Figura 14F), lo que resalta la alta efectividad inicial de los factores de crecimiento derivados del L-PRF. Este efecto fue superior al observado en el control con SFB al 10%, que mostró un 83% de proliferación celular ($p<0.0001$, Figura 14G).

En resumen, estos resultados indican que la proliferación celular es estimulada por los medios condicionados obtenidos de andamios a los tiempos tempranos evaluados y va disminuyendo con el tiempo.


A
B
C
D
Día 1
Día 3
FAL DAPI ki-67
DAPI ki-67
E
F
G
H
Día 7
Día 14
I
J
K
L
Día 21
Medio condicionado L-PRF
M
N
O
P
SFB 10%
Control negativo

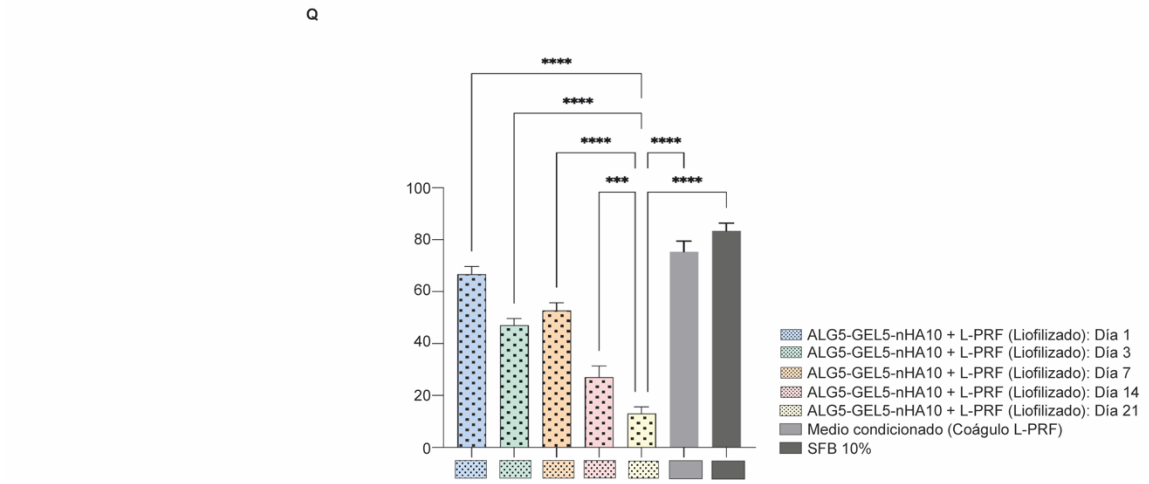

Q
****
****
****
****
***
****
100
80
60
40
20
0
ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (Liofilizado): Día 1
ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (Liofilizado): Día 3
ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (Liofilizado): Día 7
ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (Liofilizado): Día 14
ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF (Liofilizado): Día 21
Medio condicionado (Coágulo L-PRF)
SFB 10%

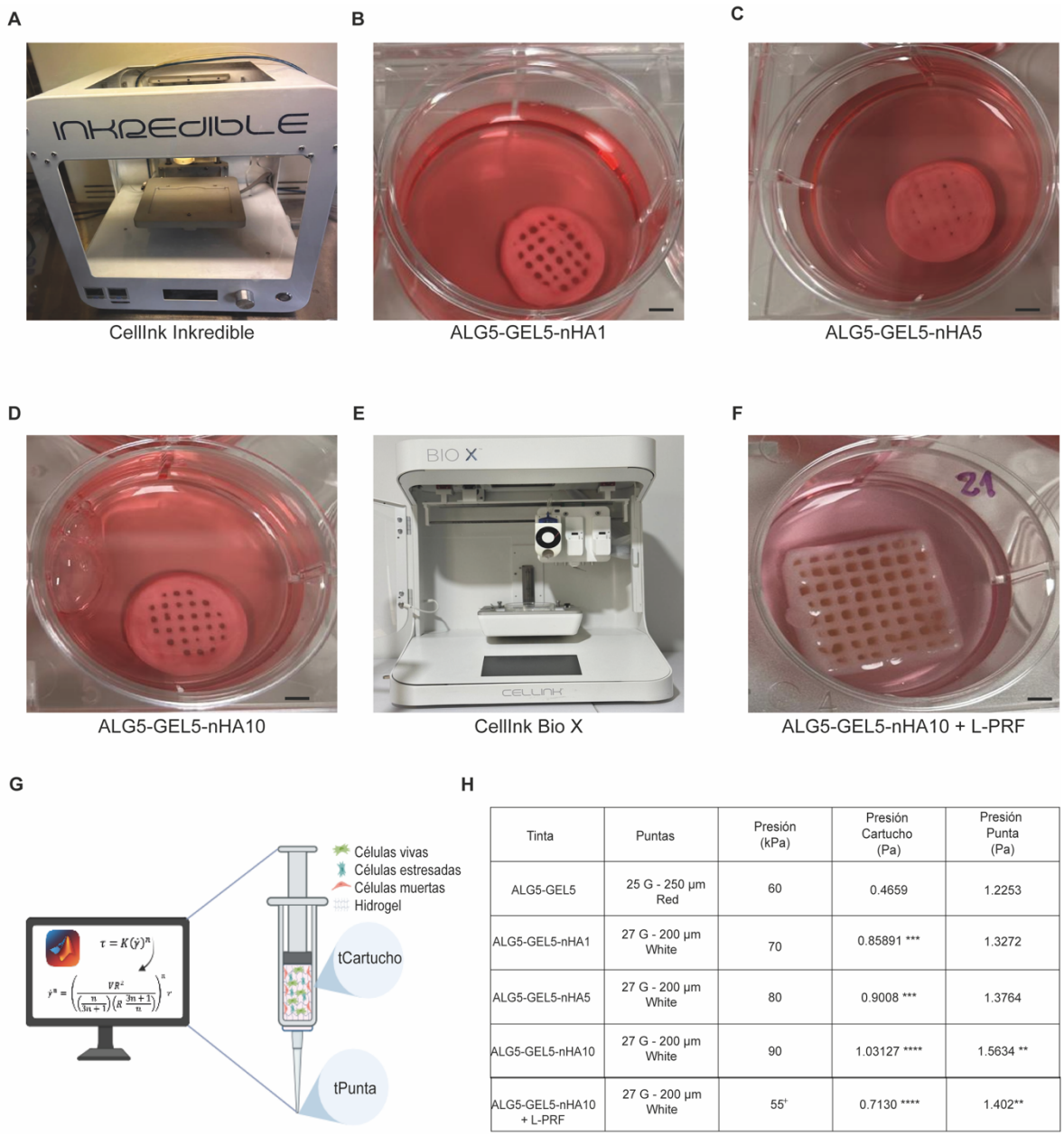
Figura 14. Proliferación celular evaluado mediante tinción inmunohistoquímica con Ki-67. En medio concentrado liofilizado de andamios de ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF a: (A, B) Día 1; (C, D) Día 3; (E, F) Día 7; (G, H) Día 14; (I, J) Día 21; (K, L) Medio condicionado con coágulo de L-PRF; (M, N) SFB al 10%; (O, P) Control negativo; (Q) Porcentaje de células proliferando en los días 1, 3, 7, 14 y 21. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos.

7.8. Bioimpresión 3D

7.8.1. Presiones

Los andamios fueron impresos con las impresoras CellInk Inkredible y BioX (Figura 15 A-F). La tasa de flujo, la presión y el esfuerzo cortante experimentado por las células al pasar a través del cartucho y la punta de la impresora pueden afectar significativamente su supervivencia y funcionalidad (Banda Sánchez et al., 2023). Este estudio analizó estos parámetros para optimizar el proceso de bioimpresión para biotintas específicas. Los resultados obtenidos a partir de los cálculos realizados con las Ecuaciones (3) a (5) se muestran en la Figura 15H.

A medida que aumentó la concentración de nHA y su combinación con L-PRF, también lo hizo la presión de extrusión. Esto se puede atribuir a la mayor viscosidad del material, que resulta de la presencia del componente nHA. La incorporación de nHA elevó significativamente la presión de extrusión dentro del cartucho de impresión en comparación con las biotintas sin nHA (ALG5-GEL5), para todas las biotintas que contenían nHA y la combinada con L-PRF (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF). Sin embargo, no hubo cambios significativos en la presión en la punta para las biotintas que contenían 1% y 5% de nHA (ALG5-GEL5-nHA1 y ALG5-GEL5-nHA5). Se observó un aumento leve pero significativo en la presión para la biotinta con la mayor concentración de nHA (ALG5-GEL5-nHA10, $p < 0.01$) y la combinada con L-PRF (ALG5-GEL4-nHA10 + L-PRF, $p<0.01$) (Figura 15G-H).



Tinta	Puntas	Presión (kPa)	Presión Cartucho (Pa)	Presión Punta (Pa)
ALG5-GEL5	25 G - 250 µm Red	60	0.4659	1.2253
ALG5-GEL5-nHA1	27 G - 200 µm White	70	0.85891 ***	1.3272
ALG5-GEL5-nHA5	27 G - 200 µm White	80	0.9008 ***	1.3764
ALG5-GEL5-nHA10	27 G - 200 µm White	90	1.03127 ****	1.5634 **
ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF	27 G - 200 µm White	55'	0.7130 ****	1.402**

Figura 15. Análisis de presión en la punta de la boquilla y la jeringa durante la extrusión. (A) Impresora Cellink Inkredible. (B-D, F) Diferentes formulaciones de andamios evaluadas: ALG5-GEL5, ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5, ALG5-GEL5-nHA10 y ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF. (E). Impresora Cellink Bio x. (G) Simulación de la distribución de presión dentro del cartucho y en la punta de la boquilla, realizada con MATLAB, destacando las fuerzas mecánicas ejercidas sobre las células durante el proceso de extrusión. (H) Comparación de las presiones de extrusión en la punta de la boquilla y en la jeringa para distintas formulaciones de biotintas: ALG5-GEL5, ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5, ALG5-GEL5-nHA10 y ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF. Los niveles de significancia estadística están indicados como: ** p = 0.025, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. n=3. Barra escala: 2 mm.

7.8.2. Live/Dead

La viabilidad celular en los andamios bioimpresos con células HDFn se evaluó utilizando el ensayo LIVE/DEAD después de 24 h y 7 días. Las imágenes representativas mostraron que todos los andamios impresos (ALG5-GEL5-nHA1, ALG5-GEL5-nHA5 y ALG5-GEL5-nHA10) exhibieron una viabilidad superior al 80% (Figura 14A–F). El andamio con 10% de nHAp mostró la mayor viabilidad, con un 90% a las 24 h ($p < 0.0001$, Figura 16G) y un 92% a los 7 días ($p < 0.001$, Figura 16H). La presencia de nanohidroxiapatita no afectó negativamente la viabilidad celular, lo que sugiere que las condiciones modificadas de extrusión son compatibles con el mantenimiento de la viabilidad celular durante la bioimpresión.

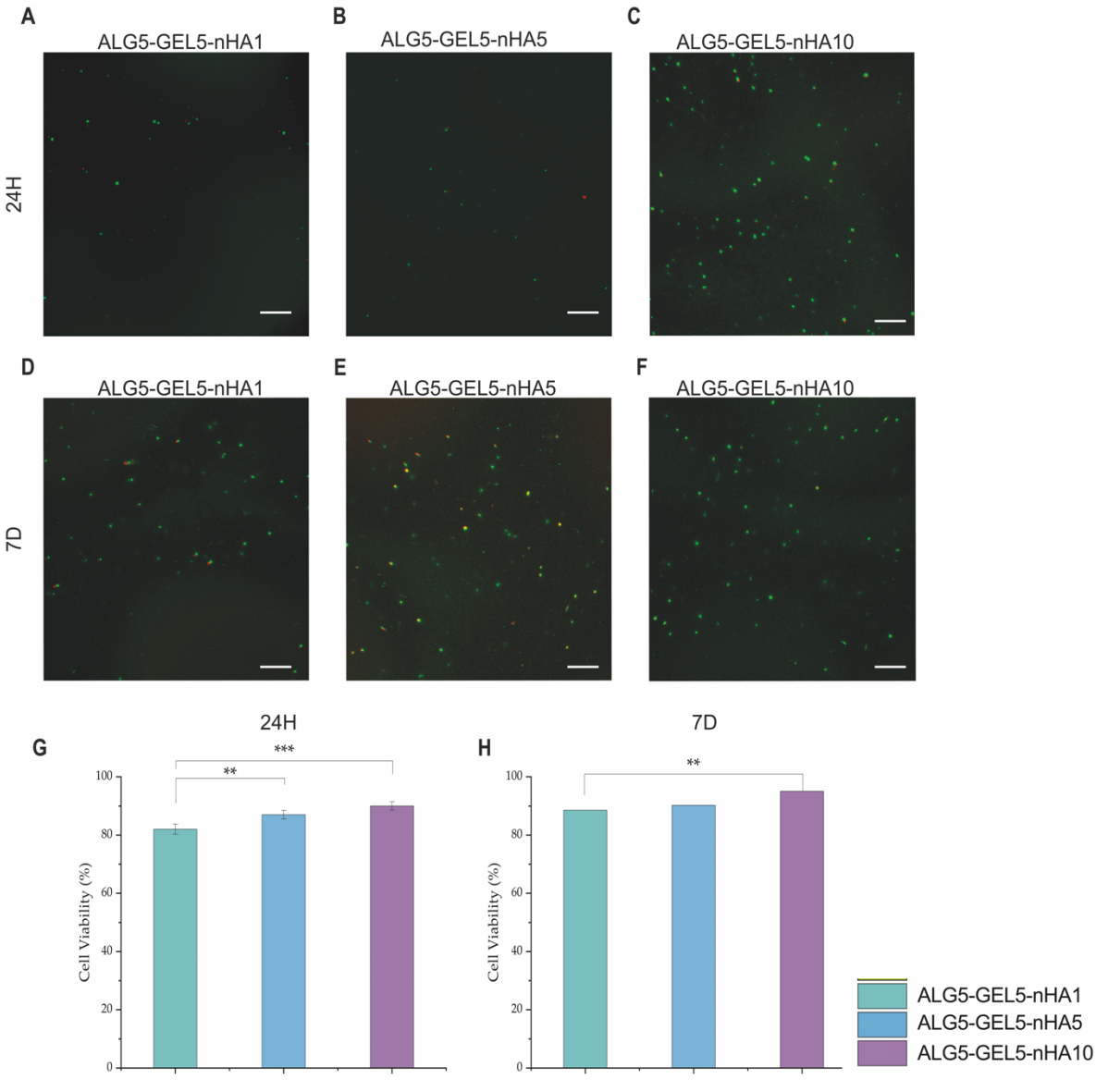


Figura 16. Imágenes representativas del ensayo Live/Dead y cuantificación de viabilidad celular. Las imágenes muestran células HDFn en formulaciones de biotintas después de (A, D) 24 h y (B, E) 7 días de bioimpresión, con las siguientes composiciones: (A, D) ALG5-GEL5-nHA1, (B,E) ALG5-GEL5-nHA5 y (C,F) ALG5-GEL5-nHA10. El análisis cuantitativo de la viabilidad celular se presenta en (G) para 24 h y en (H) para 7 días post-bioimpresión. Abreviaturas: ALG (alginato), GEL (gelatina), nHA (nanohidroxiapatita). La significancia estadística se indica como ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos (Anaya-Sampayo, Roa, et al., 2024, Anexo 5).

La viabilidad celular en los andamios bioimpresos con la biotinta seleccionada de (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF) fue evaluada mediante el ensayo LIVE/DEAD a los 1, 3, 14 y 21 días después de la bioimpresión, comparando los andamios impresos en 3D (con células inyectadas en el material) y los bioimpresos (con células impresas junto al material). A las 24 horas, se observó una diferencia significativa en la viabilidad celular entre ambos grupos, siendo mayor en los andamios bioimpresos (70%) en comparación con los impresos en 3D (45%) ($p < 0.0001$. figura 17 A, E). A los 3 días, la viabilidad celular en ambos grupos se igualó, mostrando un 80% en los andamios impresos en 3D y un 79% en los bioimpresos, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 17 B, F).

A los 14 días, se observó una diferencia significativa, con una viabilidad de 98% en los andamios impresos en 3D y de 89% en los bioimpresos ($p < 0.05$, Figura 17 C, G). Sin embargo, a los 21 días, no hubo diferencias significativas, con una viabilidad del 98% en los andamios impresos en 3D y del 97% en los bioimpresos (Figura 17 D, H). Estos resultados sugieren que la bioimpresión no afecta negativamente la viabilidad celular a largo plazo, y que la incorporación de L-PRF mejora la viabilidad celular en las primeras etapas, con un mantenimiento adecuado de la viabilidad celular en ambos tipos de andamios hasta los 21 días.

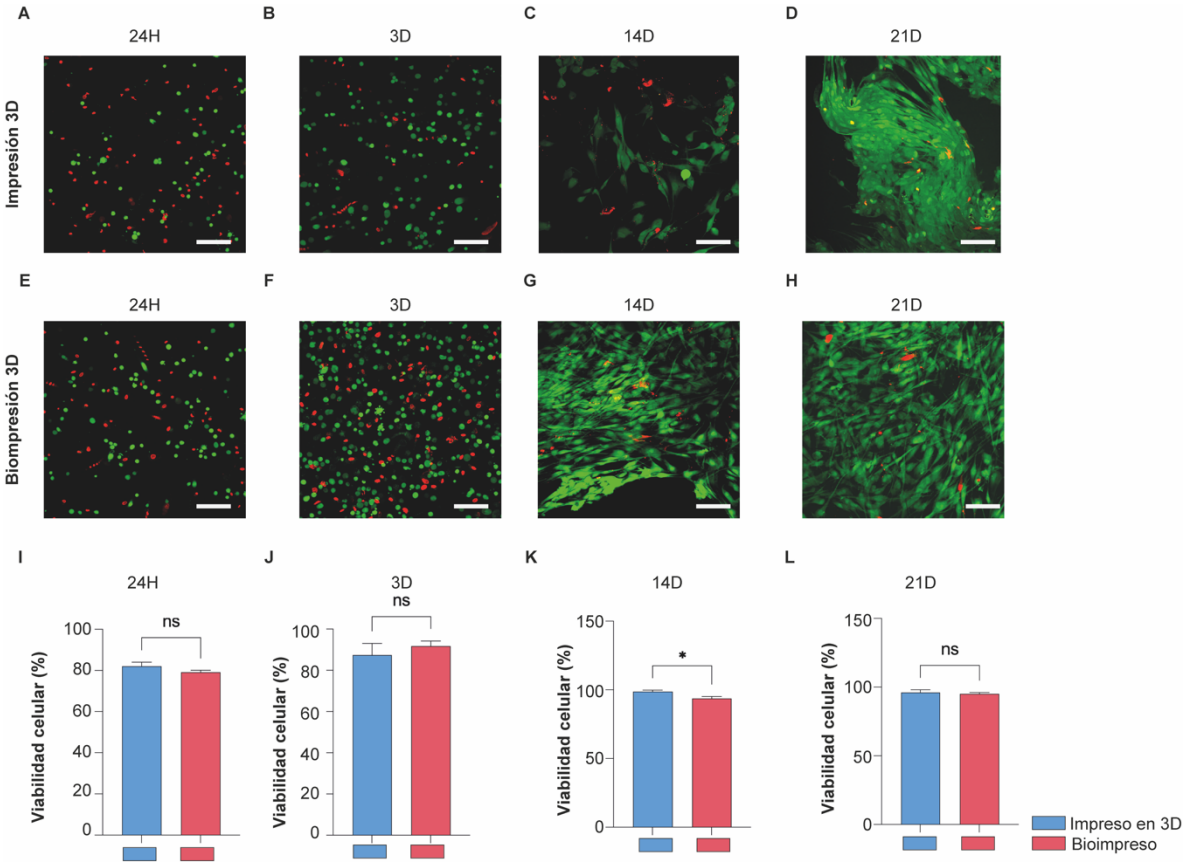


Figura 17. Viabilidad celular en andamios bioimpresos con biotinta ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF evaluada mediante el ensayo LIVE/DEAD a los 1, 3, 14 y 21 días después de la impresión. Los andamios impresos en 3D a (A 24 horas; (B) 3 días; (C) 14 días y (D) 21 días. Los andamios bioimpresos a (E) 24 horas; (F) 3 días; (G) 14 días y (H) 21 días. Cálculo de la viabilidad de andamios impresos en 3D y bioimpresos a los (I) 24 h; (J) 7 días; (K) 14 días; (L) 21 días. * $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. n=2. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos.

Objetivo 3

7.9. Expresión de genes relacionados con la diferenciación osteogénica

Para evaluar y comparar la diferenciación ósea de las DPSC cultivadas sobre andamios impresos en 3D y bioimpresos a los días 1, 7, 14 y 21, se evaluó mediante RT-PCR en tiempo real la expresión de genes involucrados durante este proceso. En el caso del gen maestro de la osteogénesis ***RUNX2***, un marcador clave de la osteogénesis, se observó una progresión significativa en su expresión a lo largo del tiempo. En el día 1 no se detectó expresión de este gen en ninguna de las condiciones analizadas. Sin embargo, a partir del día 7, los andamios bioimpresos mostraron una expresión significativamente mayor de ***RUNX2*** (7.83) en comparación con los andamios impresos en 3D (4.87), alcanzando una diferencia significativa a lo largo del

seguimiento, especialmente a los 21 días, cuando los andamios bioimpresos presentaron los niveles más altos de expresión (18.63, $p < 0.0001$). Este hallazgo sugiere que los andamios bioimpresos pueden favorecer una mayor activación de los procesos de osteogénesis en comparación con los impresos en 3D (Figura 18A). En relación con el gen ***ALP***, asociado con la actividad de fosfatasa alcalina, un indicador de diferenciación osteoblástica, se observó un aumento progresivo de la expresión a lo largo del tiempo en los andamios bioimpresos.

A los 7 días, los andamios bioimpresos mostraron un aumento en la expresión (9.39), ligeramente superior a los andamios impresos en 3D (8.96) y esta diferencia se hizo más pronunciada a los 21 días, donde los andamios bioimpresos alcanzaron los niveles más altos de expresión (24.87, $p < 0.0001$), aunque sin superar los niveles observados en las células SaOS-2 (control osteoblástico) (Figura 18B).

El gen ***COL1A1***, clave en la formación de la matriz extracelular ósea, mostró una tendencia creciente en ambos tipos de andamios a lo largo del tiempo. A los 14 días, los andamios bioimpresos mostraron un aumento significativo en la expresión de COL1A1 (15.5) en comparación con los andamios impresos en 3D (10.49), y a los 21 días, los andamios bioimpresos presentaron la mayor expresión relativa (44.53, $p < 0.0001$), destacándose sobre los andamios impresos en 3D (38.08, $p < 0.001$) y el control SaOS-2 (36.84, $p < 0.0001$), lo que indica una mayor síntesis de colágeno tipo I en estos andamios a lo largo del tiempo (Figura 18C). En cuanto al gen ***BMP-2***, un factor de crecimiento clave en la diferenciación ósea, se observó una expresión más pronunciada en los andamios bioimpresos a partir de los 14 días, con niveles más altos de expresión en comparación con los andamios impresos en 3D, particularmente a los 21 días, aunque no hubo diferencias significativas en relación con el control SaOS-2. Esto refleja una posible influencia de los andamios bioimpresos en la liberación de factores de crecimiento osteogénicos, lo que puede facilitar la regeneración ósea (Figura 18D).

El gen ***TGF-β***, que regula la diferenciación celular y la formación de matriz extracelular, también mostró una expresión más alta en los andamios bioimpresos, aunque las diferencias no fueron significativas a los 14 días. A los 21 días, la expresión en los andamios bioimpresos (3.21) fue más alta que en los impresos en 3D (1.3), aunque sin diferencias significativas con el control SaOS-2, lo que sugiere que los andamios bioimpresos podrían inducir una mayor modulación de la señalización celular durante la diferenciación osteogénica (Figura 18E). Por otro lado, la expresión del gen ***VEGF***, implicado en la angiogénesis, fue significativamente mayor en los andamios bioimpresos en todos los días analizados, con la mayor diferencia a los 21 días, lo que sugiere un potencial superior de estos andamios para inducir la formación de vasos sanguíneos en el proceso de regeneración ósea (Figura 18F).

La expresión de ***OPN*** (osteopontina), involucrada en la mineralización y adhesión celular, también aumentó en ambos tipos de andamios a lo largo del tiempo,

alcanzando niveles más altos a los 21 días en los andamios bioimpresos (11.4) en comparación con los impresos en 3D (10.62), aunque sin superar los niveles del control SaOS-2. Similarmente, la expresión de **OPG**, que regula la actividad de los osteoclastos, fue más alta en los andamios bioimpresos a los 21 días, lo que sugiere una mayor promoción de la homeostasis ósea por estos andamios (Figura 18G).En cuanto al gen ***OSX***, relacionado con la maduración de los osteoblastos, se observó un patrón de disminución de su expresión en ambos tipos de andamios a lo largo del tiempo, siendo más alta a los 7 días en los andamios bioimpresos (15.43), con una disminución significativa a los 21 días, lo que podría indicar una regulación temporal de la activación osteogénica en los andamios bioimpresos (Figura 18H).

Finalmente, el gen ***OCN***, un marcador de diferenciación osteoblástica mostró un aumento progresivo a lo largo del tiempo, siendo más elevado a los 21 días en los andamios bioimpresos (30.02, $p < 0.0001$) en comparación con los impresos en 3D (21.45, $p < 0.001$). Sin embargo, los niveles de ***OCN*** en el control SaOS-2 fueron significativamente más altos, lo que indica que, aunque los andamios bioimpresos inducen una diferenciación osteoblástica significativa, no alcanzan el nivel de mineralización de las células SaOS-2. En cuanto al gen ***RANKL***, que regula la activación de osteoclastos, no se detectaron cambios significativos en la expresión en ninguno de los tipos de andamios durante el tiempo de cultivo, aunque a los 21 días se observó una leve diferencia en comparación con las células SaOS-2, sugiriendo una regulación moderada de la resorción ósea en estas condiciones.

En conjunto, estos resultados indican que los andamios bioimpresos favorecen la diferenciación osteogénica en comparación con los impresos en 3D, con una expresión más pronunciada de genes clave para la osteogénesis, la angiogénesis y la regulación de la homeostasis ósea, lo que sugiere su potencial en aplicaciones de regeneración ósea.

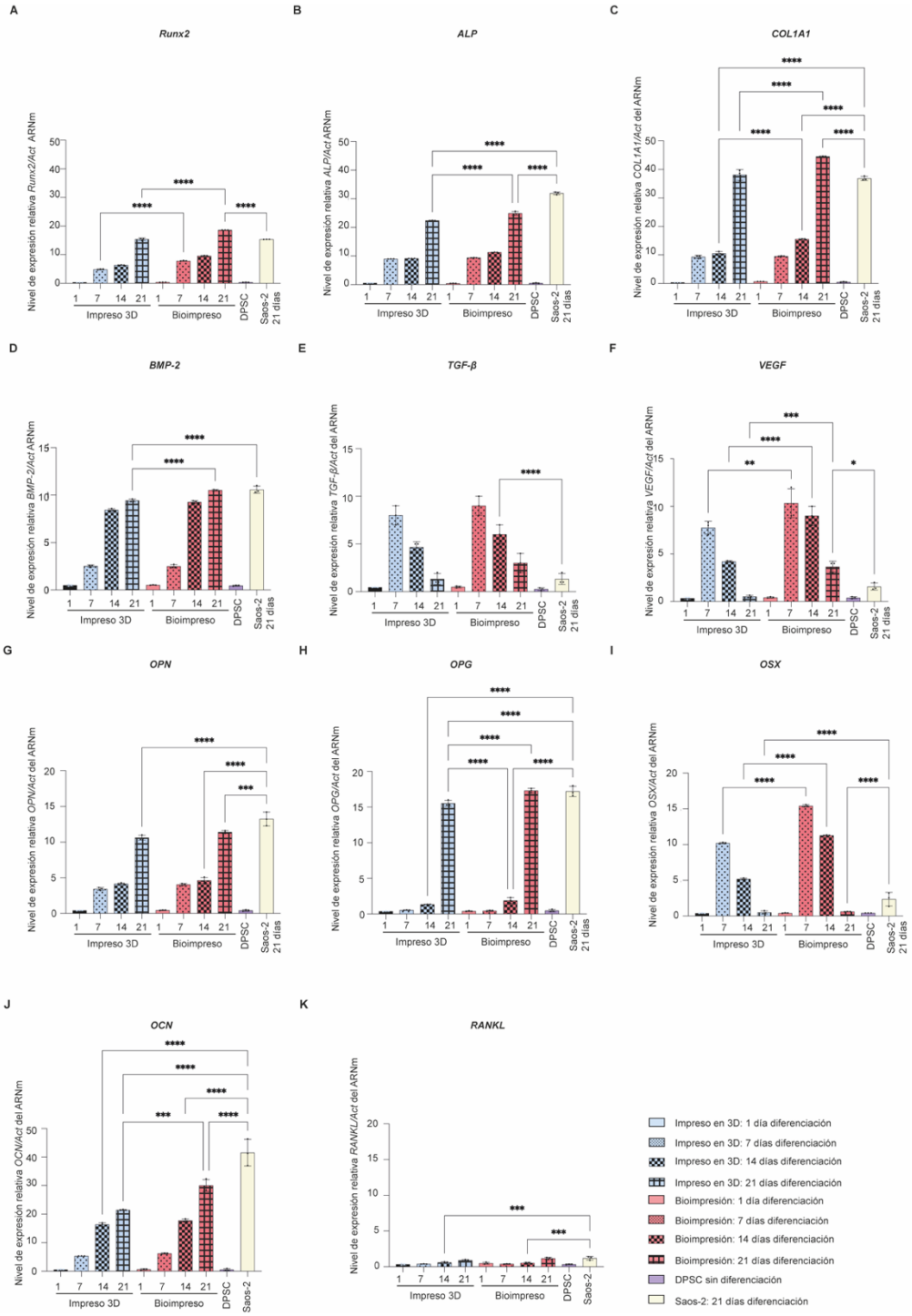


Figura 18. Expresión relativa de los genes RUNX2, ALP, COL1A1, BMP-2, TGF-β, VEGF, OPN, OPG, OSX, OCN y RANKL en andamios bioimpresos e impresos en 3D. La expresión génica se evaluó a los 1, 7, 14 y 21 días de cultivo. (A). Runx2; (B)ALP ;(C) COL11; (D) BMP-2; (E) TGF-B; (F) OPN; (G)OPG; (H) OSX; (I) OCN; (J) RANKL. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, **** p<0.0001. n=3. En las gráficas se representan el promedio y las desviaciones estándar de los datos.

8. DISCUSIÓN

El desarrollo de biotintas para bioimpresión 3D requiere un equilibrio entre las propiedades mecánicas, biológicas y reológicas que permitan mantener la viabilidad celular, la fidelidad estructural y la funcionalidad del andamio impreso (Mobaraki et al., 2020). En este contexto, el comportamiento reológico desempeña un papel fundamental, debido a que influye tanto en el proceso de impresión como en la estabilidad del constructo final (Amorim et al., 2021). Las biotintas a base de alginato y gelatina son altamente versátiles debido a su comportamiento pseudoplástico y su capacidad de entrecruzamiento iónico (Hernández-González, Téllez-Jurado, & Rodríguez-Lorenzo, 2020a; Hernández-González, Téllez-Jurado, & Rodríguez-Lorenzob, 2020). Estas características pueden mejorarse con la incorporación de compuestos inorgánicos como la nanohidroxiapatita (nHA) y componentes bioactivos como el L-PRF, que no solo aumentan la viscosidad y la rigidez estructural, sino que también favorecen un entorno más propicio para la regeneración tisular, lo que las convierte en opciones prometedoras para aplicaciones en medicina regenerativa (Sui et al., 2023).

Los resultados reológicos obtenidos en este estudio coinciden con hallazgos previos reportados por Gao y colaboradores en el 2018 (Gao et al., 2018), quienes describieron el comportamiento pseudoplástico de biotintas compuestas de alginato y gelatina. Además, señalaron que un incremento en el módulo de almacenamiento se traduce en un aumento de la presión necesaria para extruir la biotinta. La incorporación de nHA y L-PRF incrementó significativamente la viscosidad y el índice de consistencia (K), lo que contribuyó a mejorar tanto la estabilidad estructural como la fidelidad geométrica de los andamios impresos, como lo demostrado por estudios similares con una tinta de nanohidroxiapatita, quitosano y L-PRF liofilizado. Sui et al. (2023) demostraron que la adición de L-PRF liofilizado también incrementa la viscosidad del material y el módulo de almacenamiento. Este aumento en la viscosidad favoreció un comportamiento sólido, reflejado en el predominio del módulo de almacenamiento (G') sobre el módulo de pérdida (*G''*), con valores de Tan δ inferiores a 1, cruciales para aplicaciones de regeneración ósea (Le et al., 2023; Sui et al., 2023). La inclusión de nanohidroxiapatita en la composición de la biotinta amplió el rango de la ley de potencias, favoreciendo condiciones de impresión más controladas y precisas.

La capacidad de recuperación viscoelástica de las biotintas tras periodos de estrés demuestra su habilidad para mantener la integridad estructural, comportamiento que coincide con lo reportado en estudios previos (Sui et al., 2023). Además, la gelificación rápida mediada por cloruro de calcio subraya la eficiencia del entrecruzamiento iónico, crucial para conservar las propiedades mecánicas y biológicas durante y después de la impresión (Hernández-González, Téllez-Jurado, & Rodríguez-Lorenzo, 2020b). En cierto modo, también se ha demostrado que la presencia del componente inorgánico induce cambios en las propiedades viscoelásticas, favoreciendo la recuperación de la viscosidad de la tinta y mejorando las condiciones para la impresión. Todas las tintas con nHA mostraron un índice "n" entre 0,47631 y 0,41841, mientras que la velocidad

de cizalladura fue tan baja como 0,2 s^{-1}, resultados similares a los reportados por Sui y colaboradores en el 2023 (Sui et al., 2023).

El espectro de las biotintas analizadas, mostrado en la Figura 6, reveló dos picos en 1426 y 1415 cm^{-1}, además de un pico en 1025 cm^{-1} con un hombro en 1071 cm^{-1}. Los primeros dos picos se atribuyen a las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo –COO, asociados a las sales de ácidos carboxílicos (Valot et al., 2019) y específicos del entrecruzamiento iónico (Saarai et al., 2013), demostrando que la presencia de gelatina e nanohidroxiapatita no inhibe la gelificación iónica del alginato. La incorporación de nanohidroxiapatita, además de su respuesta biológica mejorada, ofrece la posibilidad de modificar la capacidad de hinchamiento del andamio y de modular las cinéticas de degradación (Rodriguez-Lorenzo et al., 2012).

Estos hallazgos coinciden con estudios similares, como los de Schütz et al., que demostraron que las biotintas basadas en alginato mantienen la integridad estructural después de la impresión, confirmando el papel del entrecruzamiento iónico en la preservación de la forma y la estabilidad mecánica del andamio (Benedini et al., 2020; Schütz et al., 2017). Un hallazgo único de esta investigación es que la nanohidroxiapatita no interfiere con el entrecruzamiento iónico del alginato, como lo confirmó el análisis por FTIR. Este resultado está alineado con estudios como los de Benedini et al., que reportaron que la nanohidroxiapatita no afecta la capacidad de gelificación del alginato, pero sí mejora la estabilidad y bioactividad del andamio. Finalmente, el espectro de L-PRF mostró picos asociados a lípidos y proteínas (2922 cm^{-1} y 1650 cm^{-1}), resultados similares fueron reportados por (Mirhaj et al., 2022).

En términos de estabilidad térmica, los análisis termogravimétricos (TGA) y calorimétricos diferenciales (DSC) mostraron que el alginato y la gelatina experimentan pérdida de masa en dos etapas, asociadas a la deshidratación y descomposición térmica de sus cadenas poliméricas, en concordancia con estudios de Mirek y colaboradores (Mirek et al., 2022), donde el análisis DSC reveló que los hidrogeles de alginato-gelatina presentan picos endotérmicos asociados a la deshidratación, transiciones térmicas y enlaces de hidrógeno, con una disminución significativa en muestras reticuladas debido a la formación de enlaces más fuertes (Ca^{2+} y covalentes). La nanohidroxiapatita, por su parte, exhibió una alta estabilidad térmica, con una mínima pérdida de masa incluso a temperaturas elevadas, lo que confirma su resistencia térmica, debido a su estructura cristalina altamente ordenada y la fuerte interacción entre los iones calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}) en su red cristalina. Estos enlaces covalentes y iónicos proporcionan una gran resistencia a la descomposición térmica (Ramesan et al., 2024).

Las biotintas que contenían nanohidroxiapatita (ALG5-GEL5-nHA10) mostraron una mejora en la estabilidad térmica, con transiciones térmicas desplazadas a temperaturas más altas, debido a las propiedades intrínsecas de la nanohidroxiapatita, que presenta una estructura cristalina estable y enlaces fuertes

que incrementan la resistencia al calor (Ramesan et al., 2024). Por otro lado, la biotinta con L-PRF (ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF) mostró un comportamiento térmico más complejo, lo que sugiere interacciones entre sus componentes debido a la presencia de material orgánico, que contiene proteínas y lípidos susceptibles a la desnaturalización y degradación térmica. Estas interacciones entre componentes, como enlaces débiles o modificaciones en la estructura polimérica, generan múltiples transiciones térmicas, reflejando la influencia del material orgánico en la matriz (Mahmud et al., 2023).

En cuanto a la citotoxicidad, se evaluó en las diferentes composiciones de andamios bioimpresos utilizando células HDFn y DPSC. Los resultados obtenidos mediante los ensayos alamarBlue y MTS indicaron que todas las biotintas evaluadas fueron viables, con un aumento significativo en la viabilidad celular en comparación con el control, lo que sugiere que las biotintas no son citotóxicas. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que reportan una viabilidad celular elevada en andamios compuestos por gelatina, alginato y otros materiales inorgánicos, como la nanohidroxiapatita de W.S. Tan (W. S. Tan et al., 2020) que evaluaron hidrogeles compuestos de alginato, nanohidroxiapatita y gelatina en células HDFN y (Park et al., 2020) en DPSC; en los cuales observaron que ninguno de los andamios era citotóxico.

Por otro lado, se observó que la adición de nanohidroxiapatita incrementó la viabilidad celular de manera dosis-dependiente, destacando la biotinta ALG5-GEL5-nHA10, que mostró las mayores viabilidades celulares (120.3% y 128% en células HDFn, y 185% y 190.8% en DPSC). Estos resultados respaldan estudios anteriores que sugieren que la nanohidroxiapatita, al mimetizar las propiedades de la matriz extracelular, puede mejorar la proliferación celular (Y. Tan et al., 2022). Asimismo, la incorporación de L-PRF en la biotinta ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF promovió una mayor viabilidad celular en DPSC en comparación con las biotintas sin L-PRF (162.3% y 175.6%), lo que refuerza la idea que los factores de crecimiento presentes en L-PRF pueden favorecer la regeneración celular (Yi et al., 2022).

Los ensayos de hinchamiento y degradación de los andamios mostraron que la adición de nanohidroxiapatita reduce tanto el hinchamiento como la tasa de degradación, mientras que la incorporación de L-PRF aumenta el hinchamiento, pero no altera significativamente la degradación. Todos los andamios presentaron un hinchamiento importante a las 24 horas. La biotinta ALG5-GEL5 mostró el superior hinchamiento, alcanzando un 117.41%, mientras que las biotintas con mayor contenido de nanohidroxiapatita (ALG5-GEL5-nHA10) presentaron el menor hinchamiento, con un 98.70%, lo que coincide con estudios previos que sugieren que la nanohidroxiapatita mejora la rigidez y reduce la capacidad de hinchamiento de los andamios (Schütz et al., 2017).

En cuanto a la degradación, los andamios con mayor cantidad de nanohidroxiapatita mostraron una menor tasa de degradación, siendo la composición ALG5-GEL5-nHA10

la que presentó mejor esta propiedad (15.17%). Estos resultados concuerdan con la idea de que los materiales inorgánicos, como la nanohidroxiapatita, estabilizan la estructura y disminuyen su degradación (Benedini et al., 2020). Por otro lado, la incorporación de L-PRF en ALG5-GEL5-nHA10 + L-PRF aumentó el hinchamiento, lo que puede atribuirse a la hidratación promovida por los factores de crecimiento presentes en el L-PRF, pero no afectó significativamente la degradación, lo que resalta su potencial para mejorar la viabilidad celular sin comprometer la estabilidad estructural del andamio (Ravi & Santhanakrishnan, 2020).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló que los andamios bioimpresos en 3D tienen una morfología porosa con poros de 1 mm (Figura 12A), característica común en la impresión 3D. A mayores aumentos, se observó una estructura rugosa en las paredes de los poros, típica de los andamios que contienen nanohidroxiapatita (Figura 12B), lo que se corroboró con la visualización de partículas de nanohidroxiapatita en la superficie a 800x (Figura 12C). Estos resultados coinciden con estudios previos que destacan cómo la nanohidroxiapatita mejora la estructura y funcionalidad de los andamios para aplicaciones de regeneración ósea (Q. Zhang et al., 2021c).

Los resultados obtenidos sobre la liberación de factores de crecimiento en los andamios impresos en 3D con L-PRF sugieren una liberación controlada y prolongada de varios factores clave involucrados en las actividades biológicas (proliferación, migración, diferenciación celular y angiogénesis) involucradas en la regeneración de tejidos y la reparación ósea, como PDGF-BB, EGF, VEGF-C, FGF-B y BMP-2. Este patrón de liberación es consistente con estudios previos que han reportado que la inclusión de L-PRF en biomateriales o andamios para bioimpresión puede promover la liberación de factores de crecimiento, con implicaciones importantes para la regeneración celular y la angiogénesis (Anaya-Sampayo et al., 2024; Baca-González et al., 2022).

El PDGF-BB mostró una liberación significativa a lo largo de los 21 días, con niveles más altos en los primeros días y una disminución progresiva hacia el final del periodo. Este patrón es consistente con lo reportado por (Baca-González et al., 2022), quienes encontraron que el PDGF-BB liberado desde andamios bioimpresos con L-PRF facilitó la proliferación celular y la migración en las fases iniciales de la regeneración tisular. La liberación controlada de PDGF-BB en los andamios realizados en esta tesis, puede ser beneficiosa para promover la proliferación celular y la migración en las primeras fases de curación, lo que podría mejorar la regeneración ósea y tisular en modelos *In vivo*.

El EGF mostró una liberación similar del PDGF-BB, con concentraciones más altas al inicio (pico en el día 3), seguido de una disminución gradual. La liberación de EGF ha sido ampliamente estudiada en la literatura y varios trabajos indican que el EGF promueve la proliferación celular y la reparación epitelial en las primeras fases de la regeneración tisular (Fang et al., 2020). La liberación de EGF en los andamios producidos en esta investigación, sugiere que estos pueden tener un efecto positivo en

la proliferación de células epiteliales y fibroblásticas, cruciales para la regeneración de tejidos blandos durante la reparación ósea.

El VEGF-C, aunque con niveles más bajos que los otros factores de crecimiento, mostró un patrón similar de liberación con un pico en el día 3, seguido de una disminución progresiva. El VEGF-C es conocido por su papel en la angiogénesis y su liberación controlada en los andamios bioimpresos puede ser beneficiosa para la formación de vasos sanguíneos y el suministro adecuado de nutrientes a los tejidos en regeneración. El FGF-B mostró concentraciones relativamente altas en los primeros días, con un descenso progresivo, lo cual es similar a lo observado en investigaciones previas (Dohan Ehrenfest et al., 2018b). El FGF-B es un factor importante para la proliferación celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos en los primeros días de la curación (A. Zumstein et al., 2012; Wang et al., 2022). La liberación de FGF-B en los andamios bioimpresos de este proyecto, podría jugar un papel esencial en la estimulación de la proliferación celular y la angiogénesis, factores clave en la reparación ósea.

Finalmente, el BMP-2, que mostró los niveles más bajos y la liberación más sostenida durante los primeros días, es un factor crucial para la osteogénesis. La liberación sostenida de BMP-2 podría ser relevante para la inducción de la diferenciación de células madre hacia osteoblastos, lo que es fundamental para la reparación ósea en el largo plazo (K. Liu et al., 2020). Aunque su liberación fue más baja en comparación con otros factores de crecimiento, la liberación prolongada de BMP-2 en los andamios bioimpresos podría seguir teniendo un impacto importante en la regeneración ósea, como se ha demostrado en estudios que han utilizado BMP-2 para mejorar la regeneración ósea.

La evaluación de la actividad proliferativa estimulada en DPSC por los medios condicionados obtenidos a partir de los andamios entre 1 y 21 días reveló una tendencia de disminución en la proliferación celular conforme avanzan los días, lo que podría estar relacionado con la disminución progresiva de la cantidad y actividad de los factores de crecimiento presentes en el medio y los andamios. En el día 1, la proliferación celular fue significativamente alta (66.6%). Por otra parte, a partir del día 3, esta actividad comenzó a disminuir (47.3%) y a los 21 días, el porcentaje de células proliferando fue considerablemente bajo (13.3%). Estos resultados coinciden con estudios previos que reportan una disminución en la proliferación celular con el tiempo, lo que podría estar relacionado con la degradación gradual de los factores de crecimiento y su liberación controlada, como se ha observado en estudios sobre el uso de L-PRF (Baca-González et al., 2022). Por ejemplo, la liberación de factores de crecimiento como el PDGF, EGF y VEGF-C en estudios previos muestra una disminución a lo largo del tiempo, lo que concuerda con los resultados observados en este estudio, sugiriendo que la duración de la acción de los factores de crecimiento es limitada (Sui et al., 2023). En comparación, el medio condicionado obtenido a partir de un coágulo de L-PRF, especialmente en los primeros días, mostró una mayor

proliferación celular (75.6%), lo que coincide con una mayor concentración de factores evidenciado en la cuantificación por Luminex. Este hallazgo es consistente con estudios previos que destacan la capacidad de L-PRF para inducir una rápida proliferación celular debido a su riqueza en factores de crecimiento como PDGF y VEGF, los cuales juegan un papel crucial en la reparación y regeneración de tejidos (Yi et al., 2022). Sin embargo, es importante destacar que, aunque el protocolo de liofilización de L-PRF incluye cambio fisicoquímicos importantes, este procesamiento no afecto la presencia y liberación de los factores de crecimiento asociados con la regeneración ósea y su actividad biológica. Lo que sugiere que la liofilización de L-PRF es una alternativa adecuada para obtener biomoléculas bioactivas estable que estimular las actividades biológicas indispensables para lograr la regeneración ósea.

Además, la proliferación celular observada en el control con SFB al 10% (83%) fue superior a la del medio condicionado con L-PRF, lo que sugiere que, aunque L-PRF es efectivo, los factores de crecimiento en SFB pueden tener un efecto aún más pronunciado en la proliferación celular en ciertas condiciones (Baca-González et al., 2022). En resumen, los resultados obtenidos son consistentes con la literatura existente que sugiere que los factores de crecimiento derivados de L-PRF tienen un efecto positivo en la proliferación celular, especialmente en las primeras etapas. Sin embargo, la disminución de esta proliferación con el tiempo resalta la necesidad de estrategias para prolongar la liberación de estos factores en sistemas de andamiaje bioimpreso, lo que podría mejorar la regeneración celular y tisular a largo plazo.

Los resultados de viabilidad celular en los andamios bioimpresos con células HDFn mostraron una viabilidad superior al 80% en todos los casos. Se encontraron resultados similares sobre la viabilidad celular de fibroblastos de ratón después de 48 horas para hidrogeles de alginato-nHA, independientemente de la concentración de nHA. En general, estos resultados de viabilidad indican que ni la composición del andamio ni la estrategia de procesamiento dual comprometieron la viabilidad celular. La alta viabilidad celular observada después de las pruebas confirmó la no toxicidad de las estructuras de hidrogel y se correlaciona con los andamios que contienen los mismos componentes. De hecho, la biocompatibilidad de los componentes iniciales de los andamios (alginato y nHA) ya ha sido reportada (Shaheen et al., 2019). En general, estos resultados son prometedores, dado que la cito-compatibilidad y una microestructura adecuada (tamaño de poro y porosidad) rigen las propiedades de un andamio ideal (Iglesias-Mejuto & García-González, 2021).

La presencia de nHA en los andamios no influyó en la adhesión de las células madre mesenquimales como se observó previamente para estructuras con composición similar (Benning et al., 2017; Kamalaldin et al., 2016). Sin embargo, para concentraciones más altas de nHA (16 y 24 % en peso), la adhesión disminuye a los 6 y 13 días, probablemente debido a la alta rugosidad superficial e irregularidad que generalmente favorecen la adhesión celular (concentración de nHA de 8 % en peso), pero a niveles mucho más altos podría dificultar que las CMMs proliferen

completamente adheridas al hidrogel. Además, los compuestos de alginato combinados con cationes de Ca^{2+} mejoraron la migración de fibroblastos, como se observó aquí, probablemente debido a cambios en la regulación de genes involucrados en el proceso de cicatrización llevado a cabo por fibroblastos.

Finalmente, como la quimiotaxis es una respuesta inherente para las células, se hipotetizó que está involucrada en el proceso de migración celular, puesto que la mayor concentración de factores bioquímicos secretados por los tejidos dañados activa las células circundantes y estimula la migración de células. Esta respuesta biológica también podría desempeñar un papel significativo en el aumento de la migración de fibroblastos en presencia de los hidrogeles a base de alginato observados en este estudio. Con los resultados de esta investigación se reveló que los iones de calcio proporcionados por el nHA mejoraron significativamente las tasas de crecimiento y proliferación celular (A. Ribeiro et al., 2018).

La evaluación de la viabilidad celular en los andamios bioimpresos con L-PRF mostró que la viabilidad celular fue mayor en los andamios bioimpresos en comparación con los impresos en 3D a las 24 horas (70% frente a 45%, respectivamente), lo que es consistente con lo reportado por Stanco et al. (2020), quienes observaron que las células impresas junto al material en un andamio bioimpreso mantuvieron una mayor viabilidad en las primeras etapas debido a una distribución más uniforme de las células y una mejor interacción con la matriz (Stanco et al., 2020). A los 3 días, ambos grupos mostraron una viabilidad celular comparable (alrededor del 80%), lo que sugiere que la diferencia inicial en la viabilidad entre ambos grupos podría deberse a factores relacionados con la impresión y la distribución celular, tal como se ha sugerido en estudios previos (Sui et al., 2023). A los 14 días, los andamios impresos en 3D mostraron una mayor viabilidad (98%) en comparación con los andamios bioimpresos (89%), lo que podría deberse a una mejor integración celular en los andamios impresos en 3D, donde las células fueron inyectadas en el material antes de la impresión.

Este comportamiento es similar a los resultados obtenidos por Cidonio et al. (2021), quienes encontraron que la viabilidad celular en andamios impresos en 3D fue superior a largo plazo debido a una mayor preservación de la estructura del andamio y una mejor distribución de las células (Cidonio et al., 2021). No obstante, a los 21 días, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre ambos tipos de andamios, lo que sugiere que la bioimpresión no afecta negativamente la viabilidad celular a largo plazo, lo cual es consistente con otros estudios que han observado que los andamios bioimpresos pueden mantener la viabilidad celular por períodos prolongados (Xu et al., 2022).

Por otro lado, la incorporación de L-PRF en los andamios bioimpresos parece mejorar la viabilidad celular en las primeras etapas del cultivo, lo cual es consistente con estudios previos que han reportado que el L-PRF, al ser una fuente de factores de

crecimiento, favorece la supervivencia celular y la regeneración tisular en las primeras fases del proceso de curación (Yi et al., 2022). Este efecto positivo de L-PRF en la viabilidad celular podría explicar las mayores tasas de viabilidad observadas a las primeras 24 horas en los andamios bioimpresos en comparación con los impresos en 3D.

El aumento en la expresión de genes clave como *RUNX2*, *ALP*, *COL1A1*, *BMP-2*, *VEGF, TGF-β,* OCN, OPN, OPG y RANK-L en los andamios bioimpresos resalta el potencial de estos materiales para favorecer la regeneración ósea. Este hallazgo es consistente con estudios previos que sugieren que la bioimpresión mejora la expresión de *RUNX2*, clave en la diferenciación de las células madre en osteoblastos y su aparición temprana en el proceso de osteogénesis es crucial para la formación del hueso (Abu Awwad et al., 2020). La mayor expresión de *ALP*, que es un marcador de diferenciación osteoblástica se expresa en las primeras etapas de la osteogénesis y es responsable de la mineralización de la matriz ósea, también se alinea con lo reportado por (Abu Awwad et al., 2020; Yu et al., 2024), quienes evidenciaron que los andamios bioimpresos favorecen la diferenciación osteogénica en comparación con los andamios convencionales (Yu et al., 2024).

Asimismo, el incremento en la expresión de *COL1A1*, esencial para la formación de la matriz extracelular ósea, respalda lo encontrado por López et al. (2018), quienes observaron una mayor formación de matriz extracelular en andamios bioimpresos. La mayor expresión de *BMP-2* y VEGF en los andamios bioimpresos también confirma lo reportado por (Abu Awwad et al., 2020; Yu et al., 2024), quienes destacaron que estos factores bioactivos son cruciales para la regeneración ósea, puesto que promueven la diferenciación osteoblástica y la angiogénesis, respectivamente. El patrón observado en el gen *TGF-β*, con una mayor expresión en los andamios bioimpresos, también es consistente con la literatura. Estudios como el de Chawla y colaboradores en el 2018 (Chawla et al., 2018) han sugerido que *TGF-β* juega un papel fundamental en la modulación de la diferenciación celular y la formación de la matriz ósea. Sin embargo; las diferencias no significativas con el control en este estudio podrían indicar que la modulación de *TGF-β* por los andamios bioimpresos depende de factores adicionales, como el tipo de células madre o la carga de factores bioactivos en los andamios.

La mayor expresión de *OPN* y *OPG* en los andamios bioimpresos en comparación con los impresos en 3D también se alinea con la literatura (Chawla et al., 2018; Yang et al., 2020). Un estudio demostró que *OPN* y *OPG* son esenciales para la mineralización y la homeostasis ósea y su mayor expresión en los andamios bioimpresos podría reflejar un entorno más adecuado para la mineralización del hueso. Aunque no se alcanzó con los niveles de O*CN* observados en el control SaOS-2, los resultados presentados en este trabajo, aún sugieren una activación de la mineralización ósea, lo que es consistente con estudios previos que señalan que los andamios bioimpresos pueden inducir una mineralización significativa, aunque la completa mineralización no se logre inmediatamente (Ghahri et al., 2023). Finalmente, la expresión decreciente de *OSX* a

los 21 días en los andamios bioimpresos, como se observó en esta investigación, es un hallazgo interesante que podría indicar una regulación temporal de la diferenciación osteoblástica. Este patrón es consistente con estudios previos que han señalado que la regulación temporal de genes osteogénicos es clave para controlar la maduración de los osteoblastos durante el proceso de regeneración ósea (Raveendran et al., 2023).

El comportamiento en la expresión de estos genes en los andamios bioimpresos en comparación con los convencionales puede explicarse por la capacidad de la bioimpresión para crear estructuras más precisas y controladas que imitan mejor el entorno tridimensional natural de los tejidos. La arquitectura de los andamios bioimpresos permite una distribución más homogénea de los factores de crecimiento y las células, lo que favorece un ambiente más propicio para la diferenciación celular y la regeneración ósea (Abu Awwad et al., 2020).

Además, la bioimpresión permite la incorporación de materiales que simulan mejor las propiedades de la matriz extracelular, lo que puede modular más efectivamente la respuesta celular, favoreciendo la expresión de genes como RUNX2, ALP, COL1A1, BMP-2 y VEGF. Aunque los niveles de expresión de estos genes fueron más altos en las células SaOS-2 (Nagayama et al., 2023), que se utilizaron como control osteoblástico, lo que sugiere que los andamios bioimpresos aún no alcanzan el nivel de diferenciación de las células osteoblásticas *In vitro* o *In vivo*, la proximidad de los resultados obtenidos con los andamios bioimpresos a los controles sugiere que estos materiales tienen un gran potencial para aplicaciones clínicas en regeneración ósea.

En resumen, este trabajo sugiere que la bioimpresión 3D usando biotintas compuestas de nanohidroxiapatita (nHA), gelatina (Gel), alginato (Alg) y L-PRF permite la diferenciación ósea de células de la pulpa dental *In vitro*, como primer paso en la obtención de constructos que permitan la regeneración ósea. Igualmente, se logró definir el protocolo de obtención y caracterización física y biológica de las biotintas que mantienen la viabilidad celular de células madre de pulpa dental y promueven la diferenciación ósea *In vitro*.

9. CONCLUSIONES

- La evaluación de la diferenciación osteogénica *In vitro* de las células madre de pulpa dental humana (DPSC) en andamios construidos mediante impresión 3D y bioimpresión con biotinta de alginato, gelatina, nanohidroxiapatita y L-PRF demuestra un posible potencial significativo para promover la osteogénesis. Los andamios bioimpresos mostraron una mayor viabilidad celular y un entorno más favorable para la diferenciación de las DPSC en comparación con los impresos en 3D, logrando una distribución celular homogénea y de los factores de crecimiento contenidos en L-PRF, para estimular la regeneración ósea. Estos resultados sugieren que las biotintas utilizadas tienen un potencial prometedor para aplicaciones clínicas en la regeneración ósea dentro de la cavidad oral.

- Este estudio evaluó el potencial de la bioimpresión 3D para crear andamios bioactivos utilizando biotintas suplementadas con L-PRF liofilizado y nanohidroxiapatita (nHA), materiales que favorecen la regeneración ósea. La combinación de estos componentes en las biotintas no solo mejora las propiedades mecánicas de los andamios, sino que también promueve las actividades biológicas celulares, creando estructuras que puedan promover la regeneración ósea en la cavidad oral.

- La incorporación de nHA y L-PRF mejora significativamente las propiedades mecánicas y funcionales de las biotintas, aumentando su viscosidad, consistencia y comportamiento sólido. Estas características, junto con una recuperación viscoelástica eficiente y rápida gelificación, aseguran la estabilidad estructural y funcionalidad de los andamios, sugiriendo su potencial uso en regeneración ósea mediante bioimpresión 3D.

- La incorporación de L-PRF liofilizado en las biotintas mejoró la viabilidad celular. Así mismo, los factores de crecimiento liberados a partir de los andamios en los que se incorporó L-PRF estimularon la proliferación celular en células en monocapa, lo que indica que la liofilización e incorporación en los andamios bioimpresos no altera su funcionalidad.

- La fidelidad geométrica de los andamios bioimpresos también se destacó como un aspecto importante en el estudio. Las biotintas demostraron un comportamiento pseudoplástico, lo que implica que la viscosidad de los materiales cambia bajo esfuerzos, un factor clave a considerar al optimizar los parámetros de impresión. Este comportamiento afecta la forma en que las

células interactúan con los andamios, lo que puede influir en la eficiencia de la regeneración ósea y la liberación controlada de factores de crecimiento.

- Los andamios bioimpresos promueven una mayor expresión de genes osteogénicos clave como RUNX2, ALP, COL1A1, BMP-2 y VEGF, en comparación con los andamios convencionales. Estos resultados sugieren un alto potencial para aplicaciones clínicas en regeneración ósea, que deberá ser validado mediante estudios *In vivo,* para realizar ensayos de seguridad y eficacia.

- Los resultados obtenidos sugieren que la bioimpresión 3D con biotintas que contienen L-PRF y nHA tiene un gran potencial para la creación de andamios funcionales que pueden ser utilizados en la regeneración ósea, no solo en la cavidad oral, sino también en otras áreas de la medicina regenerativa. Los estudios adicionales deben centrarse en la mejora de los procesos de impresión, la optimización de la formulación de biotintas y la evaluación de la respuesta biológica a largo plazo de los andamios en modelos *In vivo*.

10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Aunque este estudio se centró en la viabilidad celular en condiciones *In vitro*, se recomienda la realización de ensayos preclínicos *In vivo* de seguridad y eficacia, para evaluar la respuesta biológica a largo plazo de los andamios bioimpresos. Los estudios en modelos animales permitirían observar cómo estos andamios interactúan con los tejidos vivos, analizando su capacidad para promover la regeneración ósea y su comportamiento frente a factores de degradación, biocompatibilidad y aceptación o rechazo. Estos ensayos serían fundamentales para validar el posible potencial clínico de los andamios.

Se sugiere investigar el desarrollo de estrategias de protección para los andamios bioimpresos, con el fin de prevenir el colapso estructural durante el proceso de regeneración ósea. El uso de recubrimientos biocompatibles o la modificación de los materiales de los andamios podría mejorar su estabilidad mecánica, asegurando su integridad a largo plazo en aplicaciones clínicas. Futuros estudios podrían centrarse en la incorporación de aditivos o tratamientos que proporcionen una mayor resistencia sin comprometer la biocompatibilidad, lo cual sería esencial para el éxito terapéutico en regeneración ósea

REFERENCIAS

A. Zumstein, M., Berger, S., Schober, M., Boileau, P., W. Nyffeler, R., Horn, M., & A. Dahinden, C. (2012). Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) for Long-Term Delivery of Growth Factor in Rotator Cuff Repair: Review, Preliminary Results and Future Directions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(7), 1196–1206. https://doi.org/10.2174/138920112800624337

Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R. M., & Nguyen, N.-T. (2020). Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, *5*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007

Abdollahiyan, P., Oroojalian, F., & Mokhtarzadeh, A. (2021). The triad of nanotechnology, cell signalling, and scaffold implantation for the successful repair of damaged organs: An overview on soft-tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, *332*, 460–492. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.036

Abdulghani, S., & Mitchell, G. (2019). Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules*, *9*(11), 750. https://doi.org/10.3390/biom9110750

Abka-khajouei, R., Tounsi, L., Shahabi, N., Patel, A. K., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2022). Structures, Properties and Applications of Alginates. *Marine Drugs*, *20*(6), 364. https://doi.org/10.3390/md20060364

Abu Awwad, H. A.-D. M., Thiagarajan, L., Kanczler, J. M., Amer, M. H., Bruce, G., Lanham, S., Rumney, R. M. H., Oreffo, R. O. C., & Dixon, J. E. (2020). Genetically-programmed, mesenchymal stromal cell-laden & mechanically strong 3D bioprinted scaffolds for bone repair. *Journal of Controlled Release*, *325*, 335–346. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.035

Ahlfeld, T., Schuster, F. P., Förster, Y., Quade, M., Akkineni, A. R., Rentsch, C., Rammelt, S., Gelinsky, M., & Lode, A. (2019). 3D Plotted Biphasic Bone Scaffolds for Growth Factor Delivery: Biological Characterization In Vitro and In Vivo. *Advanced Healthcare Materials*, *8*(7). https://doi.org/10.1002/adhm.201801512

Ali, I., & Shah, L. A. (2021). Rheological investigation of the viscoelastic thixotropic behavior of synthesized polyethylene glycol-modified polyacrylamide hydrogels using different accelerators. *Polymer Bulletin*, *78*(3), 1275–1291. https://doi.org/10.1007/s00289-020-03163-x

Aliabouzar, M., Lee, S., Zhou, X., Zhang, G. L., & Sarkar, K. (2018). Effects of scaffold microstructure and low intensity pulsed ultrasound on chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *115*(2), 495–506. https://doi.org/10.1002/bit.26480

Al-Moraissi, E. A., Alkhutari, A. S., Abotaleb, B., Altairi, N. H., & Del Fabbro, M. (2020). Do osteoconductive bone substitutes result in similar bone regeneration for maxillary sinus augmentation when compared to osteogenic and osteoinductive bone grafts? A systematic review and frequentist network meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *49*(1), 107–120. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2019.05.004

Alqahtani, A. M. (2023). Guided Tissue and Bone Regeneration Membranes: A Review of Biomaterials and Techniques for Periodontal Treatments. *Polymers*, *15*(16), 3355. https://doi.org/10.3390/polym15163355

Altun, E., Ekren, N., Kuruca, S. E., & Gunduz, O. (2019). Cell studies on Electrohydrodynamic (EHD)-3D-bioprinted Bacterial Cellulose\Polycaprolactone scaffolds for tissue engineering. *Materials Letters*, *234*, 163–167. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.09.085

Amarasekara, D. S., Kim, S., & Rho, J. (2021). Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 2851. https://doi.org/10.3390/ijms22062851

Amghar-Maach, S., Gay-Escoda, C., & Sanchez-Garces, M. (2019). Regeneration of periodontal bone defects with dental pulp stem cells grafting: Systematic Review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 0–0. https://doi.org/10.4317/jced.55574

Amorim, P. A., d'Ávila, M. A., Anand, R., Moldenaers, P., Van Puyvelde, P., & Bloemen, V. (2021). Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting*, *22*, e00129. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00129

Anaya-Sampayo, L. M., García-Robayo, D. A., Roa, N. S., Rodriguez-Lorenzo, L. M., & Martínez-Cardozo, C. (2024). Platelet-rich fibrin (PRF) modified nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin/alginate scaffolds increase adhesion and viability of human dental pulp stem cells (DPSC) and osteoblasts derived from DPSC. *International Journal of Biological Macromolecules*, *273*, 133064. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133064

Anaya-Sampayo, L. M., Roa, N. S., Martínez-Cardozo, C., García-Robayo, D. A., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2024). Influence of Hydroxyapatite and Gelatin Content on Crosslinking Dynamics and HDFn Cell Viability in Alginate Bioinks for 3D Bioprinting. *Polymers*, *16*(22), 3224. https://doi.org/10.3390/polym16223224

Anita Lett, J., Sagadevan, S., Fatimah, I., Hoque, M. E., Lokanathan, Y., Léonard, E., Alshahateet, S. F., Schirhagl, R., & Oh, W. C. (2021). Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications. *European Polymer Journal*, *148*, 110360. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110360

Asim, S., Tabish, T. A., Liaqat, U., Ozbolat, I. T., & Rizwan, M. (2023). Advances in Gelatin Bioinks to Optimize Bioprinted Cell Functions. *Advanced Healthcare Materials*, *12*(17). https://doi.org/10.1002/adhm.202203148

Auger, F. A., Gibot, L., & Lacroix, D. (2013). The Pivotal Role of Vascularization in Tissue Engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *15*(1), 177–200. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152428

Ausenda, F., Rasperini, G., Acunzo, R., Gorbunkova, A., & Pagni, G. (2019). New Perspectives in the Use of Biomaterials for Periodontal Regeneration. *Materials*, *12*(13), 2197. https://doi.org/10.3390/ma12132197

Baca-Gonzalez, L., Serrano Zamora, R., Rancan, L., González Fernández-Tresguerres, F., Fernández-Tresguerres, I., López-Pintor, R. M., López-Quiles, J., Leco, I., & Torres, J. (2022). Plasma rich in growth factors (PRGF) and leukocyte-platelet rich fibrin (L-PRF): comparative release of growth factors and biological effect on

osteoblasts. *International Journal of Implant Dentistry*, *8*(1), 39. https://doi.org/10.1186/s40729-022-00440-4

Baldwin, P., Li, D. J., Auston, D. A., Mir, H. S., Yoon, R. S., & Koval, K. J. (2019). Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *Journal of Orthopaedic Trauma*, *33*(4), 203–213. https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420

Banda Sánchez, C., Cubo Mateo, N., Saldaña, L., Valdivieso, A., Earl, J., González Gómez, I., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2023). Selection and Optimization of a Bioink Based on PANC-1- Plasma/Alginate/Methylcellulose for Pancreatic Tumour Modelling. *Polymers*, *15*(15), 3196. https://doi.org/10.3390/polym15153196

Becerra-Ruiz, J. S., Guerrero-Velázquez, C., Martínez-Esquivias, F., Martínez-Pérez, L. A., & Guzmán-Flores, J. M. (2022). Innate and adaptive immunity of periodontal disease. From etiology to alveolar bone loss. *Oral Diseases*, *28*(6), 1441–1447. https://doi.org/10.1111/odi.13884

Bedell, M. L., Melchiorri, A. J., Aleman, J., Skardal, A., & Mikos, A. G. (2020). A high-throughput approach to compare the biocompatibility of candidate bioink formulations. *Bioprinting*, *17*, e00068. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00068

Benedini, L., Laiuppa, J., Santillán, G., Baldini, M., & Messina, P. (2020). Antibacterial alginate/nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering: Assessment of their bioactivity, biocompatibility, and antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*, *115*, 111101. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111101

Benlidayi, M. E., Tatli, U., Salimov, F., Tükel, H. C., & Yüksel, O. (2018). Comparison of autogenous and allograft bone rings in surgically created vertical bone defects around implants in a sheep model. *Clinical Oral Implants Research*, *29*(11), 1155–1162. https://doi.org/10.1111/clr.13379

Benning, L., Gutzweiler, L., Tröndle, K., Riba, J., Zengerle, R., Koltay, P., Zimmermann, S., Stark, G. B., & Finkenzeller, G. (2017). Cytocompatibility testing of hydrogels toward bioprinting of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *105*(12), 3231–3241. https://doi.org/10.1002/jbm.a.36179

Bhattacharya, H., Gummaluri, S., Astekar, M., & Gummaluri, R. (2020). Novel method of determining the periodontal regenerative capacity of T-PRF and L-PRF: An immunohistochemical study. *Dental and Medical Problems*, *57*(2), 137–144. https://doi.org/10.17219/dmp/117721

Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., & Fischer, H. (2016). Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Advanced Healthcare Materials*, *5*(3), 326–333. https://doi.org/10.1002/adhm.201500677

Borrelli, M. R., Hu, M. S., Longaker, M. T., & Lorenz, H. P. (2020). Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Craniofacial Reconstruction and Facial Aesthetics. *Journal of Craniofacial Surgery*, *31*(1), 15–27. https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000005840

Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, *30*(10), 546–554. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005

Boularaoui, S., Al Hussein, G., Khan, K. A., Christoforou, N., & Stefanini, C. (2020). An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting*, *20*, e00093. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00093

Boyce, B. F., & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *473*(2), 139–146. https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018

Buenzli, P. R., Lanaro, M., Wong, C. S., McLaughlin, M. P., Allenby, M. C., Woodruff, M. A., & Simpson, M. J. (2020). Cell proliferation and migration explain pore bridging dynamics in 3D printed scaffolds of different pore size. *Acta Biomaterialia*, *114*, 285–295. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.010

Buyuksungur, S., Hasirci, V., & Hasirci, N. (2021). <scp>3D</scp> printed hybrid bone constructs of <scp>PCL</scp> and dental pulp stem cells loaded <scp>GelMA</scp>. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *109*(12), 2425–2437. https://doi.org/10.1002/jbm.a.37235

Calabrese, E. J. (2022). Hormesis and dental apical papilla stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, *357*, 109887. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109887

Castilho, M., de Ruijter, M., Beirne, S., Villette, C. C., Ito, K., Wallace, G. G., & Malda, J. (2020). Multitechnology Biofabrication: A New Approach for the Manufacturing of Functional Tissue Structures? *Trends in Biotechnology*, *38*(12), 1316–1328. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.04.014

Castro, A. B., Meschi, N., Temmerman, A., Pinto, N., Lambrechts, P., Teughels, W., & Quirynen, M. (2017). Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*(1), 67–82. https://doi.org/10.1111/jcpe.12643

Chatzopoulos, G. S., Jiang, Z., Marka, N., & Wolff, L. F. (2024). Periodontal Disease, Tooth Loss, and Systemic Conditions: An Exploratory Study. *International Dental Journal*, *74*(2), 207–215. https://doi.org/10.1016/j.identj.2023.08.002

Chawla, S., Sharma, A., Bandyopadhyay, A., & Ghosh, S. (2018). Developmental Biology-Inspired Strategies To Engineer 3D Bioprinted Bone Construct. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *4*(10), 3545–3560. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00757

Chen, F.-M., & Jin, Y. (2010). Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *16*(2), 219–255. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0562

Chocholata, P., Kulda, V., & Babuska, V. (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*, *12*(4), 568. https://doi.org/10.3390/ma12040568

Chopin-Doroteo, M., Mandujano-Tinoco, E. A., & Krötzsch, E. (2021). Tailoring of the rheological properties of bioinks to improve bioprinting and bioassembly for tissue

replacement. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1865, Issue 2). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129782

Cidonio, G., Costantini, M., Pierini, F., Scognamiglio, C., Agarwal, T., & Barbetta, A. (2021). 3D printing of biphasic inks: beyond single-scale architectural control. *Journal of Materials Chemistry C*, *9*(37), 12489–12508. https://doi.org/10.1039/D1TC02117F

Citterio, F., Gualini, G., Fierravanti, L., & Aimetti, M. (2020). Stem cells and periodontal regeneration: present and future. *Plastic and Aesthetic Research*, *7*, 41. https://doi.org/10.20517/2347-9264.2020.29

Cooke, M. E., & Rosenzweig, D. H. (2021). The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. In *APL Bioengineering* (Vol. 5, Issue 1). American Institute of Physics Inc. https://doi.org/10.1063/5.0031475

Crisci, A., Crescenzo, U. De, & Crisci, M. (2018). Platelet-rich concentrates (L-PRF, PRP) in tissue regeneration: Control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Journal of Clinical and Molecular Medicine*, *1*(3). https://doi.org/10.15761/JCMM.1000116

de Melo, B. A. G., Jodat, Y. A., Cruz, E. M., Benincasa, J. C., Shin, S. R., & Porcionatto, M. A. (2020). Strategies to use fibrinogen as bioink for 3D bioprinting fibrin-based soft and hard tissues. *Acta Biomaterialia*, *117*, 60–76. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.024

Deo, K. A., Singh, K. A., Peak, C. W., Alge, D. L., & Gaharwar, A. K. (2020). Bioprinting 101: Design, Fabrication, and Evaluation of Cell-Laden 3D Bioprinted Scaffolds. *Tissue Engineering - Part A*, *26*(5–6), 318–338. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0298

Di Martino, A., Liverani, L., Rainer, A., Salvatore, G., Trombetta, M., & Denaro, V. (2011). Electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *MUSCULOSKELETAL SURGERY*, *95*(2), 69–80. https://doi.org/10.1007/s12306-011-0097-8

do Lago, E. S., Ferreira, S., Garcia, I. R., Okamoto, R., & Mariano, R. C. (2020). Improvement of bone repair with l-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. *Clinical Oral Investigations*, *24*(5), 1637–1650. https://doi.org/10.1007/s00784-019-03018-4

Dohan Ehrenfest, D. M., Pinto, N. R., Pereda, A., Jiménez, P., Corso, M. Del, Kang, B.-S., Nally, M., Lanata, N., Wang, H.-L., & Quirynen, M. (2018a). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, *29*(2), 171–184. https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812

Dohan Ehrenfest, D. M., Pinto, N. R., Pereda, A., Jiménez, P., Corso, M. Del, Kang, B.-S., Nally, M., Lanata, N., Wang, H.-L., & Quirynen, M. (2018b). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, *29*(2), 171–184. https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812

Donnaloja, F., Jacchetti, E., Soncini, M., & Raimondi, M. T. (2020). Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. *Polymers*, *12*(4), 905. https://doi.org/10.3390/polym12040905

Dragonas, P., Katsaros, T., Avila-Ortiz, G., Chambrone, L., Schiavo, J. H., & Palaiologou, A. (2019). Effects of leukocyte–platelet-rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *48*(2), 250–262. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.06.003

Ercan, E., Suner, S. S., Silan, C., Yilmaz, S., Siddikoglu, D., Sahiner, N., & Tunali, M. (2022). Titanium platelet–rich fibrin (T-PRF) as high-capacity doxycycline delivery system. *Clinical Oral Investigations*, *26*(8), 5429–5438. https://doi.org/10.1007/s00784-022-04510-0

Fang, T., Zhang, Y., Chang, V. Y., Roos, M., Termini, C. M., Signaevskaia, L., Quarmyne, M., Lin, P. K., Pang, A., Kan, J., Yan, X., Javier, A., Pohl, K., Zhao, L., Scott, P., Himburg, H. A., & Chute, J. P. (2020). Epidermal growth factor receptor–dependent DNA repair promotes murine and human hematopoietic regeneration. *Blood*, *136*(4), 441–454. https://doi.org/10.1182/blood.2020005895

Farmani, A. R., Nekoofar, M. H., Ebrahimi Barough, S., Azami, M., Rezaei, N., Najafipour, S., & Ai, J. (2021). Application of Platelet Rich Fibrin in Tissue Engineering: Focus on Bone Regeneration. *Platelets*, *32*(2), 183–188. https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1869710

Farris, S., Song, J., & Huang, Q. (2010). Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(2), 998–1003. https://doi.org/10.1021/jf9031603

Fernandes, G., & Yang, S. (2016). Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. *Bone Research*, *4*, 16036. https://doi.org/10.1038/boneres.2016.36

Fernández-Montes Moraleda, B., Román, J. S., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2013). Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *101A*(8), 2332–2339. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34528

Fiume, E., Magnaterra, G., Rahdar, A., Verné, E., & Baino, F. (2021). Hydroxyapatite for Biomedical Applications: A Short Overview. *Ceramics*, *4*(4), 542–563. https://doi.org/10.3390/ceramics4040039

Fuchs, S., Shariati, K., & Ma, M. (2020). Specialty Tough Hydrogels and Their Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*, *9*(2). https://doi.org/10.1002/adhm.201901396

Gao, T., Gillispie, G. J., Copus, J. S., PR, A. K., Seol, Y.-J., Atala, A., Yoo, J. J., & Lee, S. J. (2018). Optimization of gelatin–alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. *Biofabrication*, *10*(3), 034106. https://doi.org/10.1088/1758-5090/aacdc7

Gautam, S., Sharma, C., Purohit, S. D., Singh, H., Dinda, A. K., Potdar, P. D., Chou, C.-F., Mishra, N. C. %J M. S., & Engineering:, C. (2021). *Gelatin-polycaprolactone-nanohydroxyapatite electrospun nanocomposite scaffold for bone tissue engineering*. *119*, 111588.

Gelmi, A., & Schutt, C. E. (2021). Stimuli-Responsive Biomaterials: Scaffolds for Stem Cell Control. *Advanced Healthcare Materials*, *10*(1). https://doi.org/10.1002/adhm.202001125

Ghahri, T., Salehi, Z., Aghajanpour, S., Eslaminejad, M. B., Kalantari, N., Akrami, M., Dinarvand, R., Jang, H. L., & Esfandyari-Manesh, M. (2023). Development of osteon-like scaffold-cell construct by quadruple coaxial extrusion-based 3D bioprinting of nanocomposite hydrogel. *Biomaterials Advances*, *145*, 213254. https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213254

Gillispie, G., Prim, P., Copus, J., Fisher, J., Mikos, A. G., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2020). Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, *12*(2), 022003. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6f0d

Gong, T., Xie, J., Liao, J., Zhang, T., Lin, S., & Lin, Y. (2015). Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Research*, *3*(1), 15029. https://doi.org/10.1038/boneres.2015.29

González-González, A., García-Sánchez, D., Dotta, M., Rodríguez-Rey, J. C., & Pérez-Campo, F. M. (2020). Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, *12*(12), 1529–1552. https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529

Gopinathan, J., & Noh, I. (2018). Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomaterials Research*, *22*(1). https://doi.org/10.1186/s40824-018-0122-1

Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research*, *81*(8), 531–535. https://doi.org/10.1177/154405910208100806

Gugliandolo, A., Fonticoli, L., Trubiani, O., Rajan, T. S., Marconi, G. D., Bramanti, P., Mazzon, E., Pizzicannella, J., & Diomede, F. (2021). Oral Bone Tissue Regeneration: Mesenchymal Stem Cells, Secretome, and Biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(10), 5236. https://doi.org/10.3390/ijms22105236

Guller, A., & Igrunkova, A. (2022). Engineered Microenvironments for 3D Cell Culture and Regenerative Medicine: Challenges, Advances, and Trends. *Bioengineering*, *10*(1), 17. https://doi.org/10.3390/bioengineering10010017

Haleem, A., Javaid, M., Khan, R. H., & Suman, R. (2020). 3D printing applications in bone tissue engineering. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, *11*, S118–S124. https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.12.002

Han, S. K., Song, M., Choi, K., & Choi, S. (2021). Fabrication of Biodegradable Polyurethane Foam Scaffolds with Customized Shapes and Controlled Mechanical Properties by Gas Foaming Technique. *Macromolecular Materials and Engineering*, *306*(7). https://doi.org/10.1002/mame.202100114

Hasmun, N., Vettore, M. V., Lawson, J. A., Elcock, C., Zaitoun, H., & Rodd, H. D. (2020). Determinants of children's oral health-related quality of life following aesthetic treatment of enamel opacities. *Journal of Dentistry*, *98*, 103372. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103372

Hathaway-Schrader, J. D., & Novince, C. M. (2021). Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue. *Periodontology 2000*, *86*(1), 157–187. https://doi.org/10.1111/prd.12368

Heo, S.-E., Ji, J.-H., Yi, S.-C., & Heo, J.-H. (2016). The Relevance of Oral Health Related Quality of Life of the Oral-Cavity for Removable Denture Satisfaction of Senior Citizens Over 65 Years of Age. *The Korean Journal of Health Service Management*, *10*(3), 135–146. https://doi.org/10.12811/kshsm.2016.10.3.135

Hernández-González, A. C., Téllez-Jurado, L., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2020a). Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 229). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115514

Hernández-González, A. C., Téllez-Jurado, L., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. %J C. polymers. (2020b). *Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review*. *229*, 115514.

Hernández-González, A. C., Téllez-Jurado, L., & Rodríguez-Lorenzob, L. M. (2020). SYNTHESIS OF IN-SITU SILICA-ALGINATE HYBRID HYDROGELS BY A SOL-GEL ROUTE. *Carbohydrate Polymers*, *250*. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116877

Hoang, D. M., Pham, P. T., Bach, T. Q., Ngo, A. T. L., Nguyen, Q. T., Phan, T. T. K., Nguyen, G. H., Le, P. T. T., Hoang, V. T., Forsyth, N. R., Heke, M., & Nguyen, L. T. (2022). Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 272. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4

Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*, *35*(2), 217–239. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.006

Iglesias-Mejuto, A., & García-González, C. A. (2021). 3D-printed alginate-hydroxyapatite aerogel scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *131*, 112525. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112525

Infante, A., & Rodríguez, C. I. (2018). Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 244. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0995-x

Ivanovski, S., Lee, R. S. B., Fernandez-Medina, T., Pinto, N., Andrade, C., & Quirynen, M. (2024). Impact of autologous platelet concentrates on the osseointegration of dental implants. *Periodontology 2000*. https://doi.org/10.1111/prd.12563

Iviglia, G., Kargozar, S., & Baino, F. (2019). Biomaterials, Current Strategies, and Novel Nano-Technological Approaches for Periodontal Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, *10*(1), 3. https://doi.org/10.3390/jfb10010003

Janicki, P., & Schmidmaier, G. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, *42*, S77–S81. https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.014

Jia, W., Gungor-Ozkerim, P. S., Zhang, Y. S., Yue, K., Zhu, K., Liu, W., Pi, Q., Byambaa, B., Dokmeci, M. R., Shin, S. R., & Khademhosseini, A. (2016). Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials*, *106*, 58–68. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.038

Jin, S., Xia, X., Huang, J., Yuan, C., Zuo, Y., Li, Y., & Li, J. (2021). Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, *127*, 56–79. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.067

Kamalaldin, N. A., Yahya, B. H., & Nurazreena, A. (2016). Cell Evaluation on Alginate/Hydroxyapatite Block for Biomedical Application. *Procedia Chemistry*, *19*, 297–303. https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.012

Kanwar, S., & Vijayavenkataraman, S. (2021). Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: A review. *Bioprinting*, *24*, e00167. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00167

Kim, M. H., Lee, Y. W., Jung, W.-K., Oh, J., & Nam, S. Y. (2019). Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *98*, 187–194. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.06.014

Kim, S. E., & Park, K. (2020). *Recent Advances of Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Regeneration* (pp. 177–188). https://doi.org/10.1007/978-981-15-3262-7_12

Koons, G. L., Diba, M., & Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, *5*(8), 584–603. https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2

Kwack, K. H., & Lee, H.-W. (2022). Clinical Potential of Dental Pulp Stem Cells in Pulp Regeneration: Current Endodontic Progress and Future Perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.857066

Lauritano, D., Limongelli, L., Moreo, G., Favia, G., & Carinci, F. (2020). Nanomaterials for Periodontal Tissue Engineering: Chitosan-Based Scaffolds. A Systematic Review. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/nano10040605

Le, T. T. V., Phan, N. T. H., & Tran, H. L. B. (2023). Alginate–gelatin hydrogel supplemented with platelet concentrates can be used as bioinks for scaffold printing. *Asian Biomedicine*, *17*(5), 222–229. https://doi.org/10.2478/abm-2023-0063

Lee, J., Hong, J., Kim, W., & Kim, G. H. (2020). Bone-derived dECM/alginate bioink for fabricating a 3D cell-laden mesh structure for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, *250*, 116914. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116914

Lee, S.-M., Zhang, Q., & Le, A. D. (2014). Dental Stem Cells: Sources and Potential Applications. *Current Oral Health Reports*, *1*(1), 34–42. https://doi.org/10.1007/s40496-014-0012-0

Li, N., Guo, R., & Zhang, Z. J. (2021). Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 630488. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630488

Liang, Y., Luan, X., & Liu, X. (2020). Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. *Bioactive Materials*, *5*(2), 297–308. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.02.012

Liao, J., Huang, Y., Wang, Q., Chen, S., Zhang, C., Wang, D., Lv, Z., Zhang, X., Wu, M., & Chen, G. (2022). Gene regulatory network from cranial neural crest cells to

osteoblast differentiation and calvarial bone development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *79*(3), 158. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04208-2

Lin, H., Tang, Y., Lozito, T. P., Oyster, N., Wang, B., & Tuan, R. S. (2019). Efficient in vivo bone formation by BMP-2 engineered human mesenchymal stem cells encapsulated in a projection stereolithographically fabricated hydrogel scaffold. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 254. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1350-6

Liu, K., Meng, C.-X., Lv, Z.-Y., Zhang, Y.-J., Li, J., Li, K.-Y., Liu, F.-Z., Zhang, B., & Cui, F.-Z. (2020). Enhancement of BMP-2 and VEGF carried by mineralized collagen for mandibular bone regeneration. *Regenerative Biomaterials*, *7*(4), 435–440. https://doi.org/10.1093/rb/rbaa022

Liu, Y., Guo, L., Li, X., Liu, S., Du, J., Xu, J., Hu, J., & Liu, Y. (2022). Challenges and Tissue Engineering Strategies of Periodontal-Guided Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*, *28*(8), 405–419. https://doi.org/10.1089/ten.tec.2022.0106

Liu, Z., Jin, H., Xie, Q., Jiang, Z., Guo, S., Li, Y., & Zhang, B. (2019). Controlled Release Strategies for the Combination of Fresh and Lyophilized Platelet-Rich Fibrin on Bone Tissue Regeneration. *BioMed Research International*, *2019*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2019/4923767

Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, *86*, 119–130. https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020

M. Dohan Ehrenfest, D., Bielecki, T., Jimbo, R., Barbe, G., Del Corso, M., Inchingolo, F., & Sammartino, G. (2012). Do the Fibrin Architecture and Leukocyte Content Influence the Growth Factor Release of Platelet Concentrates? An Evidence-based Answer Comparing a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) Gel and a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF). *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(7), 1145–1152. https://doi.org/10.2174/138920112800624382

Ma, P., Wu, W., Wei, Y., Ren, L., Lin, S., & Wu, J. (2021). Biomimetic gelatin/chitosan/polyvinyl alcohol/nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials & Design*, *207*, 109865. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109865

Mahmud, Md. Z. Al, Islam, Md. D., & Mobarak, M. H. (2023). The Development of Eco-Friendly Biopolymers for Use in Tissue Engineering and Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*, *2023*, 1–15. https://doi.org/10.1155/2023/9270064

Maji, K., Dasgupta, S., Kundu, B., & Bissoyi, A. (2015). Development of gelatin-chitosan-hydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size and mechanical strength. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *26*(16), 1190–1209.

Matichescu, A., Ardelean, L. C., Rusu, L.-C., Craciun, D., Bratu, E. A., Babucea, M., & Leretter, M. (2020). Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration—A Review. *Materials*, *13*(22), 5303. https://doi.org/10.3390/ma13225303

Mirek, A., Belaid, H., Barranger, F., Grzeczkowicz, M., Bouden, Y., Cavaillès, V., Lewińska, D., & Bechelany, M. (2022). Development of a new 3D bioprinted antibiotic delivery system based on a cross-linked gelatin–alginate hydrogel. *Journal of Materials Chemistry B*, *10*(43), 8862–8874. https://doi.org/10.1039/D2TB01268E

Mirek, A., Belaid, H., Bartkowiak, A., Barranger, F., Salmeron, F., Kajdan, M., Grzeczkowicz, M., Cavaillès, V., Lewińska, D., & Bechelany, M. (2023). Gelatin methacrylate hydrogel with drug-loaded polymer microspheres as a new bioink for 3D bioprinting. *Biomaterials Advances*, *150*, 213436. https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213436

Mirhaj, M., Salehi, S., Tavakoli, M., Varshosaz, J., Labbaf, S., Abadi, S. A. M., & Haghighi, V. (2022). Comparison of physical, mechanical and biological effects of leucocyte-PRF and advanced-PRF on polyacrylamide nanofiber wound dressings: In vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials Advances*, *141*, 213082. https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213082

Miron, R. J., Moraschini, V., Estrin, N., Shibli, J. A., Cosgarea, R., Jepsen, K., Jervøe-Storm, P., Wang, H., Sculean, A., & Jepsen, S. (2024). Autogenous platelet concentrates for treatment of intrabony defects—A systematic review with meta-analysis. *Periodontology 2000*. https://doi.org/10.1111/prd.12598

Mitra, I., Bose, S., Dernell, W. S., Dasgupta, N., Eckstrand, C., Herrick, J., Yaszemski, M. J., Goodman, S. B., & Bandyopadhyay, A. (2021). 3D Printing in alloy design to improve biocompatibility in metallic implants. *Materials Today*, *45*, 20–34. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.11.021

Mobaraki, M., Ghaffari, M., Yazdanpanah, A., Luo, Y., & Mills, D. K. (2020). Bioinks and bioprinting: A focused review. *Bioprinting*, *18*, e00080. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00080

Moroni, L., Burdick, J. A., Highley, C., Lee, S. J., Morimoto, Y., Takeuchi, S., & Yoo, J. J. (2018). Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nature Reviews Materials*, *3*(5), 21–37. https://doi.org/10.1038/s41578-018-0006-y

Mosaddad, S. A., Rasoolzade, B., Namanloo, R. A., Azarpira, N., & Dortaj, H. (2022). Stem cells and common biomaterials in dentistry: a review study. In *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (Vol. 33, Issue 7). Springer. https://doi.org/10.1007/s10856-022-06676-1

Muskan, Gupta, D., & Negi, N. P. (2022). 3D bioprinting: Printing the future and recent advances. In *Bioprinting* (Vol. 27). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00211

Nacu, I., Bercea, M., Niță, L. E., Peptu, C. A., Butnaru, M., & Vereștiuc, L. (2023). 3D bioprinted scaffolds based on functionalized gelatin for soft tissue engineering. *Reactive and Functional Polymers*, *190*. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105636

Nagayama, K., Kodama, F., Wataya, N., Sato, A., & Matsumoto, T. (2023). Changes in the intra- and extra-mechanical environment of the nucleus in Saos-2 osteoblastic cells during bone differentiation process: Nuclear shrinkage and stiffening in cell

differentiation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *138*, 105630. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2022.105630

Nibali, L., Sultan, D., Arena, C., Pelekos, G., Lin, G., & Tonetti, M. (2021). Periodontal infrabony defects: Systematic review of healing by defect morphology following regenerative surgery. *Journal of Clinical Periodontology*, *48*(1), 101–114. https://doi.org/10.1111/jcpe.13381

Nicolas, J., Magli, S., Rabbachin, L., Sampaolesi, S., Nicotra, F., & Russo, L. (2020). 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate. *Biomacromolecules*, *21*(6), 1968–1994. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00045

Nyberg, E., Rindone, A., Dorafshar, A., & Grayson, W. L. (2017). Comparison of 3D-Printed Poly-ε-Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix <sup/>. *Tissue Engineering Part A*, *23*(11–12), 503–514. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0418

Ojansivu, M., Rashad, A., Ahlinder, A., Massera, J., Mishra, A., Syverud, K., Finne-Wistrand, A., Miettinen, S., & Mustafa, K. (2019). Wood-based nanocellulose and bioactive glass modified gelatin–alginate bioinks for 3D bioprinting of bone cells. *Biofabrication*, *11*(3), 035010. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab0692

Olesen, U. K., Eckardt, H., Bosemark, P., Paulsen, A. W., Dahl, B., & Hede, A. (2015). The Masquelet technique of induced membrane for healing of bone defects. A review of 8 cases. *Injury*, *46*, S44–S47. https://doi.org/10.1016/S0020-1383(15)30054-1

Oryan, A., Alidadi, S., & Moshiri, A. (2013). Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard Tissue*, *2*(2). https://doi.org/10.13172/2050-2303-2-2-374

Ou, M., & Huang, X. (2021). Influence of bone formation by composite scaffolds with different proportions of hydroxyapatite and collagen. *Dental Materials*, *37*(4), e231–e244. https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.12.006

Park, J. H., Gillispie, G. J., Copus, J. S., Zhang, W., Atala, A., Yoo, J. J., Yelick, P. C., & Lee, S. J. (2020). The effect of BMP-mimetic peptide tethering bioinks on the differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs) in 3D bioprinted dental constructs. *Biofabrication*, *12*(3), 035029. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab9492

Patel, H., Bonde, M., & Srinivasan, G. %J T. B. A. O. (2011). *Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering*. *25*(1), 20–29.

Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., & Jungst, T. (2017). Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, *9*(4), 044107. https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8

Piard, C. M., Chen, Y., & Fisher, J. P. (2015). Cell-Laden 3D Printed Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, *13*(4), 245–255. https://doi.org/10.1007/s12018-015-9198-5

Pinto, N., Yu, J., Koirala, S., Mourão, C. F., Andrade, C., Rescigno, E., Zamora, Y., Pinto, D., & Quirynen, M. (2024). L-PRF in extra-oral wound care. *Periodontology 2000*. https://doi.org/10.1111/prd.12605

Preethi Soundarya, S., Haritha Menon, A., Viji Chandran, S., & Selvamurugan, N. (2018). Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, *119*, 1228–1239. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.056

Prem Ananth, K., & Jayram, N. D. (2024). A comprehensive review of 3D printing techniques for biomaterial-based scaffold fabrication in bone tissue engineering. *Annals of 3D Printed Medicine*, *13*, 100141. https://doi.org/10.1016/j.stlm.2023.100141

Pugliese, R., Beltrami, B., Regondi, S., & Lunetta, C. (2021). Polymeric biomaterials for 3D printing in medicine: An overview. *Annals of 3D Printed Medicine*, *2*, 100011. https://doi.org/10.1016/j.stlm.2021.100011

Pupilli, F., Ruffini, A., Dapporto, M., Tavoni, M., Tampieri, A., & Sprio, S. (2022). Design Strategies and Biomimetic Approaches for Calcium Phosphate Scaffolds in Bone Tissue Regeneration. *Biomimetics*, *7*(3), 112. https://doi.org/10.3390/biomimetics7030112

Qasim, M., Chae, D. S., & Lee, N. Y. (2019). Advancements and frontiers in nano-based 3D and 4D scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 4333–4351. https://doi.org/10.2147/IJN.S209431

Queiroz, A., Albuquerque-Souza, E., Gasparoni, L. M., França, B. N. de, Pelissari, C., Trierveiler, M., & Holzhausen, M. (2021). Therapeutic potential of periodontal ligament stem cells. *World Journal of Stem Cells*, *13*(6), 605–618. https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i6.605

Quirynen, M., Blanco, J., Wang, H. -L., Donos, N., Temmerman, A., Castro, A., & Pinto, N. (2024). Instructions for the use of <scp>L-PRF</scp> in different clinical indications. *Periodontology 2000*. https://doi.org/10.1111/prd.12564

Quirynen, M., Siawasch, S., Temmerman, A., Cortellini, S., Dhondt, R., Teughels, W., & Castro, A. B. (2023). Do autologous platelet concentrates (<scp>APCs</scp>) have a role in intra-oral bone regeneration? A critical review of clinical guidelines on decision-making process. *Periodontology 2000*, *93*(1), 254–269. https://doi.org/10.1111/prd.12526

Rajula, M. P. B., Narayanan, V., Venkatasubbu, G. D., Mani, R. C., & Sujana, A. (2021). Nano-Hydroxyapatite: A Driving Force for Bone Tissue Engineering. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, *13*(Suppl 1), S11–S14. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_683_20

Ramesan, M. T., Sankar, S., Kalladi, A. J., Labeeba Abdulla, A. C., & Bahuleyan, B. K. (2024). Hydroxyapatite nanoparticles reinforced polyvinyl alcohol/chitosan blend for optical and energy storage applications. *Polymer Engineering & Science*, *64*(3), 1378–1390. https://doi.org/10.1002/pen.26623

Raveau, S., & Jordana, F. (2020). Tissue Engineering and Three-Dimensional Printing in Periodontal Regeneration: A Literature Review. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(12), 4008. https://doi.org/10.3390/jcm9124008

Raveendran, N., Ivanovski, S., & Vaquette, C. (2023). The effect of culture conditions on the bone regeneration potential of osteoblast-laden 3D bioprinted constructs. *Acta Biomaterialia*, *156*, 190–201. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.042

Ravi, S., & Santhanakrishnan, M. (2020). Mechanical, chemical, structural analysis and comparative release of PDGF-AA from L-PRF, A-PRF and T-PRF - an in vitro study. *Biomaterials Research*, *24*(1). https://doi.org/10.1186/s40824-020-00193-4

Reynolds, M. A., Aichelmann-Reidy, M. E., & Branch-Mays, G. L. (2010). Regeneration of Periodontal Tissue: Bone Replacement Grafts. *Dental Clinics of North America*, *54*(1), 55–71. https://doi.org/10.1016/j.cden.2009.09.003

Ribeiro, A., Blokzijl, M. M., Levato, R., Visser, C. W., Castilho, M., Hennink, W. E., Vermonden, T., & Malda, J. (2018). Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication*, *10*(1). https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa90e2

Ribeiro, E. D., de Santana, I. H. G., Viana, M. R. M., Júnior, E. S. H., Dias, J. C. P., Ferreira-Júnior, O., & Sant'Ana, E. (2024). The efficacy of Platelet and Leukocyte Rich Fibrin (L-PRF) in the healing process and bone repair in oral and maxillofacial surgeries: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, *28*(7), 414. https://doi.org/10.1007/s00784-024-05817-w

Rodriguez-Lorenzo, L. M., Saldaña, L., Benito-Garzón, L., García-Carrodeguas, R., de Aza, S., Vilaboa, N., & Román, J. S. (2012). Feasibility of ceramic-polymer composite cryogels as scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *6*(6), 421–433. https://doi.org/10.1002/term.443

Rojas, M. A., Marini, L., Pilloni, A., & Sahrmann, P. (2019). Early wound healing outcomes after regenerative periodontal surgery with enamel matrix derivatives or guided tissue regeneration: a systematic review. *BMC Oral Health*, *19*(1), 76. https://doi.org/10.1186/s12903-019-0766-9

Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*, *22*, 95–106. https://doi.org/10.12659/msmbr.901142

Saarai, A., Kasparkova, V., Sedlacek, T., & Saha, P. (2013). On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *18*, 152–166. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.11.010

Salah, M., Tayebi, L., Moharamzadeh, K., & Naini, F. B. (2020). Three-dimensional bio-printing and bone tissue engineering: technical innovations and potential applications in maxillofacial reconstructive surgery. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, *42*(1), 18. https://doi.org/10.1186/s40902-020-00263-6

Sánchez-Sánchez, R., Rodríguez-Rego, J. M., Macías-García, A., Mendoza-Cerezo, L., & Díaz-Parralejo, A. (2023). Relationship between shear-thinning rheological properties of bioinks and bioprinting parameters. *International Journal of Bioprinting*, *9*(2), 422–431. https://doi.org/10.18063/IJB.687

Sancilio, S., Gallorini, M., Di Nisio, C., Marsich, E., Di Pietro, R., Schweikl, H., & Cataldi, A. (2018). Alginate/Hydroxyapatite-Based Nanocomposite Scaffolds for Bone

Tissue Engineering Improve Dental Pulp Biomineralization and Differentiation. *Stem Cells International*, *2018*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2018/9643721

Schütz, K., Placht, A.-M., Paul, B., Brüggemeier, S., Gelinsky, M., & Lode, A. (2017). Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *11*(5), 1574–1587. https://doi.org/10.1002/term.2058

Seciu, A.-M., Craciunescu, O., Stanciuc, A.-M., & Zarnescu, O. (2019). Tailored Biomaterials for Therapeutic Strategies Applied in Periodontal Tissue Engineering. *Stem Cells and Development*, *28*(15), 963–973. https://doi.org/10.1089/scd.2019.0016

Serna, J. A., Florez, S. L., Talero, V. A., Briceño, J. C., Muñoz-Camargo, C., & Cruz, J. C. (2019). Formulation and Characterization of a SIS-Based Photocrosslinkable Bioink. *Polymers*, *11*(3), 569. https://doi.org/10.3390/polym11030569

Shaheen, Th. I., Montaser, A. S., & Li, S. (2019). Effect of cellulose nanocrystals on scaffolds comprising chitosan, alginate and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *121*, 814–821. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.081

Shang, F., Yu, Y., Liu, S., Ming, L., Zhang, Y., Zhou, Z., Zhao, J., & Jin, Y. (2021). Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioactive Materials*, *6*(3), 666–683. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.014

Sharma, C., Dinda, A. K., Potdar, P. D., Chou, C. F., & Mishra, N. C. (2016). Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, *64*, 416–427. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.060

Sheikh, Z., Hamdan, N., Ikeda, Y., Grynpas, M., Ganss, B., & Glogauer, M. (2017). Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials Research*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s40824-017-0095-5

Shi, X., Su, K., Varshney, R. R., Wang, Y., & Wang, D.-A. (2011). Sintered Microsphere Scaffolds for Controlled Release and Tissue Engineering. *Pharmaceutical Research*, *28*(5), 1224–1228. https://doi.org/10.1007/s11095-010-0359-4

Sigron, G. R., Rüedi, N., Chammartin, F., Meyer, S., Msallem, B., Kunz, C., & Thieringer, F. M. (2020). Three-Dimensional Analysis of Isolated Orbital Floor Fractures Pre- and Post-Reconstruction with Standard Titanium Meshes and “Hybrid” Patient-Specific Implants. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(5), 1579. https://doi.org/10.3390/jcm9051579

Skopinska-Wisniewska, J., Tuszynska, M., & Olewnik-Kruszkowska, E. (2021). Comparative study of gelatin hydrogels modified by various cross-linking agents. *Materials*, *14*(2), 1–17. https://doi.org/10.3390/ma14020396

Slack, J. M. W. (2018). What is a stem cell? *WIREs Developmental Biology*, *7*(5). https://doi.org/10.1002/wdev.323

Sonnleitner, D., Schrüfer, S., Berglund, L., Schubert, D. W., & Lang, G. (2021). Correlating rheology and printing performance of fiber-reinforced bioinks to

assess predictive modelling for biofabrication. *Journal of Materials Research*, *36*(19), 3821–3832. https://doi.org/10.1557/s43578-021-00276-5

Stanco, D., Boffito, M., Bogni, A., Puricelli, L., Barrero, J., Soldati, G., & Ciardelli, G. (2020). 3D Bioprinting of Human Adipose-Derived Stem Cells and Their Tenogenic Differentiation in Clinical-Grade Medium. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22). https://doi.org/10.3390/ijms21228694

Su, X., Wang, T., & Guo, S. (2021). Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regenerative Therapy*, *16*, 63–72. https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.007

Sui, X., Zhang, H., Yao, J., Yang, L., Zhang, X., Li, L., Wang, J., Li, M., & Liu, Z. (2023). 3D printing of 'green' thermo-sensitive chitosan-hydroxyapatite bone scaffold based on lyophilized platelet-rich fibrin. *Biomedical Materials*, *18*(2), 025022. https://doi.org/10.1088/1748-605X/acbad5

Swanson, W. B., Yao, Y., & Mishina, Y. (2022). Novel approaches for periodontal tissue engineering. *Genesis*, *60*(8–9). https://doi.org/10.1002/dvg.23499

Tajvar, S., Hadjizadeh, A., & Samandari, S. S. (2023). Scaffold degradation in bone tissue engineering: An overview. In *International Biodeterioration and Biodegradation* (Vol. 180). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105599

Tan, W. S., Arulselvan, P., Ng, S.-F., Taib, C. N. M., Sarian, M. N., & Fakurazi, S. (2020). Healing Effect of Vicenin-2 (VCN-2) on Human Dermal Fibroblast (HDF) and Development VCN-2 Hydrocolloid Film Based on Alginate as Potential Wound Dressing. *BioMed Research International*, *2020*, 1–15. https://doi.org/10.1155/2020/4730858

Tan, Y., Ma, L., Chen, X., Ran, Y., Tong, Q., Tang, L., & Li, X. (2022). Injectable hyaluronic acid/hydroxyapatite composite hydrogels as cell carriers for bone repair. *International Journal of Biological Macromolecules*, *216*, 547–557. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.009

Tatullo, M., Marrelli, M., Paduano, F., Palmieri, F., Rengo, S., Rengo, C., Spagnuolo, G., & Codispoti, B. (2019). Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Oral and Maxillofacial Surgery: The Most Important Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells. In *Regenerative Medicine and Plastic Surgery* (pp. 337–348). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19958-6_29

Titsinides, S., Agrogiannis, G., & Karatzas, T. (2019). Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Japanese Dental Science Review*, *55*(1), 26–32. https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.003

Tiwari, S., Patil, R., & Bahadur, P. (2018). Polysaccharide Based Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications. *Polymers*, *11*(1). https://doi.org/10.3390/polym11010001

Tocchio, A., Durmus, N. G., Sridhar, K., Mani, V., Coskun, B., El Assal, R., & Demirci, U. (2018). Magnetically Guided Self-Assembly and Coding of 3D Living Architectures. *Advanced Materials*, *30*(4). https://doi.org/10.1002/adma.201705034

Tsutsui, T. (2020). Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications . *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, *Volume 13*, 33–42. https://doi.org/10.2147/SCCAA.S166759

Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., Li, B., & Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, *3*(3), 278–314. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001

Ukpai, G., Sahyoun, J., Stuart, R., Wang, S., Xiao, Z., & Rubinsky, B. (2019). A Parallel Multiple Layer Cryolithography Device for the Manufacture of Biological Material for Tissue Engineering. *Journal of Medical Devices*, *13*(3). https://doi.org/10.1115/1.4043080

Ulusoy, A. T., Turedi, I., Cimen, M., & Cehreli, Z. C. (2019). Evaluation of Blood Clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. *Journal of Endodontics*, *45*(5), 560–566. https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.02.002

Valot, L., Martinez, J., Mehdi, A., & Subra, G. (2019). Chemical insights into bioinks for 3D printing. *Chemical Society Reviews*, *48*(15), 4049–4086. https://doi.org/10.1039/C7CS00718C

Van Hoorick, J., Tytgat, L., Dobos, A., Ottevaere, H., Van Erps, J., Thienpont, H., Ovsianikov, A., Dubruel, P., & Van Vlierberghe, S. (2019). (Photo-)crosslinkable gelatin derivatives for biofabrication applications. *Acta Biomaterialia*, *97*, 46–73. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.07.035

Vaquette, C., Saifzadeh, S., Farag, A., Hutmacher, D. W., & Ivanovski, S. (2019). Periodontal Tissue Engineering with a Multiphasic Construct and Cell Sheets. *Journal of Dental Research*, *98*(6), 673–681. https://doi.org/10.1177/0022034519837967

Wang, X., Fok, M. R., Pelekos, G., Jin, L., & Tonetti, M. S. (2022). In Vitro and Ex Vivo Kinetic Release Profile of Growth Factors and Cytokines from Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) Preparations. *Cells*, *11*(13), 2089. https://doi.org/10.3390/cells11132089

Wu, E., Huang, L., Shen, Y., Wei, Z., Li, Y., Wang, J., & Chen, Z. (2024). Application of gelatin-based composites in bone tissue engineering. *Heliyon*, *10*(16), e36258. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36258

Wu, Jinfu., Qin, C., Ma, J., Zhang, H., Chang, J., Mao, L., & Wu, C. (2021). An immunomodulatory bioink with hollow manganese silicate nanospheres for angiogenesis. *Applied Materials Today*, *23*, 101015. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101015

Xu, H.-Q., Liu, J.-C., Zhang, Z.-Y., & Xu, C.-X. (2022). A review on cell damage, viability, and functionality during 3D bioprinting. *Military Medical Research*, *9*(1), 70. https://doi.org/10.1186/s40779-022-00429-5

Xue, X., Hu, Y., Deng, Y., & Su, J. (2021). Recent Advances in Design of Functional Biocompatible Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, *31*(19). https://doi.org/10.1002/adfm.202009432

Yang, Y., Wang, M., Yang, S., Lin, Y., Zhou, Q., Li, H., & Tang, T. (2020). Bioprinting of an osteocyte network for biomimetic mineralization. *Biofabrication*, *12*(4), 045013. https://doi.org/10.1088/1758-5090/aba1d0

Yi, K., Li, Q., Lian, X., Wang, Y., & Tang, Z. (2022). Utilizing 3D bioprinted platelet-rich fibrin-based materials to promote the regeneration of oral soft tissue. *Regenerative Biomaterials*, *9*. https://doi.org/10.1093/rb/rbac021

Yu, X., Jiang, S., Li, D., Shen, S. GF., Wang, X., & Lin, K. (2024). Osteoimmunomodulatory bioinks for 3D bioprinting achieve complete regeneration of critical-sized bone defects. *Composites Part B: Engineering*, *273*, 111256. https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2024.111256

Yun, Y.-R., Jang, J. H., Jeon, E., Kang, W., Lee, S., Won, J.-E., Kim, H. W., & Wall, I. (2012). Administration of Growth Factors for Bone Regeneration. *Regenerative Medicine*, *7*(3), 369–385. https://doi.org/10.2217/rme.12.1

Zamani, Y., Mohammadi, J., Amoabediny, G., Helder, M. N., Zandieh-Doulabi, B., & Klein-Nulend, J. (2021). Bioprinting of Alginate-Encapsulated Pre-osteoblasts in PLGA/β-TCP Scaffolds Enhances Cell Retention but Impairs Osteogenic Differentiation Compared to Cell Seeding after 3D-Printing. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, *7*(4), 485–493. https://doi.org/10.1007/s40883-020-00163-1

Zhang, Q., Wang, W., Schmelzer, E., Gerlach, J., Liu, C., & Nettleship, I. (2021a). The degradation behavior of calcium-rich hydroxyapatite foams in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *109*(6), 859–868. https://doi.org/10.1002/jbm.a.37077

Zhang, Q., Wang, W., Schmelzer, E., Gerlach, J., Liu, C., & Nettleship, I. (2021b). The degradation behavior of calcium-rich hydroxyapatite foams in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *109*(6), 859–868. https://doi.org/10.1002/jbm.a.37077

Zhang, Q., Wang, W., Schmelzer, E., Gerlach, J., Liu, C., & Nettleship, I. (2021c). The degradation behavior of calcium-rich hydroxyapatite foams in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *109*(6), 859–868. https://doi.org/10.1002/jbm.a.37077

Zhang, Y., Wu, D., Zhao, X., Pakvasa, M., Tucker, A. B., Luo, H., Qin, K. H., Hu, D. A., Wang, E. J., Li, A. J., Zhang, M., Mao, Y., Sabharwal, M., He, F., Niu, C., Wang, H., Huang, L., Shi, D., Liu, Q., … El Dafrawy, M. (2020). Stem Cell-Friendly Scaffold Biomaterials: Applications for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598607

Zhao, F., Maren, N. A., Kosentka, P. Z., Liao, Y.-Y., Lu, H., Duduit, J. R., Huang, D., Ashrafi, H., Zhao, T., Huerta, A. I., Ranney, T. G., & Liu, W. (2021). An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. *Horticulture Research*, *8*(1), 179. https://doi.org/10.1038/s41438-021-00616-w

Zhao, R., Meng, X., Pan, Z., Li, Y., Qian, H., Yang, X., Zhu, X., & Zhang, X. (2024). *Recent Advances in Nanohydroxyapatite: Synthesis Methods, Biomedical Applications, and Innovations in Composites*. https://doi.org/10.2139/ssrn.4860788

Zhu, J., & Marchant, R. E. (2011). Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*, *8*(5), 607–626. https://doi.org/10.1586/erd.11.27

ANEXO 1. Acta comité de ética

Pontificia Universidad JAVERIANA Bogotá | Facultad de Odontología

Formato 02-Aval CIE (Revisado por la Dirección Jurídica en febrero de 2018)

EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA DE LA Facultad DE ODONTOLOGÍA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

CERTIFICA:

Que el proyecto de investigación titulado "**CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y BIOLÓGICA DE ANDAMIOS IMPRESOS EN 3D Y BIOIMPRESOS A BASE DE BIOTINTA OPTIMIZADA COMPUESTA POR NANOHIDROXIAPATITA, GELATINA, QUITOSANO, Y ALGINATO MODIFICADA CON FIBRINA RICA EN PLAQUETAS Y LEUCOCITOS (L-PRF)**", registrado como **OD-0370** y cuyo investigador principal es Dra. **DABEIBA ADRIANA GARCÍA ROBAYO**; garciad@javeriana.edu.co, profesor del Departamento del sistema **BUCAL**, fue evaluado y aprobado por este Comité de Investigación y Ética, en su sesión del **10 de marzo de 2023**, considerando la pertinencia de la investigación, el rigor metodológico, su calidad científica, la coherencia y la racionalidad del presupuesto propuesto y el cumplimiento de las normas científicas, técnicas y éticas, nacionales e internacionales que rigen este tipo de investigaciones.

El proyecto implica investigación con ***IN VITRO*** y se ajusta a las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993, la Resolución 2378 de 2008, el Decreto 309 de 2000 y el Decreto 1076 de 2015.

La categoría de riesgo para los seres humanos que tiene la propuesta pertenece a la de " Investigación sin riesgo".
Sobre el posible impacto en el medio ambiente, el comité conceptúa que, por la naturaleza de la investigación, el proyecto no tiene efectos negativos sobre el medio ambiente.

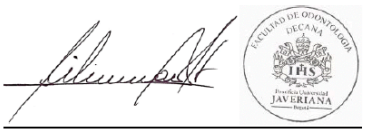
La ejecución de procedimientos del laboratorio previstos en esta investigación se regirá bajo las normas de bioseguridad del laboratorio CENTRO DE INVESTIGACIONES ODONTOLÓGICAS (CIO) de la Facultad de ODONTOLOGÍA. Las normas se basan en el Decreto 2676 de 2000, por el cual se reglamenta la gestión integral de los residuos hospitalarios y similares.

No requiere de consentimiento informado.

Para este proyecto se prevé la obtención de resultados tales como andamios 3D para el cultivo in vitro de tejidos, los cuales ameritan ser protegidos por los instrumentos de propiedad intelectual (y/o) ser explotados comercialmente. Por lo anterior, se solicitará a la Universidad adelantar los trámites respectivos según lo previsto en la política de propiedad intelectual.

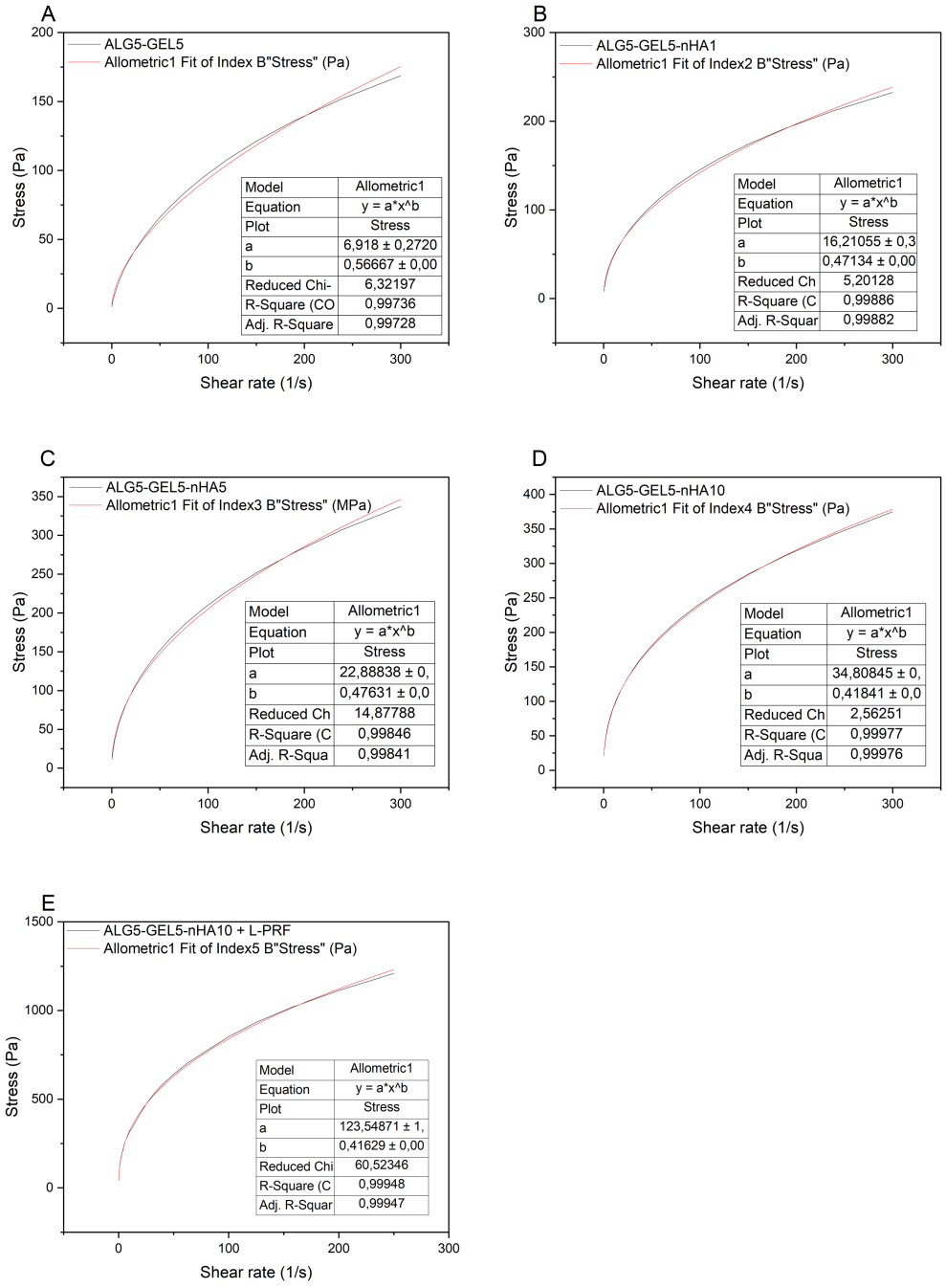
Con base en lo expresado anteriormente, el Comité de Investigación y Ética conceptúa que el proyecto cumple con todos los requisitos de calidad exigidos y en consecuencia otorga su aprobación; el respectivo concepto se consigna en el acta N° 004 de 2023 de la correspondiente sesión.

Se expide esta certificación el 17 de marzo de 2023

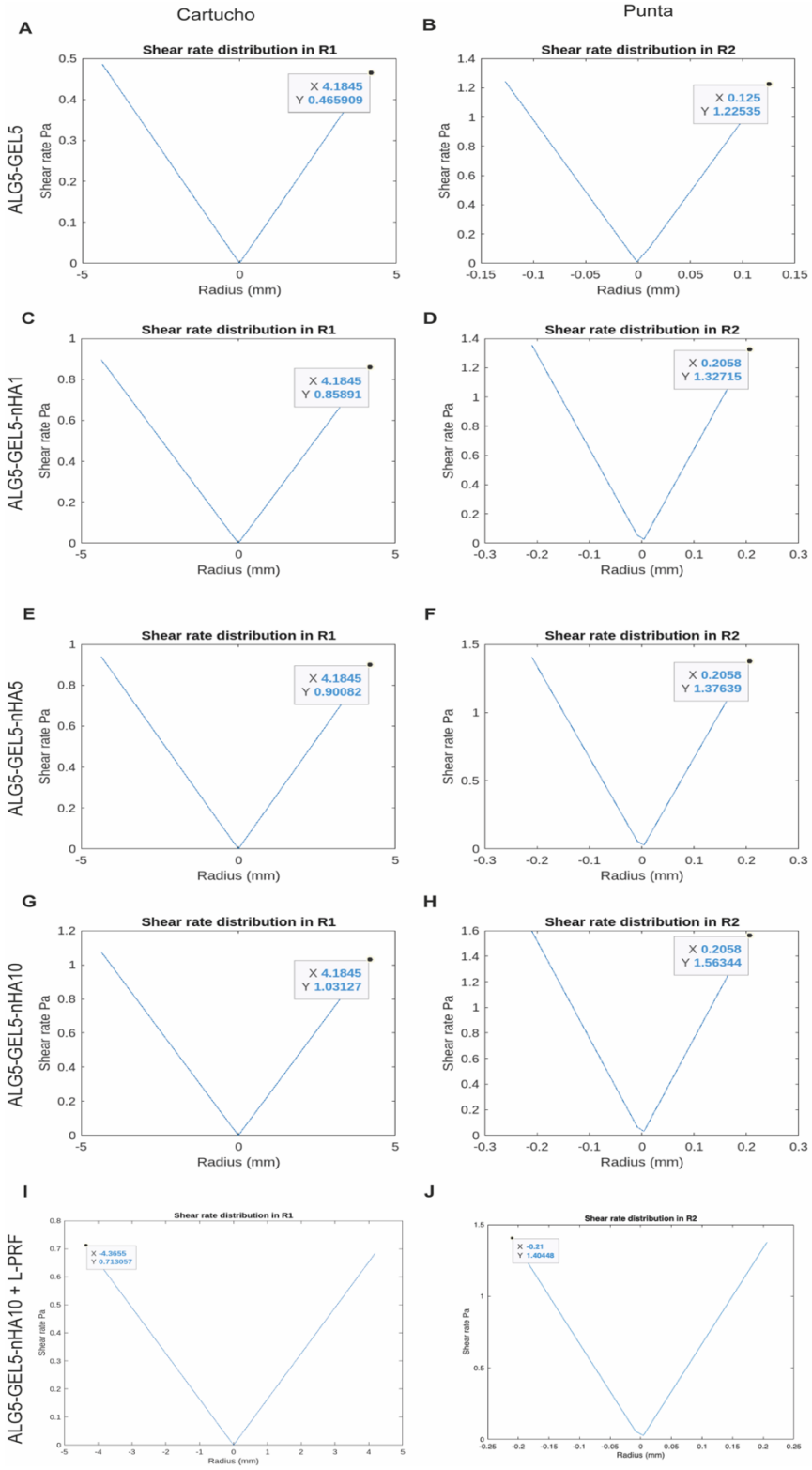


Presidente del Comité de Investigación y Ética
Facultad de Odontología

ANEXO 2. Gráfica de esfuerzo cortante (Pa) vs. tasa de corte (1/s). Se caracterizó el comportamiento pseudoplástico y se determinaron los parámetros de viscosidad para todas las biotintas. (A) ALG5-GEL5; (B) ALG5-GEL5-nHA1; (C) ALG5-GEL5-nHA5; (D) ALG5-GEL5-nHA10. ALG: Algina, GEL: Gelatina, nHA: Nanohidroxiapatita.



ANEXO 3. Determinación de la presión en la punta y el cartucho en las biotintas. (A,B) ALG5-GEL5; (C,D) ALG5-GEL5-nHA1; (E,F) ALG5-GEL5-nHA5; (G,H) ALG5-GEL5-nHA10. ALG: Algina, GEL: Gelatina, nHA: Nanohidroxiapatita.



polymers

MDPI

Article

Influence of Hydroxyapatite and Gelatin Content on Crosslinking Dynamics and HDFn Cell Viability in Alginate Bioinks for 3D Bioprinting

Lina Maria Anaya-Sampayo [1], Nelly S. Roa [1], Constanza Martínez-Cardozo [2], Dabeiba Adriana García-Robayo [1,*] and Luis M. Rodríguez-Lorenzo [3,*]

[1] Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá 110231, Colombia; linamanaya@javeriana.edu.co (L.M.A.-S.); nelly.roa@javeriana.edu.co (N.S.R.)
[2] School of Dentistry, Universidad de los Andes, Santiago 7620086, Chile; cemartinezc@uandes.cl
[3] Department of Polymeric Nanomaterials and Biomaterials, Institute Science and Technology of Polymers (ICTP-CSIC), 28006 Madrid, Spain
* Correspondence: garciad@javeriana.edu.co (D.A.G.-R.); luis.rodriguez-lorenzo@ictp.csic.es (L.M.R.-L.)

Abstract: This study investigates how varying concentrations of hydroxyapatite (OHAp) and the addition of gelatin influence the ionic crosslinking time of alginate-based bioinks, as well as the shear stress experienced by neonatal human dermal fibroblasts (HDFn) during extrusion. These factors are crucial for validating bioinks and developing viable 3D bioprinted models. Four bioink formulations were created with a 50/50 ratio of alginate to gelatin, incorporating different calcium phosphate concentrations (0%, 1%, 5%, and 10%). The bioink compositions were confirmed via Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy, and rheological analyses evaluated their pseudoplastic behavior, printability limits, and crosslinking times. The results indicated a notable increase in the consistency index (k) from 0.32 for the 0% OHAp formulation to 0.48 for the 10% OHAp formulation, suggesting improved viscoelastic properties. The elastic modulus recovery after crosslinking rose significantly from 245 Pa to 455 Pa. HDFn experienced a shear stress of up to 1.5436 Pa at the tip during extrusion with the HDFn-ALG5-GEL5-OHAp10 bioinks, calculated at a shear rate as low as 2 s^{-1}. Viability assays confirmed over 70% cell viability 24 h post-extrusion and 92% viability after 7 days for the 10% OHAp formulation, highlighting the potential of hydroxyapatite-enhanced bioinks in tissue engineering applications.

Keywords: bioinks; 3D bioprinting; alginate; gelatin; hydroxyapatite; cell viability; shear stress

check for updates

Citation: Anaya-Sampayo, L.M.; Roa, N.S.; Martínez-Cardozo, C.; García-Robayo, D.A.; Rodríguez-Lorenzo, L.M. Influence of Hydroxyapatite and Gelatin Content on Crosslinking Dynamics and HDFn Cell Viability in Alginate Bioinks for 3D Bioprinting. *Polymers* **2024**, *16*, 3224. https://doi.org/10.3390/polym16223224

Academic Editors: Seongcheol Kim and Vanaraj Ramkumar

Received: 18 October 2024
Revised: 11 November 2024
Accepted: 15 November 2024
Published: 20 November 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

3D bioprinting is a novel tissue engineering technology that is capable of mimicking desired tissue characteristics by combining a digital model with biomaterials and encapsulating cells to provide a three-dimensional environment, thus allowing for their homogeneous distribution within the construct [1,2]. 3D bioprinting potential is based on the capacity to yield appropriate cell distribution, key in facilitating cell interactions that should contribute to the growth of the tissue in a uniform manner [3]. Extrusion-based bioprinting is widely used in 3D bioprinting because of its affordability. Additionally, the deposition process is controlled, and a wide range of biomaterial inks can be obtained, mainly using polysaccharides [4]. Bioinks result from incorporating cells into a pseudoplastic biomaterial, which is extruded through a nozzle. The objective is to minimize the damage cells may suffer under pressure [5]. Most of the research into bioprinting is carried out by biology-based laboratories searching for quick biological responses, frequently not investigating the required bioink properties [4].

Bioprinting requires a rapid cross-linking process in the selected gel to build a tridimensional structure that may function as a scaffold. Gels made of mixtures of different

components, such as the one herein presented, offer the potential of assaying different cross-linking procedures. However, ionic crosslinking with calcium ions is preferred for biomedical applications because of the mild conditions that can be used and the simplicity of ionotropic gelation, which avoids potentially toxic reagents or UV radiation. Therefore, alginate is the most widely used component in bioinks, among others, in addition to price or availability [4].

This study aimed to evaluate the printability and gelling capability of a bioink made of neonatal human dermal fibroblasts (HDFn), alginate (ALG), gelatin (GEL), and hydroxyapatite (OHAp) as a first step and proof of concept for the development of 3D bioprinted constructs intended for bone regeneration. Alginate has been selected for its ionic gelling capacity, reduced cytotoxicity, biodegradability, high availability, and low cost [6]. Alginate hydrogels can be formed by ionic crosslinking in the presence of calcium ions [7], attaining similar mechanical properties to extracellular matrices (ECM). Mimicking the ECM's mechanical properties is one of the primary objectives intended for bone regeneration therapies [8]. However, alginate hydrogels lack biological cues that facilitate the attachment and proliferation of cells. Therefore, gelatin has been incorporated as a hydrogel component. Gelatin is a collagen derivative containing an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence required for adhesion in multiple cell types [9]. In addition, it presents faster biodegradability than collagen. It is easy to prepare; however, it presents thermal gelation with a 35 °C phase transition that may interfere with the construct's mechanical properties once it is placed in the cell culture incubator [10]. Hydroxyapatite has been incorporated to induce a higher mineralization capacity while increasing the mechanical stability of the construct [11,12].

Neonatal human dermal fibroblasts (HDFn) have been selected for this proof-of-concept investigation due to their significance in bioprinting. Moreover, because of their pivotal role in synthesizing and maintaining the extracellular matrix (ECM) of connective tissue [13,14] HDFs proliferate rapidly and have high ECM synthesis rates; both characteristics are valuable for cytocompatibility in vitro studies and for creating bioprinted scaffolds in tissue regeneration [13,14]. Previous studies have reported using HDFs in bioprinting with gelatin and hydroxyapatite to provide structural support and promote cellular adhesion and proliferation [15–17]. However, to our knowledge, the presence of calcium phosphate particles, in addition to gelatin, affecting the bioprinting limits has not been evaluated. Furthermore, the necessity of the bioink's rapid ionic crosslinking to establish a stable construct and whether the presence of hydroxyapatite particles affects the shear stress experienced by cells on the tip during the extrusion process still needs to be defined to ultimately determine its effect on cell viability. These are essential parameters for the validation of a bioink and the creation of 3D bioprinted viable models.

2. Materials and Methods

2.1. Inks Preparation

Four different inks were prepared using the following concentrations: alginate 5% *w*/*v*, gelatin 5% *w*/*v* (ALG5-GEL5); alginate 5% *w*/*v*, gelatin 5% *w*/*v*, OHAp 1% *w*/*v* (ALG5-GEL5-OHAp1); alginate 5% *w*/*v*, gelatin 5% *w*/*v*, OHAp 5%*w*/*v* (ALG5-GEL5-OHAp5); and alginate 5% *w*/*v*, gelatin 5% *w*/*v*, OHAp 10% *w*/*v* (ALG5-GEL5-OHAp10). All inks were prepared to a final volume of 10 mL. ALG used was obtained from brown algae (Mw: 8945 g/mol, mannuronate/guluronate ratio of 0.63) (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) [7]. GEL was obtained from (Mw: 60 kDa, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). Hydroxyapatite (OHAp) had been prepared by $Ca(OH)_2$ reaction with H_3PO_4 at a pH of 9.4. A detailed synthesis and characterization description can be found elsewhere [18]. The specific surface area was 62 m^2/g, and the particle size D50 was 4.034 µm. Calcium chloride dihydrate (Sigma, Madrid, Spain) was obtained commercially from Sigma–Aldrich® (Madrid, Spain). All materials were dissolved in DMEM low glucose (Gibco™/Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands). ALG was dissolved at 10% *w*/*v* at 4 °C for 24 h. Subsequently, the GEL was prepared at 10% *w*/*v* at 40 °C for 1 h; for inks with OHAp, the powder was added directly to the GEL as follows: 100 mg, 500 mg, and 1000 mg according to concentrations of 1, 5, and 10 of OHAp wt.%, respectively,

and stirred for an additional 1 h. Following, the ALG solution was added and homogenized for 1 h. All inks were prepared to a final volume of 10 mL of DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco™/Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands) and an antibiotic–antimycotic mixture (Penicillin 100 units/mL, Streptomycin 100 µg/mL and 25 µg/mL of Amphotericin B, Gibco™/Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands). A pH measurement and adjustment (7.0) were performed before their use. Four compositions were obtained, as described in Table 1.

Table 1. Nomenclature, composition, and power-law parameters of the prepared inks.

Ink Code	Alg (wt.%)	GEL (wt.%)	OHAp (wt.%)	K	*n*
ALG5-GEL5	5	5	0	6.918	0.56667
ALG5-GEL5-OHAp1	5	5	1	16.21055 ***	0.47134
ALG5-GEL5-OHAp5	5	5	5	22.88838 ***	0.46120
ALG5-GEL5-OHAp10	5	5	10	34.80845 ***	0.41841

*** $p < 0.0001$.

2.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

FT-IR analyses were performed to identify functional groups in dry samples of ALG, GEL, OHAp, and the synthesized inks. This analysis is crucial for understanding the chemical structure of the bioinks, as it allows for the identification of interactions such as the crosslinking between alginate and chloride ions [19]. The spectra were obtained utilizing an ATR-coupled Spectrum-Two Perkin Elmer spectrophotometer (PerkinElmer, Shelton, CT, USA), scanned across the 400–4000 cm^{-1} range with a resolution of 4.00 cm^{-1} and 16 scans [20].

2.3. Rheological Characterization

Rheological measurements were performed on an AR-G2 rheometer (TA Instruments, New Castle, DE, USA) with a sand-blasted parallel-plate geometry (diameter: 25 mm). Samples were loaded onto the preheated at 25 °C rheometer Peltier plate using a syringe and measured after 30 s of stabilization. A shear rate sweep ranging from 0.1 to 300 s^{-1} was recorded. Also, the yield stress point was calculated as the intersection between viscosity and shear stress [21]. Rotational recovery was measured in each ink by subjecting it to a shear rate of 1 s^{-1} for 60 s, followed by a shear rate of 100 s^{-1} for 30 s. This process was performed twice at the maximum shear rate (100 s^{-1}) and three times at the minimum shear rate (1 s^{-1}) to evaluate the material's behavior in the recovery process [21]. A Linear viscoelastic region (LVR) was determined with an oscillatory stress sweep test at 1 Hz to select a 1% strain at 25 °C and perform a frequency sweep between 0.01 and 100 Hz. After crosslinking with 1.5% $CaCl_2$, a time test (conditions) at 25 °C for 10 min followed by 20 min at 37 °C was performed [21].

Shear-thinning fluids are also characterized by the Ostwald–de Waele power law model. This equation is given by $\tau = K(\dot{\gamma})^n$, where τ refers to the shear stress, and γ denotes the shear rate, which is linked to the fluid's viscosity. The parameter K defines the flow consistency, and n is the flow behavior index. The shear stress versus shear rate was plotted in Origin, and the allometric model was used to calculate the index [22].

2.4. HDFn Culture and Ink Cytotoxicity

HDFn cells (C0045C, Gibco™, Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic. 5×10^3 cells were seeded per well in 96-well plates and allowed to attach overnight. Subsequently, ink droplets of 50 µm approximately were deposited in 1.5% w/v $CaCl_2$ solution for crosslinking for 10 min and then recovered with tweezers. Inks were plated onto HDFn monolayers for 1, 3, and 7 days. This procedure only applies to the cytotoxicity assays.

Cytotoxicity of the Inks was evaluated by the alamarBlue™ test, where viable cells can reduce Resazurin, the active ingredient of alamarBlue™, to resorufin, a highly red fluorescent compound [23]. The cell culture medium was replaced every 3 days. At each

time point, cell culture medium was removed, and 10 µL of alamarBlue™ (DAL1025, Gibco™, Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands) was added with 90 µL of cell culture medium in each well and incubated for 2 h. After incubation, scaffolds were removed from the wells, and the absorbance of the medium was measured at 570 nm. A monolayer without scaffolds served as a positive control. All experiments were performed in triplicate.

2.5. 3D Printing Process

The prepared inks were loaded onto a pre-heated 37 °C 3 mL cartridge (Cellink, Göteborg, Sweden). Cylindrical scaffolds of 15 mm in diameter with pores of 1.3 mm were printed using the Inkredible 3D Printer (Cellink, Göteborg, Sweden), with a 27-gauge tapered nozzle tip (0.2 mm) into 6-well cell culture plates, using a speed of 10 mm/s [6]. Once printed, each scaffold was crosslinked with 1.5% w/v calcium chloride solution ($CaCl_2$, Sigma, Madrid, Spain) (pH 7.3) for 5 min and then washed with PBS. The scaffolds were kept in a cell culture medium (DMEM + FBS 10% + 1% Antibiotic/antimycotic) and incubated at 37 °C, 5% CO_2. The medium was changed every 3 days until their use.

2.6. Characterization of the 3D Printed Scaffolds

2.6.1. Swelling Behavior

A gravimetry test was used to evaluate the swelling behavior of the printed scaffolds [24]. The printed scaffolds were placed and submerged in cell culture medium in a 6-well plate culture and incubated at 37 °C for 24 h. Each scaffold's initial dry weight (w_i) was measured, eliminating the excess of cell culture medium with a paper towel. The swollen weight (w_s) was measured at different times (1, 2, 4, 8, 19, and 24 h). The following equation was used to determine the swelling behavior:

$$\%S = \frac{(w_s - w_i)}{w_i} \times 100 \quad (1)$$

Equation (1). Determination of swelling behavior. Where w_i is the dry weight of each scaffold, and w_s is the swollen weight of each scaffold at different times.

2.6.2. Degradation Behavior

A gravimetry test evaluated the printed scaffolds' degradation behavior [25]. The initial dry weight (w_i) of printed scaffolds was measured (eliminating the excess of cell culture medium with a paper towel). Then scaffolds were placed and submerged in cell culture medium in 6-well plate cultures and incubated for 1, 2, 3, 7, 14, 21, and 30 days at 37 °C. At each time point, the degradation percentage was evaluated by measuring the weight of each scaffold after incubation. The following equation was used:

$$\%D = \frac{w_i - w_t}{w_i} \times 100 \quad (2)$$

Equation (2). Determination of degradation percentage. w_i is the printed scaffolds' initial dry weight, and w_t is the weight after the indicated incubation time.

2.7. 3D Bioprinting Protocol

Neonatal Human Dermal Fibroblasts (HDFn) were obtained from Gibco™ (C0045C, Gibco™, Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands). The cells were cultured in cell culture medium (DMEM low-glucose supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic, Gibco™, Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands) under 5% CO_2 and 37 °C. When the cells reached 90% confluence, they were detached with 0.25% trypsin/EDTA (Gibco™, Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands). 1×10^6 cells were mixed with 1 mL bioink, which was previously heated to 37 °C with a spatula. All procedures were performed under sterile conditions within a laminar flow hood (Purifier Logic+ Class II, Labconco, Kansas City, MI, USA). A cell-laden bioink solution was added to a 3 mL car-

tridge for printing, and cylindrical scaffolds of 15 mm in diameter and 1.3 mm pores were obtained using the Inkredible 3D Printer (Cellink, Göteborg, Sweden), as previously described. Scaffolds were crosslinked with calcium chloride (1.5% w/v) for 10 min and then placed in 6-well plates with cell culture medium and incubated at 37 °C and 5% CO_2 until their evaluation.

2.8. Calculation of Shear Stress During Bioprinting

The shear stress experienced by the cells as they passed through the cartridge and printhead tip was calculated as previously reported [6,26]. First, the flow rate (Q) into the cartridge or printhead tip was determined using the following equation:

$$Q = \pi R^2 V \tag{3}$$

where R is the radius (cartridge or printhead tip), and V is the flow velocity (defined in the 3D printer protocol). Then, the stress distribution ($\dot{\gamma}^n$) due to deformation along the cartridge or printhead tip was defined with the following equation:

$$\dot{\gamma}^n = \left(\frac{VR^2}{\left(\frac{n}{3n+1}\right)\left(R\,\frac{3n+1}{n}\right)} \right)^n r \tag{4}$$

where R is the maximum radius (cartridge or printhead tip), V is the flow velocity (defined in the 3D printer protocol), r is the minimum radius, and n is the power law index. With the flow rate (Q) and the stress distribution ($\dot{\gamma}^n$) values in the cartridge or printhead tip, the shear stress (τ) was calculated in the cartridge or the printhead tip using the following equation as reported before [6]:

$$\tau = K\left(\dot{\gamma}\right)^n \tag{5}$$

where τ is the shear stress, K is the flow consistency index, and n is the power law index.

2.9. Cell Viability in the Bioprinted Scaffolds

Cell viability was assessed in bioprinted scaffolds. Briefly, scaffolds were incubated for 24 h and 7 days, replacing the cell culture medium every other day. To determine viable and non-viable cells, scaffolds were treated with the Live/Dead kit (L33224, Invitrogen, Bleiswijk, The Netherlands) containing calcein AM and ethidium homodimer-1 for 30 min. Subsequently, bioprinted scaffolds were observed under an inverted fluorescent microscope (TCS SP5, Leica, Wetzlar, Alemania), where live cells stained green and dead cells red. Representative images were captured and analyzed using ImageJ2 v. 2.14.0. The cell viability was calculated with the following equation:

$$\%Cell\ viability = \frac{Live\ cells\ (green)}{Dead\ cells\ (red) + Live\ cells\ (green)} \times 100 \tag{6}$$

Equation (3). Determination of cell viability of bioprinted scaffolds.

2.10. Statistical Analysis

GraphPad Prism v10 software was used for the data analysis. Descriptive statistics, including mean and standard deviation, were calculated. The Shapiro–Wilk test was applied to assess the data distribution for normality. For parametric data, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was employed, and for non-parametric data, the Kruskal–Wallis test and Dunn's multiple comparisons test were used.

3. Results

3.1. Ink Characterization

Four inks with the compositions described in Table 1 were prepared. Their color and characteristics can be appreciated in Figure 1. Macroscopically, the ink composed of ALG 5% and Gel 5% was observed with a red color (Figure 1A) compared to the pink color in the inks containing hydroxyapatite (Figure 1B–D).

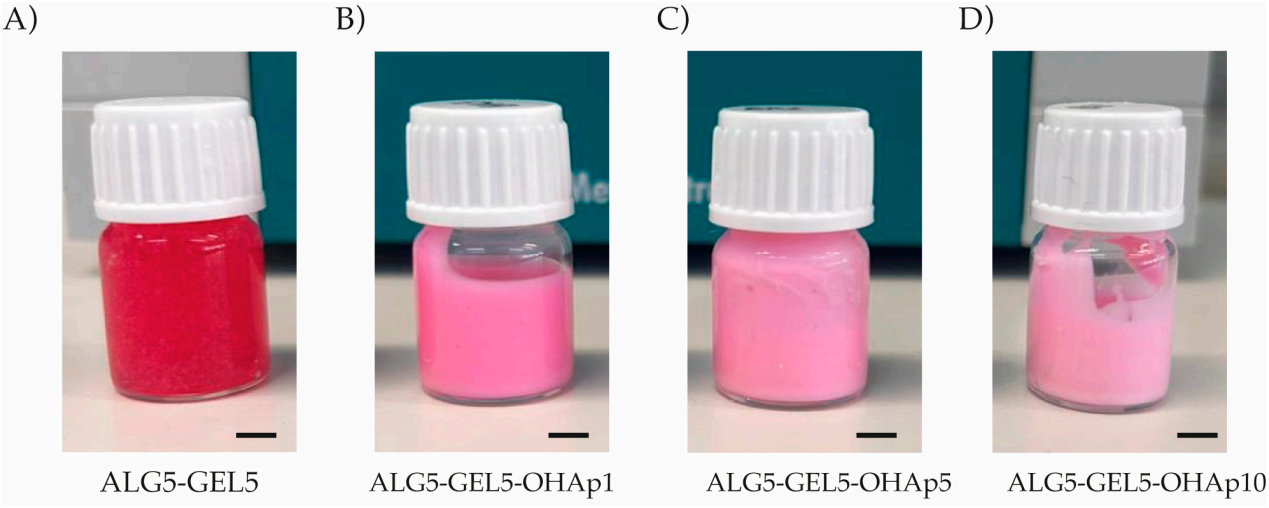


Figure 1. Synthetized inks with varying compositions. (**A**) 5% alginate and 5% gelatin (ALG5-GEL5); (**B**) 5% alginate, 5% gelatin, and hydroxyapatite at 1% (ALG5-GEL5-OHAp1); (**C**) 5% alginate, 5% gelatin, and hydroxyapatite at 5% (ALG5-GEL5-OHAp5); (**D**) 5% alginate, 5% gelatin, and hydroxyapatite at 10% (ALG5-GEL5-OHAp10). The abbreviations used are as follows: ALG for alginate, GEL for gelatin, and OHAp for hydroxyapatite. Each image includes a 1 cm scale bar to facilitate size reference.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) identified functional groups within the inks. In Figure 2, spectra of OHAp, GEL, ALG, and the four prepared inks are depicted with a crosslinked ink. OHAp spectrum (Figure 2A) displayed peaks at 1087, 1072, 1052, and 1032 cm^{-1} corresponding to $u_3(PO_4)$. Also, peaks at 961 cm^{-1} and 874 cm^{-1} corresponded to $u_1(PO_4)$, all characteristics of phosphate in an apatitic environment. GEL displayed characteristic peaks at 3329 cm^{-1} (broad) for the u (stretching vibrations) NH and OH, 1621 cm^{-1} $u_{C=O}$, and 1242 cm^{-1} u_{C-N} from amide I, II, and III respectively; additionally, vibration stretching of the C-N bonds and the vibration of bending N-H bonds can also be observed, indicating the presence of the amide III [27]. Sodium alginate spectrum mean peaks were observed at 3390 cm^{-1} OH, 1621 cm^{-1} u_{asym} (COO), 1422 cm^{-1} u_{sym} (COO), 1050 cm^{-1} u (CC + uCO) (Figure 2C) [28]. The ALG5-GEL5 ink presented peaks at 3329 cm^{-1} and 1621 cm^{-1}; hydroxyapatite functional groups were absent (Figure 2D). Following this, the inks composed of ALG5-GEL5-OHAp1, ALG5-GEL5-OHAp5, and ALG-GEL5-OHAp10 displayed the same groups as before, but additionally, with hydroxyapatite peaks, such as 1052 cm^{-1} $u_3(PO_4)$ (Figure 2E–G). In summary, all the inks exhibited common groups found in gelatin and alginate. However, they varied in the presence and strength of the hydroxyapatite bands. Figure 2H displays the spectrum of a crosslinked ink and reveals the shift of the symmetric stretch vibration uCOO- associated with carboxylic acid salts from 1412–1413 cm^{-1} before crosslinking to 1417–1420 cm^{-1} after cross-linking. This shift can be attributed to the ionic binding [7], showing that the presence of the gelatin and hydroxyapatite does not inhibit the ionic gelation of the alginate.

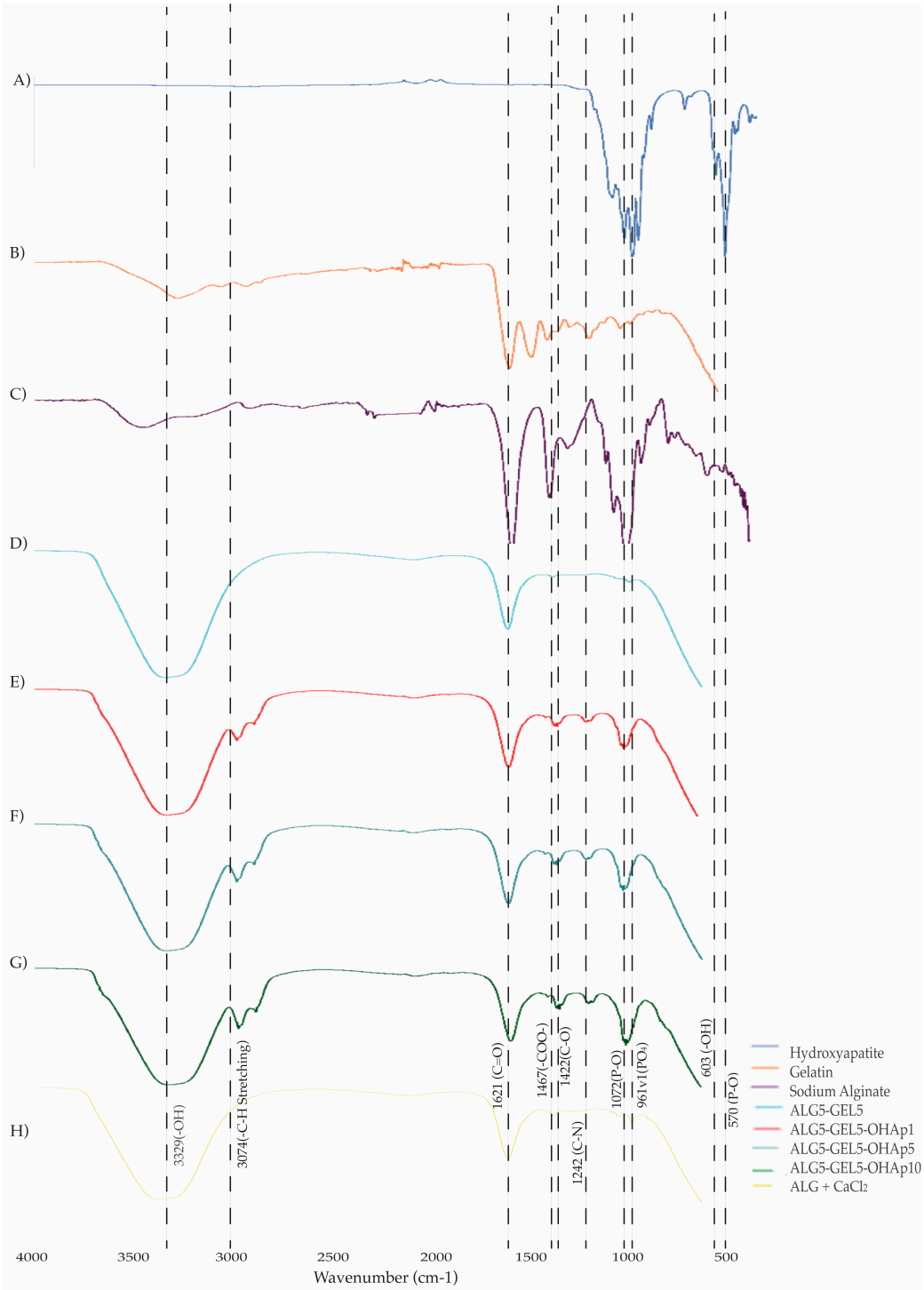


Figure 2. Functional groups detected in biomaterial-inks by FT-IR analysis. (**A**) Hydroxyapatite powder; (**B**) Gelatin powder; (**C**) Sodium Alginate powder; (**D**) ALG5-GEL5 (alginate 5%–gelatin 5% without hydroxyapatite); (**E**–**G**) bioinks with increasing concentrations of hydroxyapatite at 1, 5 and 10%: ALG5-GEL5-OHAp1, ALG5-GEL5-OHAp5, and ALG5-GEL5-OHAp10, respectively, and (**H**) ALG5 crosslinked with $CaCl_2$. Abbreviations: ALG, alginate; GEL, gelatin; OHAp, hydroxyapatite; $CaCl_2$, calcium chloride.

3.2. Ink Rheological Behavior

All inks displayed shear thinning (pseudoplastic) behavior from a shear rate as low as 0.2 s^{-1} (Figure 3A). The OHAp incorporation into the inks significantly increased ($p < 0.0001$) its viscosity values (Figure 3A), with an over 10-fold increase for ALG5-GEL5-OHAp10 at the lower

shear rates assayed, compared with ALG5-GEL5 (Figure 3A). None of the inks demonstrated a yield stress point or a dramatic decrease in the viscosity value as the shear stress increased (Figure 3A). For all inks, viscosity decreased as the shear rate increased, with an n index < 1 (Table 1), corresponding to a pseudoplastic behavior. Moreover, the consistency index k was calculated, reflecting the fluid's initial resistance to flow [22]. The k index significantly increased with OHAp concentration ($p < 0.0001$ Table 1, Figure S1) compared with the OHAp-free ink.

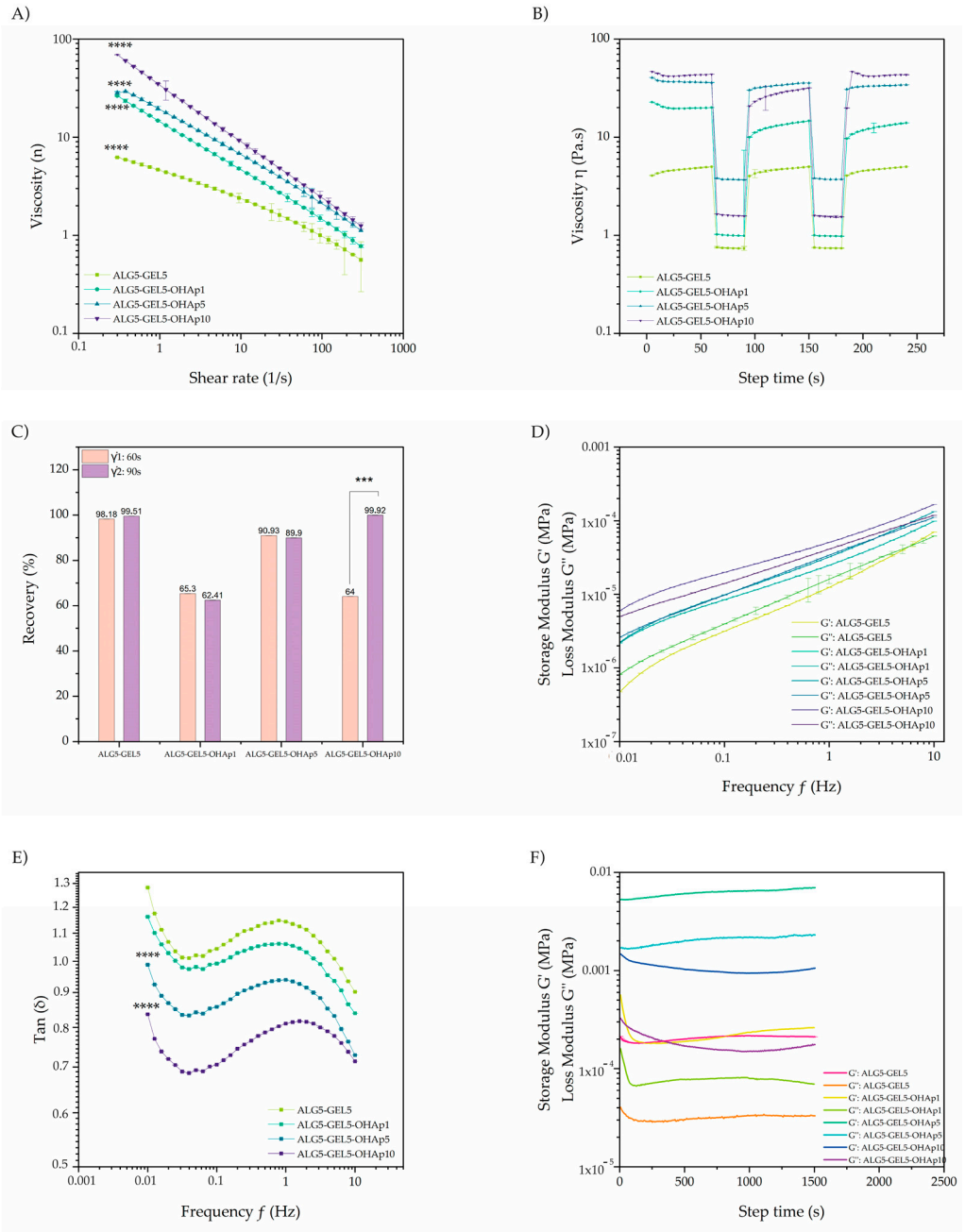


Figure 3. Rheological analysis of the prepared bioinks demonstrating their mechanical behavior and gelation properties. (**A**) Shear stress ramp illustrating the pseudoplastic behavior and flow properties of each bioink composition. (**B**) Shear stress recovery test showing the ability of the bioinks to recover viscosity after shear stress is removed, critical for printability. (**C**) Quantification of the recovery percentage after stress, indicating the structural resilience of each bioink. (**D**) Frequency sweep analysis displaying the storage modulus (G′) and loss modulus (G″) across a range of frequencies,

providing insights into the viscoelastic properties of the bioinks. (**E**) Tan δ (loss factor) to assess the balance between elastic and viscous behavior in the bioinks. (**F**) Viscoelastic behavior (G′ and G″) after crosslinking with 1.5% $CaCl_2$ for all inks. Abbreviations: ALG, alginate; GEL, gelatin; OHAp, hydroxyapatite; G′, storage modulus; G″, loss modulus. Statistical significance is indicated as *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Likewise, higher OHAp concentrations influenced the recovery percentage of the original viscoelastic properties in the inks. A recovery test was used to determine the capacity of the inks to recover from the stress induced during the printing process after 60 and 90 s. ALG5-GEL5, ALG5-GEL5OHAp1, and ALG5-GEL5OHAp5 showed a similar recovery at both evaluated times (Figure 3B,C). However, the ALG5-GEL5-OHAp10 ink evidenced a significant increase in the recovery percentage after 90 **s** compared to the recovery after 60 s ($p < 0.0001$, Figure 3B,C). OHAp also changed the solid-like behavior in the inks assessed. A frequency sweep test evaluated the behavior as liquid or solid under different deformation frequencies in all inks. A solid-like behavior is characterized by the dominance of the storage modulus (G′) over the loss modulus (G″), reflected in Tan δ (G″/G′) values < 1.

In contrast, a liquid-like behavior presents dominance of the loss modulus (G″) over the storage modulus (G′), showing Tan δ (G″/G′) values > 1. ALG5-GEL5 ink showed Tan δ values greater than 1 while the inks containing OHAp significantly decreased the Tan δ values ($p < 0.0001$, ALG5-GEL5-OHAp5, ALG5-GEL5-OHAp10) showing values lower than 1 (Figure 3D,E). The gelation process was measured at 37 °C using calcium chloride to assess the crosslinking behavior of the inks. In all tested inks, the storage modulus (G′) consistently surpassed the loss modulus (G″), particularly when crosslinked with calcium chloride. This indicates a significant enhancement in the material's stiffness and structural integrity. Notably, inks containing OHAp demonstrated a pronounced dominance of the storage modulus. The introduction of calcium chloride increased the storage modulus, reflecting enhanced crosslinking within the material. Furthermore, inks with higher OHAp concentrations exhibited an even more significant increase in their elastic modulus, suggesting that the presence and concentration of OHAp play a crucial role in reinforcing the mechanical properties of the ink (Figure 3F) The introduction of calcium chloride increased the storage modulus, reflecting enhanced crosslinking within the material. Furthermore, inks with higher OHAp concentrations exhibited an even more significant increase in their elastic modulus, suggesting that the presence and concentration of OHAp play a crucial role in reinforcing the mechanical properties of the ink (Figure 3F).

3.3. 3D Printed Scaffold Swelling and Degradation Behavior

The printed scaffolds' swelling and degradation assay results are displayed in Figure 4A–D. All scaffolds showed significant swelling at 24 h ($p < 0.0001$). The highest swelling percentage was presented by the ALG5-GEL5 ink (117.41%, $p < 0.0001$), followed by ALG5-GEL5-OHAp1 (108.55%, $p < 0.0001$), ALG5-GEL5-OHAp5 (100.58%, $p < 0.0001$), and ALG5-GEL5-OHAp10 (98.70%, $p = 0.0001$). These results suggest that the increase in the inorganic phase (addition of hydroxyapatite) reduces the swelling capacity of the printed scaffolds.

Thereafter, it was observed that all the scaffolds began their degradation after 3 days of soaking (Figure 4F). The composition with the higher degradation percentage was ALG5-GEL5 (42%, $p < 0.0001$), followed by ALG5-GEL5-OHAp1 (23.67%, $p < 0.0001$), ALG5-GEL5-OHAp5 (19.67%, $p < 0.0001$), and ALG5-GEL5-OHAp10 (16.67%, $p < 0.0001$). These results also suggest that the increase in the inorganic phase reduced the degradation rate of the printed scaffolds.

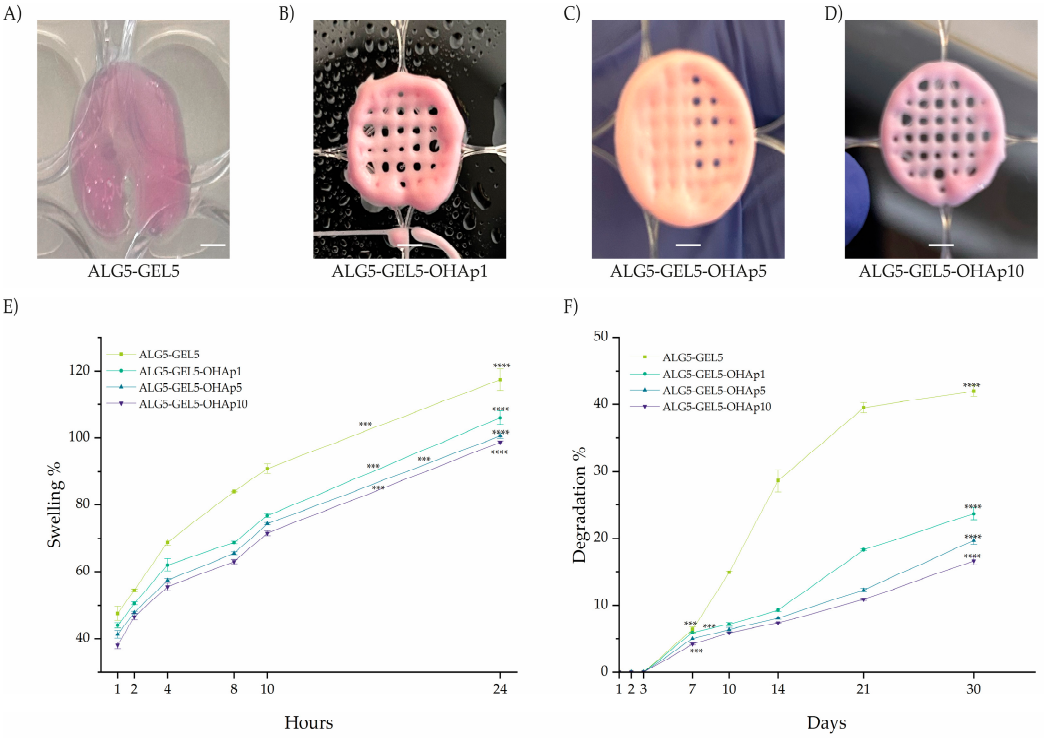
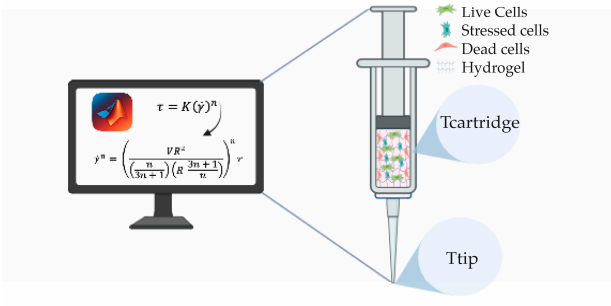


Figure 4. Swelling and degradation profiles of the printed scaffolds with varying hydroxyapatite (OHAp) content demonstrate the impact of OHAp on scaffold stability and water absorption capacity. (**A**–**D**) Visual representations of the different scaffold compositions: (**A**) ALG5-GEL5, (**B**) ALG5-GEL5-OHAp1, (**C**) ALG5-GEL5-OHAp5, and (**D**) ALG5-GEL5-OHAp10, highlighting structural differences and surface integrity. (**E**) Quantification of swelling percentage, showing the extent of water absorption in each scaffold composition, indicative of their hydrogel characteristics and capacity to retain moisture. (**F**) Quantification of degradation percentage over time, revealing the stability of each scaffold formulation and its suitability for long-term applications. Abbreviations: ALG, alginate; GEL, gelatin; OHAp, hydroxyapatite. Statistical significance is denoted by *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

3.4. Shear Stress During the Bioprinting Process

The flow rate, pressure, and shear stress experienced by the cells as they passed through the cartridge and tip of the printer can significantly affect their survival and functionality [29,30]. This study analyzed these parameters to optimize the bioprinting process for specific bioinks. Results obtained following the calculations made with Equations (5) to (7) are displayed in Figure 5.

A)



B)

Biomaterial-ink	Tips	Pressure (kPa)	Cartridge Pressure (Pa)	Tip Pressure (Pa)
ALG5-GEL5	25 G - 250 μm Red	60	0.4659	1.2253
ALG5-GEL5-OHAp1	27 G - 200 μm White	70	0.85891 ***	1.3272
ALG5-GEL5-OHAp5	27 G - 200 μm White	80	0.9008 ***	1.3764
ALG5-GEL5-OHAp10	27 G - 200 μm White	90	1.03127 ****	1.5634 **

Figure 5. Pressure Analysis at Nozzle Tip and Syringe During Extrusion. (**A**) Simulated pressure distribution within the cartridge and at the nozzle tip, calculated using MATLAB, highlighting the

mechanical forces experienced by cells during extrusion. (**B**) Comparison of extrusion pressures at the nozzle tip and syringe for different bioink formulations: ALG5-GEL5, ALG5-GEL5-OHAp1, ALG5-GEL5-OHAp5, and ALG5-GEL5-OHAp10. Statistical significance levels are marked as follows: ** $p = 0.025$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

As OHAp concentration increased, so did the extrusion pressure. This can be attributed to the material's higher viscosity, which results from the presence of the OHAp component. Incorporating OHAp significantly elevated the extrusion pressure within the printing cartridge compared to OHAp-free (ALG5-GEL5) bioinks, for all OHAp-containing bioinks. However, there were no significant pressure changes at the tip for bioinks containing 1 and 5% of OHAP (ALG5-GEL5-OHAp1 and ALG5-GEL5-OHAp5). A slight but significant increase in pressure was observed for the bioink with the highest OHAp concentration (ALG5-GEL5-OHAp10, $p = 0.033$).

3.5. Ink Cytotoxicity

The cytotoxicity of the scaffold compositions was evaluated with HDFn using the alamarBlue reagent. On day 1, the cells were viable in all the evaluated compositions and revealed significantly higher viability in comparison to the control ($p < 0.0001$); however, there were significant differences (Figure 6A). On day 3 and day 7, significant differences were observed among the different compositions, demonstrating that an increase in the inorganic phase yielded more viable cells: ALG5-GEL5-OHAp10 (120.3%, and 128%, $p < 0.0001$), ALG5-GEL5-OHAp5 (111.7%, and 120%, $p < 0.0001$), and ALG5-GEL5-OHAp1 (99.08, and 113.7%, $p = 0.0028$), in comparison to the composition without hydroxyapatite ALG5-GEL5 (94.78, and 108.9, $p = 0.002$) and control (100%, $p < 0.0001$). These results show that all evaluated compositions were not cytotoxic, and increasing the amount of the inorganic phase resulted in greater viability (Figure 6B,C).

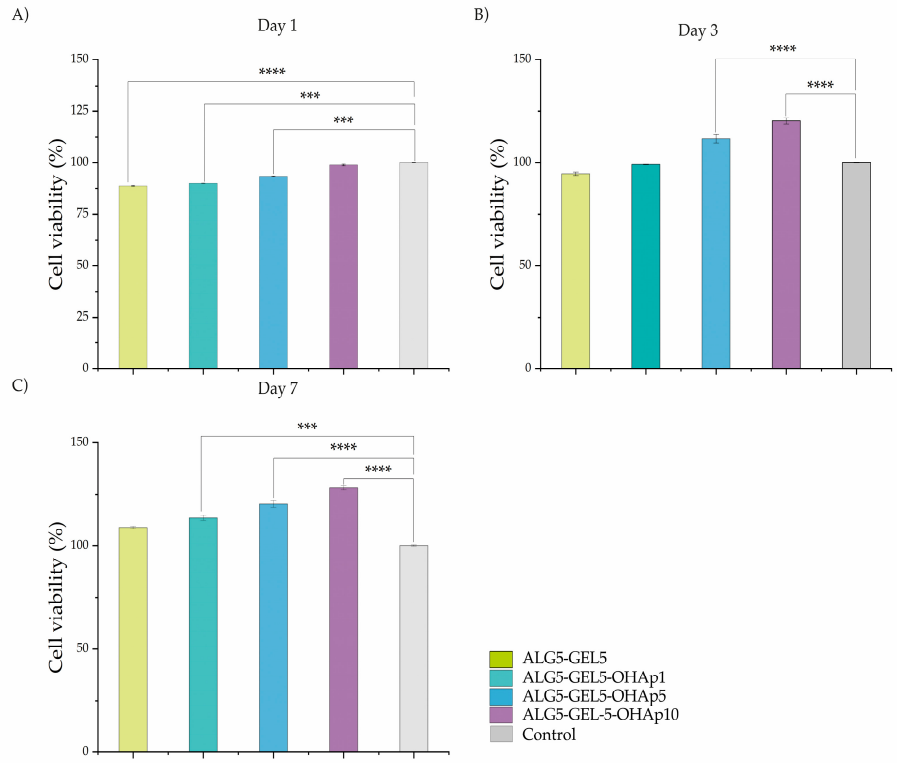


Figure 6. Quantitative Analysis of Cell Viability with Alamar Blue Assay. No cytotoxicity was observed for any evaluated bioink in HDFn cells across different time points. Cell viability is shown for each formulation at (**A**) 1 day, (**B**) 3 days, and (**C**) 7 days. Abbreviations: ALG, Alginate; GEL, Gelatin; HA, Hydroxyapatite. Statistical significance levels are indicated as *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

3.6. HDFn Viability in 3D Bioprinted Constructs

Cell viability in the bioprinted scaffolds with HDFn was evaluated using the LIVE/DEAD assay after 24 h and 7 days. Representative images showed that all printed scaffolds (ALG5-GEL5-OHAp1, ALG5-GEL5-OHAp5, and ALG5-GEL5-OHAp10) exhibited greater viability than 80% (Figure 7A–F). The scaffold with 10% OHAp showed the highest viability—90% at 24 h ($p < 0.0001$, Figure 7G) and 92% at 7 days ($p < 0.001$, Figure 7H). The presence of OHAp did not negatively affect cell viability, suggesting that the modified extrusion conditions are compatible with maintaining cell viability during bioprinting.

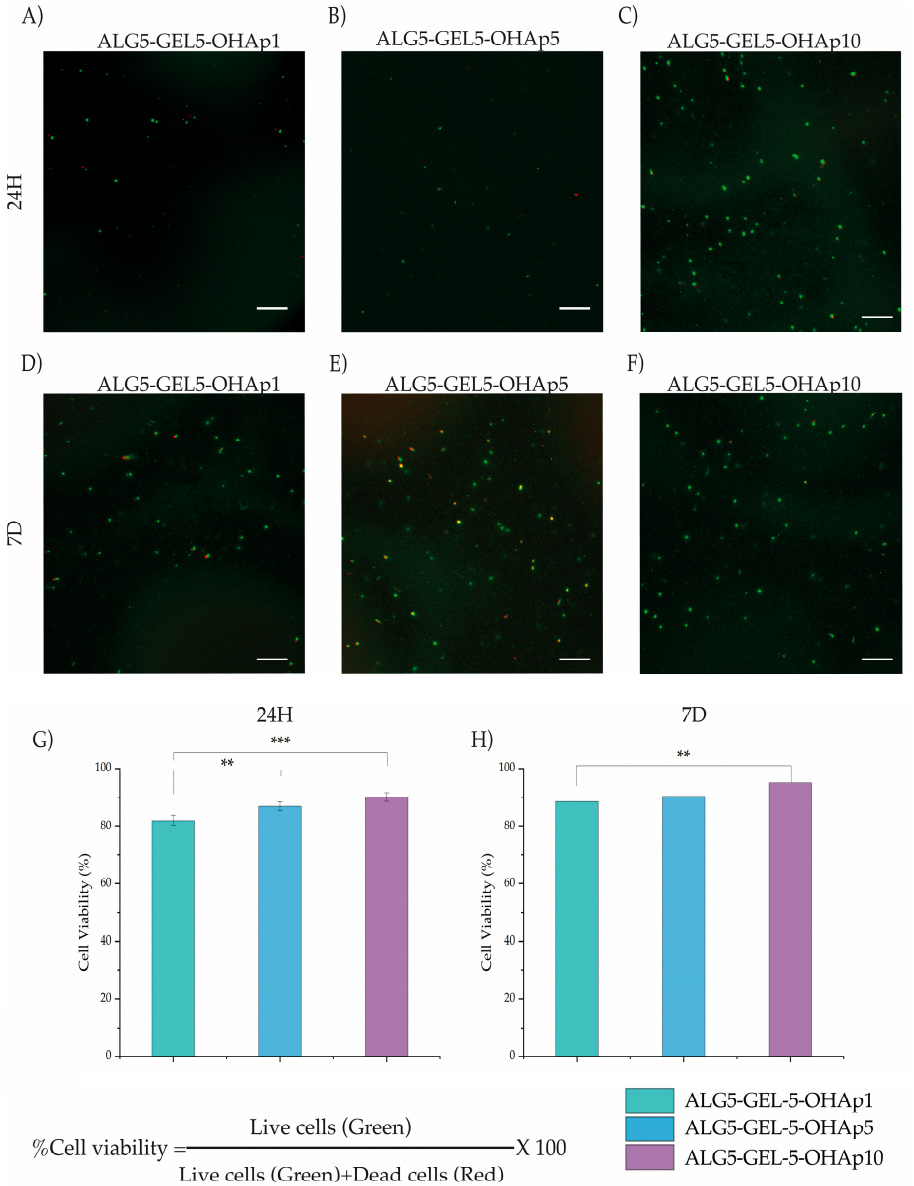


Figure 7. Representative Live/Dead Assay Images and Cell Viability Quantification. Images show HDFn cells in bioink formulations after (**A**,**D**) 24 h and (**B**,**E**) 7 days of bioprinting, with compositions as follows: (**A**,**D**) ALG5-GEL5-OHAp1, (**B**,**E**) ALG5-GEL5-OHAp5, and (**C**,**F**) ALG5-GEL5-OHAp10. Quantitative analysis of cell viability is displayed in (**G**) for 24 h and (**H**) for 7 days post-bioprinting. Abbreviations: ALG (Alginate), GEL (Gelatin), OHAp (Hydroxyapatite). Statistical significance is indicated by ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

4. Discussion

Developing new bioinks, particularly those incorporating hydroxyapatite, gelatin, and alginate, represents a significant advancement in 3D bioprinting. Hydroxyapatite improves bioactivity and osteoconductivity, making it ideal for bone tissue engineering [31]. Gelatin, derived from collagen, provides a cell-friendly environment due to its biocompatibility and ability to promote cell adhesion [32]. Alginate, a naturally occurring polysaccharide, enhances the bioink's printability by contributing viscosity and gelling properties, which are essential for maintaining structural integrity during printing, with ionic cross-linking using calcium ions being preferred for its mild conditions and simplicity [4,33].

The spectrum of the gelled ink displayed in Figure 2 revealed two peaks appearing at 1426 and 1415 cm^{-1} and a peak at 1025 cm^{-1} with a shoulder at 1071 cm^{-1}. The first two peaks are proposed to be the asymmetric and symmetric stretch vibration of –COO associated with carboxylic acid salts [4] and are specific to ionic binding [34], thus demonstrating that the presence of gelatin and hydroxyapatite does not inhibit alginate's ionic gelation. Furthermore, incorporating hydroxyapatite and the expected improved biological response should also offer the possibility of modifying the scaffold's swelling capacity and modulation of degradation kinetics [29]. These findings are consistent with similar studies, such as Schütz et al., which demonstrated that alginate-based bioinks maintain structural integrity post-printing, confirming the role of ionic crosslinking in preserving scaffold shape and mechanical stability [35]. A unique finding in this research is that hydroxyapatite did not interfere with the ionic crosslinking of alginate, as confirmed by FTIR. This result aligns with studies like Benedini et al., which reported that hydroxyapatite does not hinder alginate's gelation capacity but enhances scaffold stability and bioactivity [36].

Our results show that the presence of calcium phosphate in the scaffolds reduces the swelling compared with ceramic-free compositions. Moreover, a significant increase in calcium phosphate results in better stability (lower degradation) in the long term, which is a required parameter for further long-term experiments and applications. This observation is consistent with previous studies, such as those by Schütz et al. [35], which showed that hydroxyapatite enhances scaffold stability by decreasing swelling and degradation rates. Furthermore, Benedini et al. [36] confirmed that ceramic additives like hydroxyapatite are essential for improving scaffold performance and long-term stability, thereby supporting practical tissue regeneration applications.

However, the presence of the inorganic component has also been shown to induce a change in the viscoelastic properties of the bioink. These values should favor not only the printability but also the ink's recovery of its viscosity. Nevertheless, all the OHAp-containing inks displayed an n Index between 0.47631–0.41841. In addition, according to the hydrogel behavior, the shear rate is as low as 0.2 s^{-1} [37]. The inclusion of hydroxyapatite in the ink composition extends the power law range. Thus, suggesting more favorable printability conditions for the hydroxyapatite-containing inks.

It has been proposed that in procedures involving the injection of living cells dispensed through syringes or catheters, the mechanical force exerted by the saline solutions used as dispersing fluid may alter the cellular membrane, compromising the cell's viability [38]. Despite this, cell viability remains unaffected, consistent with findings in other studies that show that short-term exposure to higher shear stress does not compromise cell integrity, as observed by Malekpour et al. and Liu et al. [30,39].

This parameter is not frequently studied for syringe-injected cells in bioprinting, and it should be mandatory to report on this data for all manuscripts on bioprinting. A conical tip has been preferred for this work. According to Lucas et al.'s calculations, the tip's shape reduces to 2 milliseconds of the stress exposure time [40]. However, it has also been described that short-term exposure to high stresses affects the proliferation potential of the cells that can survive the bioprinting process [26,41].

Reports from the literature enable us to deduce the effect stress has on cell viability and capacity for proliferation, differentiation, etc. It is cell line specific since very different values can be found for other cell lines. However, comparing literature values is often made complicated by

the specific bioprinting conditions. For instance, when using 0.41 mm conical nozzles like in our studies, viability rates of 90.5–94.5% have been reported for bioprinted fibroblasts, depending on the material components of the bioink [40]. In contrast, approximately 50% viability has been achieved for chondrocyte–alginate sulfate–nanocellulose bioinks, which have a composition and viscosity closer to our bioink [42]. In our proof-of-concept model, HDFn cell viability was maintained at greater than 70% 24 h after bioprinting, indicating that the shear stress is low enough for this cell line not to compromise its viability. This is consistent with findings from Gao et al. [43], who demonstrated that human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) maintained around 80% viability under similar extrusion-based bioprinting conditions. Both studies highlight that while some cell types, such as HDFn and HUVECs, can withstand the mechanical forces of bioprinting with minimal viability loss, the effects of shear stress remain cell-type specific.

Composites made of inorganic particles and hydrophilic polymers sometimes cannot support cell growth even though all the components are cytocompatible [44]. Cell response to scaffolds strongly depends on the material composition and the specific tested cell type. Our viability test made on the materials (Figures 6 and 7) indicates a significant increase in the viability of all the compositions incorporating calcium phosphate in comparison with the ceramic-free composition. Furthermore, a considerable increase in HDFn viability was observed after 7 days of incubation for the composition containing the more significant percentage of calcium phosphate. The viability of the HDFn on the bioprinted scaffolds after 7 days of incubation within the 3D scaffold reproduces significantly greater viability for the composition with the highest concentration of calcium phosphate. Thus, in our proof-of-concept model, inorganic-loaded 3D scaffolds supported HDFn proliferation, which is critical for generating implantable, laboratory bioprinted models. Concomitantly, the bioprinting process solves a significant restriction in using 3D scaffolds, as it distributes cells within the 3D structure to generate a 3D tissue.

OHAp is involved in protein adsorption, and this process causes cell transportation into the scaffold, which is positive because it may promote cell adhesion and proliferation on scaffold surfaces [45]. Similar results on mouse fibroblast cell viability after 48 h were found for alginate–OHAp aerogels, regardless of the OHAp concentration. In general, these viability results indicate that neither the scaffold composition nor the dual processing strategy compromised cell viability. The high cell viability observed after the tests confirmed the non-toxicity of the aerogel structures and correlates with scaffolds containing the same components. Indeed, the biocompatibility of the initial components of the scaffolds (alginate and OHAp) was already reported [46]. Overall, these are promising results since cytocompatibility, and a suitable microstructure (pore size and porosity) govern the properties of an ideal scaffold [45]. The presence of OHAp in the scaffolds did not influence MSCs attachment as previously observed for structures with similar composition [47,48]. Nevertheless, for higher OHAp concentrations (16 and 24 wt%), the attachment decreases at 6 and 13 days, probably due to the high superficial roughness and irregularity that generally favor cell attachment (OHAp concentration of 8 wt%) but at much higher levels, it could make it hard for MSCs to proliferate fully attached to the aerogel. Furthermore, alginate composites combined with Ca^{2+} cations enhanced fibroblasts migration like the herein observed, probably due to changes in the regulation of genes involved in the wound healing process carried out by fibroblasts. Finally, as chemotaxis is an inherent response for cells, it was hypothesized to be involved in the cell migration process since the higher concentration of biochemical factors secreted by injured tissues activate the surrounding cells and stimulate the migration of cells. This biological response could also play a significant role in the increase of the migration of fibroblasts in the presence of the alginate-based aerogels herein observed. This study revealed that calcium ions provided by OHAp significantly enhanced cellular growth and proliferation rates [49].

One frequently mentioned limitation of bioprinting is its inability to reproduce tissue mechanics [50]. However, the purpose of using 3D bioprinted scaffolds is not to produce the mechanical properties of the tissue targeted but to simulate the extracellular matrix,

providing an optimal environment that can be used by the cells to adhere, proliferate, migrate, and differentiate when MSC are used. Therefore, gelatin and calcium phosphates have been selected for this proof-of-concept work; as previously explained in the introduction, they combine the osteoconductive capacity of the hydroxyapatite with the elasticity of polysaccharides containing peptide sequences that could be recognized by cellular integrin. The results indicate that these bioinks support cell proliferation and can be used for functional tissue engineering. Human dermal fibroblasts (HDFn) were selected as a preliminary model to assess scaffold biocompatibility and structural integrity before introducing osteogenic cells [51]. As resilient and well-characterized cells, HDFn provides reliable data on cell–scaffold interactions and viability, which supports early extracellular matrix (ECM) formation and scaffold integration. Future studies will focus on osteogenic cells for targeted bone regeneration [52]. The bioinks were formulated with an optimized cell concentration (approximately 1×10^6 cells/mL) to reflect physiologically relevant densities, thereby aiding scaffold maturation and potential in vivo applications. Rheological tests were conducted on the ink without adding neonatal human dermal fibroblasts (HDFn) to establish a baseline viscosity and to ensure replicability across samples. While adding HDFn cells could impact viscosity and potentially influence extrusion pressure, previous studies have shown that a cellular load of 1×10^6, as selected in our experiments, has a negligible effect on the rheology of the inks, yielding statistically non-significant changes [53]. In contrast, the difference between conducting experiments with culture medium or water significantly affects these results.

Despite these promising findings, this study has limitations that should be considered. First, the research was limited to in vitro assessments, which may not accurately reflect in vivo interactions and environments. The shear stress evaluation on human dermal fibroblasts (HDFn) was restricted to specific formulations and extrusion conditions. Although this limitation affects the applicability of the results to other bioink compositions and printing parameters, it is also necessary. There are few reports on the relationship between cell-supplied and nozzle pressures, which depend on the viscoelastic properties of the bioink. Additionally, each cell line may yield different results, necessitating case-by-case studies to build the literature. While viability assays showed positive outcomes for HDFn, long-term studies on cell behavior beyond 7 days, including proliferation and matrix deposition, were not conducted.

Future research should address these limitations by incorporating in vivo models, exploring a broader range of bioink formulations that include cells during rheology testing and extended evaluation periods.

5. Conclusions

Incorporating calcium phosphate particles up to 10% does not inhibit the ionic crosslinking of alginate in 50/50 ALG-GEL inks. In addition, incorporating calcium phosphate particles extends the range of printability of these bioinks, induces a speedier recovery of the viscoelastic properties to the static state, and yields greater elastic modulus for the bioprinted scaffold. The pressure does not compromise the viability of HDFn experienced at the tip (up to 1.5436 Pa) during bioprinting using HDFn-ALG5-GEL5-OHAp10 bioinks, demonstrating that these bioinks support cell proliferation.

These findings highlight the clinical applicability of the developed bioinks in regenerative medicine, particularly for creating scaffolds that can facilitate tissue repair and regeneration. The scaffolds' favorable mechanical properties and biocompatibility suggest their potential use in bone tissue engineering, where the integration of osteoconductive materials is crucial.

Looking forward, future perspectives should include comprehensive in vivo studies to assess the long-term behavior of these bioprinted scaffolds, including their biodegradability, mechanical stability, and integration with host tissues. Such studies will be essential for determining the clinical effectiveness of these scaffolds in real-world applications.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym16223224/s1, Figure S1: Shear stress (Pa) vs. Shear rate (1/s) plot. Characterized shear-thinning behavior and determined viscosity parameters for all inks. (A) ALG5-GEL5; (B) ALG5-GEL5-OHAp1; (C) ALG5-GEL5-OHAp5; (D) ALG5-GEL5-OHAp10. ALG: Alginate, GEL: Gelatin, OHAp: Hydroxyapatite.; Figure S2: Determination of the pressure at the tip and the cartridge in bioinks. (A,B) ALG5-GEL5; (C,D) ALG5-GEL5-OHAp1; (E,F) ALG5-GEL5-OHAp5; (G,H) ALG5-GEL5-OHAp10. ALG: Alginate, GEL: Gelatin, OHAp: Hydroxyapatite.

Author Contributions: Conceptualization, L.M.A.-S. and L.M.R.-L.; methodology, L.M.A.-S., D.A.G.-R. and L.M.R.-L.; formal analysis, L.M.A.-S. and L.M.R.-L.; investigation, L.M.A.-S., D.A.G.-R. and L.M.R.-L.; resources, L.M.R.-L.; writing—original draft preparation, L.M.A.-S., D.A.G.-R., N.S.R., C.M.-C. and L.M.R.-L.; writing—review and editing, L.M.A.-S., D.A.G.-R., N.S.R., C.M.-C. and L.M.R.-L.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER. Una manera de hacer Europa, grant number PID2021-128985OB-I00, and Pontificia Universidad Javeriana under the project entitled "Design and characterization of a bioprintable scaffold for bone tissue regeneration", grant number ID20551.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors thank Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) and the Vicerrectoría de Investigaciones of the Pontificia Universidad Javeriana for their support. Additionally, María Lucía Gutiérrez Gómez for English editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sun, W.; Starly, B.; Daly, A.C.; Burdick, J.A.; Groll, J.; Skeldon, G.; Shu, W.; Sakai, Y.; Shinohara, M.; Nishikawa, M.; et al. The Bioprinting Roadmap. *Biofabrication* **2020**, *12*, 022002. [CrossRef] [PubMed]
2. Daly, A.C.; Prendergast, M.E.; Hughes, A.J.; Burdick, J.A. Bioprinting for the Biologist. *Cell* **2021**, *184*, 18–32. [CrossRef] [PubMed]
3. Tan, B.; Gan, S.; Wang, X.; Liu, W.; Li, X. Applications of 3D Bioprinting in Tissue Engineering: Advantages, Deficiencies, Improvements, and Future Perspectives. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9*, 5385–5413. [CrossRef]
4. Valot, L.; Martinez, J.; Mehdi, A.; Subra, G. Chemical Insights into Bioinks for 3D Printing. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 4049–4086. [CrossRef]
5. Xia, Z.; Jin, S.; Ye, K. Tissue and Organ 3D Bioprinting. *SLAS Technol.* **2018**, *23*, 301–314. [CrossRef]
6. Banda Sánchez, C.; Cubo Mateo, N.; Saldaña, L.; Valdivieso, A.; Earl, J.; González Gómez, I.; Rodríguez-Lorenzo, L.M. Selection and Optimization of a Bioink Based on PANC-1- Plasma/Alginate/Methylcellulose for Pancreatic Tumour Modelling. *Polymers* **2023**, *15*, 3196. [CrossRef]
7. Hernández-González, A.C.; Téllez-Jurado, L.; Rodríguez-Lorenzob, L.M. Synthesis of in-situ silica-alginate hybrid hydrogels by a sol-gel route. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *250*, 116877. [CrossRef] [PubMed]
8. Im, G.-I. Clinical Use of Stem Cells in Orthopaedics. *Eur. Cell Mater.* **2017**, *33*, 183–196. [CrossRef]
9. Mrksich, M. Using Self-Assembled Monolayers to Model the Extracellular Matrix. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 832–841. [CrossRef]
10. Pourchet, L.J.; Thepot, A.; Albouy, M.; Courtial, E.J.; Boher, A.; Blum, L.J.; Marquette, C.A. Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1601101. [CrossRef]
11. Chen, Y.; Feng, Y.; Deveaux, J.G.; Masoud, M.A.; Chandra, F.S.; Chen, H.; Zhang, D.; Feng, L. Biomineralization Forming Process and Bio-Inspired Nanomaterials for Biomedical Application: A Review. *Minerals* **2019**, *9*, 68. [CrossRef]
12. Ielo, I.; Calabrese, G.; De Luca, G.; Conoci, S. Recent Advances in Hydroxyapatite-Based Biocomposites for Bone Tissue Regeneration in Orthopedics. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9721. [CrossRef] [PubMed]
13. Mesdom, P.; Colle, R.; Lebigot, E.; Trabado, S.; Deflesselle, E.; Fève, B.; Becquemont, L.; Corruble, E.; Verstuyft, C. Human Dermal Fibroblast: A Promising Cellular Model to Study Biological Mechanisms of Major Depression and Antidepressant Drug Response. *Curr. Neuropharmacol.* **2019**, *18*, 301–318. [CrossRef] [PubMed]
14. Juhl, P.; Bondesen, S.; Hawkins, C.L.; Karsdal, M.A.; Bay-Jensen, A.C.; Davies, M.J.; Siebuhr, A.S. Dermal Fibroblasts Have Different Extracellular Matrix Profiles Induced by TGF-β, PDGF and IL-6 in a Model for Skin Fibrosis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17300. [CrossRef]
15. Allen, N.B.; Abar, B.; Johnson, L.; Burbano, J.; Danilkowicz, R.M.; Adams, S.B. 3D-Bioprinted GelMA-Gelatin-Hydroxyapatite Osteoblast-Laden Composite Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Bioprinting* **2022**, *26*, e00196. [CrossRef]

16. Iranmanesh, P.; Gowdini, M.; Khademi, A.; Dehghani, M.; Latifi, M.; Alsaadi, N.; Hemati, M.; Mohammadi, R.; Saber-Samandari, S.; Toghraie, D.; et al. Bioprinting of Three-Dimensional Scaffold Based on Alginate-Gelatin as Soft and Hard Tissue Regeneration. *J. Mater. Res. Technol.* **2021**, *14*, 2853–2864. [CrossRef]
17. Di Giuseppe, M.; Law, N.; Webb, B.; Macrae, R.A.; Liew, L.J.; Sercombe, T.B.; Dilley, R.J.; Doyle, B.J. Mechanical Behaviour of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2018**, *79*, 150–157. [CrossRef]
18. Fernández-Montes Moraleda, B.; Román, J.S.; Rodríguez-Lorenzo, L.M. Influence of Surface Features of Hydroxyapatite on the Adsorption of Proteins Relevant to Bone Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101A*, 2332–2339. [CrossRef]
19. Wattanaanek, N.; Suttapreyasri, S.; Samruajbenjakun, B. 3D Printing of Calcium Phosphate/Calcium Sulfate with Alginate/Cellulose-Based Scaffolds for Bone Regeneration: Multilayer Fabrication and Characterization. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 47. [CrossRef]
20. Nacu, I.; Bercea, M.; Niță, L.E.; Peptu, C.A.; Butnaru, M.; Vereștiuc, L. 3D Bioprinted Scaffolds Based on Functionalized Gelatin for Soft Tissue Engineering. *React. Funct. Polym.* **2023**, *190*, 105636. [CrossRef]
21. Paxton, N.; Smolan, W.; Böck, T.; Melchels, F.; Groll, J.; Jungst, T. Proposal to Assess Printability of Bioinks for Extrusion-Based Bioprinting and Evaluation of Rheological Properties Governing Bioprintability. *Biofabrication* **2017**, *9*, 044107. [CrossRef] [PubMed]
22. Sánchez-Sánchez, R.; Rodríguez-Rego, J.M.; Macías-García, A.; Mendoza-Cerezo, L.; Díaz-Parralejo, A. Relationship between Shear-Thinning Rheological Properties of Bioinks and Bioprinting Parameters. *Int. J. Bioprint.* **2023**, *9*, 422–431. [CrossRef]
23. Rampersad, S.N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* **2012**, *12*, 12347–12360. [CrossRef]
24. Deo, K.A.; Singh, K.A.; Peak, C.W.; Alge, D.L.; Gaharwar, A.K. Bioprinting 101: Design, Fabrication, and Evaluation of Cell-Laden 3D Bioprinted Scaffolds. *Tissue Eng. Part A* **2020**, *26*, 318–338. [CrossRef]
25. Tajvar, S.; Hadjizadeh, A.; Samandari, S.S. Scaffold Degradation in Bone Tissue Engineering: An Overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2023**, 180. [CrossRef]
26. Blaeser, A.; Duarte Campos, D.F.; Puster, U.; Richtering, W.; Stevens, M.M.; Fischer, H. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting Is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 326–333. [CrossRef] [PubMed]
27. Skopinska-Wisniewska, J.; Tuszynska, M.; Olewnik-Kruszkowska, E. Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials* **2021**, *14*, 396. [CrossRef] [PubMed]
28. Saarai, A.; Kasparkova, V.; Sedlacek, T.; Saha, P. On the Development and Characterisation of Crosslinked Sodium Alginate/Gelatine Hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *18*, 152–166. [CrossRef]
29. Rodriguez-Lorenzo, L.M.; Saldaña, L.; Benito-Garzón, L.; García-Carrodeguas, R.; de Aza, S.; Vilaboa, N.; Román, J.S. Feasibility of Ceramic-Polymer Composite Cryogels as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2012**, *6*, 421–433. [CrossRef]
30. Liu, C.; Qin, W.; Wang, Y.; Ma, J.; Liu, J.; Wu, S.; Zhao, H. 3D Printed Gelatin/Sodium Alginate Hydrogel Scaffolds Doped with Nano-Attapulgite for Bone Tissue Repair. *Int. J. Nanomed.* **2021**, *16*, 8417–8432. [CrossRef]
31. Wang, X.-F.; Lu, P.-J.; Song, Y.; Sun, Y.-C.; Wang, Y.-G.; Wang, Y. Nano Hydroxyapatite Particles Promote Osteogenesis in a Three-Dimensional Bio-Printing Construct Consisting of Alginate/Gelatin/HASCs. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 6832–6842. [CrossRef]
32. Lukin, I.; Erezuma, I.; Maeso, L.; Zarate, J.; Desimone, M.F.; Al-Tel, T.H.; Dolatshahi-Pirouz, A.; Orive, G. Progress in Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1177. [CrossRef]
33. Hernández-González, A.C.; Téllez-Jurado, L.; Rodríguez-Lorenzo, L.M. Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering, from Injectables to Bioprinting: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *229*, 115514. [CrossRef]
34. Wong, T.W.; Chan, L.W.; Kho, S.B.; Sia Heng, P.W. Design of Controlled-Release Solid Dosage Forms of Alginate and Chitosan Using Microwave. *J. Control. Release* **2002**, *84*, 99–114. [CrossRef] [PubMed]
35. Schütz, K.; Placht, A.-M.; Paul, B.; Brüggemeier, S.; Gelinsky, M.; Lode, A. Three-Dimensional Plotting of a Cell-Laden Alginate/Methylcellulose Blend: Towards Biofabrication of Tissue Engineering Constructs with Clinically Relevant Dimensions. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *11*, 1574–1587. [CrossRef] [PubMed]
36. Benedini, L.; Laiuppa, J.; Santillán, G.; Baldini, M.; Messina, P. Antibacterial Alginate/Nano-Hydroxyapatite Composites for Bone Tissue Engineering: Assessment of Their Bioactivity, Biocompatibility, and Antibacterial Activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *115*, 111101. [CrossRef]
37. Ali, I.; Shah, L.A. Rheological Investigation of the Viscoelastic Thixotropic Behavior of Synthesized Polyethylene Glycol-Modified Polyacrylamide Hydrogels Using Different Accelerators. *Polym. Bull.* **2021**, *78*, 1275–1291. [CrossRef]
38. Amer, M.H.; Rose, F.R.A.J.; White, L.J.; Shakesheff, K.M. A Detailed Assessment of Varying Ejection Rate on Delivery Efficiency of Mesenchymal Stem Cells Using Narrow-Bore Needles. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 366–378. [CrossRef]
39. Malekpour, A.; Chen, X. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 40. [CrossRef]
40. Lemarié, L.; Anandan, A.; Petiot, E.; Marquette, C.; Courtial, E.-J. Rheology, Simulation and Data Analysis toward Bioprinting Cell Viability Awareness. *Bioprinting* **2021**, *21*, e00119. [CrossRef]
41. Cidonio, G.; Glinka, M.; Dawson, J.I.; Oreffo, R.O.C. The Cell in the Ink: Improving Biofabrication by Printing Stem Cells for Skeletal Regenerative Medicine. *Biomaterials* **2019**, *209*, 10–24. [CrossRef] [PubMed]
42. Müller, M.; Öztürk, E.; Arlov, Ø.; Gatenholm, P.; Zenobi-Wong, M. Alginate Sulfate–Nanocellulose Bioinks for Cartilage Bioprinting Applications. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 210–223. [CrossRef] [PubMed]

43. Gao, Q.; He, Y.; Fu, J.; Liu, A.; Ma, L. Coaxial Nozzle-Assisted 3D Bioprinting with Built-in Microchannels for Nutrients Delivery. *Biomaterials* **2015**, *61*, 203–215. [CrossRef]
44. Rodríguez-Lorenzo, L.M.; García-Carrodeguas, R.; Rodríguez, M.A.; De Aza, S.; Jiménez, J.; López-Bravo, A.; Fernandez, M.; Román, J.S. Synthesis, Characterization, Bioactivity and Biocompatibility of Nanostructured Materials Based on the Wollastonite-poly(Ethylmethacrylate-*Co*-vinylpyrrolidone) System. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *88A*, 53–64. [CrossRef] [PubMed]
45. Iglesias-Mejuto, A.; García-González, C.A. 3D-Printed Alginate-Hydroxyapatite Aerogel Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *131*, 112525. [CrossRef]
46. Shaheen, T.I.; Montaser, A.S.; Li, S. Effect of Cellulose Nanocrystals on Scaffolds Comprising Chitosan, Alginate and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 814–821. [CrossRef]
47. Kamalaldin, N.A.; Yahya, B.H.; Nurazreena, A. Cell Evaluation on Alginate/Hydroxyapatite Block for Biomedical Application. *Procedia Chem.* **2016**, *19*, 297–303. [CrossRef]
48. Benning, L.; Gutzweiler, L.; Tröndle, K.; Riba, J.; Zengerle, R.; Koltay, P.; Zimmermann, S.; Stark, G.B.; Finkenzeller, G. Cytocompatibility Testing of Hydrogels toward Bioprinting of Mesenchymal Stem Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105*, 3231–3241. [CrossRef]
49. Ribeiro, N.; Sousa, A.; Cunha-Reis, C.; Oliveira, A.L.; Granja, P.L.; Monteiro, F.J.; Sousa, S.R. New Prospects in Skin Regeneration and Repair Using Nanophased Hydroxyapatite Embedded in Collagen Nanofibers. *Nanomedicine* **2021**, *33*, 102353. [CrossRef]
50. Felfel, R.M.; Gideon-Adeniyi, M.J.; Zakir Hossain, K.M.; Roberts, G.A.F.; Grant, D.M. Structural, Mechanical and Swelling Characteristics of 3D Scaffolds from Chitosan-Agarose Blends. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *204*, 59–67. [CrossRef]
51. Tai, C.; Xie, Z.; Li, Y.; Feng, Y.; Xie, Y.; Yang, H.; Wang, L.; Wang, B. Human Skin Dermis-Derived Fibroblasts Are a Kind of Functional Mesenchymal Stromal Cells: Judgements from Surface Markers, Biological Characteristics, to Therapeutic Efficacy. *Cell Biosci.* **2022**, *12*, 105. [CrossRef] [PubMed]
52. Albalawi, H.I.; Khan, Z.N.; Rawas, R.H.; Valle-Pérez, A.U.; Abdelrahman, S.; Hauser, C.A.E. 3D-Printed Disposable Nozzles for Cost-Efficient Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Mater. Sci. Addit. Manuf.* **2023**, *2*, 52. [CrossRef]
53. Maestro Paramio, L. Regulación de Las Interacciones Entre Células Que Participan En La Regeneración Ósea Por La Composición y Rigidez de Hidrogeles Naturales. Ph.D. Thesis, Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, Spain, 2024.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.