

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 594**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2011 PCT/EP2011/053331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO11107599**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2011 E 11707159 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2542659**

54 Título: **Puesto de bioimpresión, ensamblaje que comprende dicho puesto de bioimpresión y método de bioimpresión**

30 Prioridad:

**04.03.2010 EP 10305224**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.06.2018**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es:

**GUILLEMOT, FABIEN;  
CATROS, SYLVAIN;  
KERIQUEL, VIRGINIE y  
FRICAIN, JEAN-CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 671 594 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Puesto de bioimpresión, ensamblaje que comprende dicho puesto de bioimpresión y método de bioimpresión

5 La invención se refiere a un puesto de bioimpresión, a un ensamblaje que comprende dicho puesto de bioimpresión y a un método de bioimpresión.

En particular la invención se refiere a un puesto de bioimpresión (impresión biológica) que comprende:

10 - un dispositivo de bioimpresión adaptado para depositar un patrón de material biológico (incluyendo células, agregados celulares, biomateriales, nanopartículas, fármacos y otras moléculas que tienen un efecto biológico sobre células de un tejido, y otras), en una zona de interés de un sustrato, teniendo dicha zona de interés un elemento (rebaje, morfología específica, característica óptica, marca u otra) que distingue dicha zona de interés de la parte restante del sustrato, comprendiendo dicho dispositivo de bioimpresión:

15 al menos un dispensador de material biológico adaptado para dispensar el material biológico a depositar, y un sistema de colocación adaptado para recibir el sustrato y para colocar la zona de interés con respecto al dispensador,

20 - una unidad de control electrónico adaptada para dirigir el dispensador y el sistema de colocación uno respecto al otro de acuerdo con el patrón a depositar.

Aunque sin limitarse a ello, la invención tiene aplicaciones particularmente ventajosas en el tratamiento de la pérdida de arquitectura tisular (incluyendo múltiples tipos celulares y componentes de matriz organizados de forma precisa en tres dimensiones) causada, por ejemplo, por un traumatismo o una enfermedad y que da lugar a la pérdida de función tisular.

30 Se ha descubierto que dicha pérdida de arquitectura tisular podría tratarse mediante la generación de tejidos biológicos que implica el uso de métodos de genomanipulación y material para obtener la combinación apropiada de células y los factores bioquímicos y fisicoquímicos adecuados que imitan tanto el microentorno de las células como la microarquitectura del tejido en el organismo. En este contexto, se ha desarrollado la genomanipulación tisular que tiene como objetivo proporcionar sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función tisular o un órgano completo.

35 En primer lugar, se han sembrado células vivas en un esqueleto biocompatible y finalmente biodegradable y se han cultivado en un biorreactor para dar lugar a una población celular inicial que se expande en un tejido. Con un esqueleto apropiado que imite la matriz extracelular biológica, el tejido en desarrollo puede adoptar tanto la forma como la función del órgano deseado, y puede implantarse en el organismo del paciente.

40 En paralelo con el método mencionado anteriormente, se ha considerado la construcción de estructuras biológicas tridimensionales (3D) por la tecnología de bioimpresión ("Application of laser printing to mammalian cells", J.A. Barron, B.R. Ringeisen, H. Kim, B.J. Spargo, y D.B. Chrisey, Thin Solid Films, vol. 453-454, abril de 2004, 383-387; "Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer", V. Dinca, A. Ranella, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, M. Dinescu, A. Popescu, y C. Fotakis, Biomedical Microdevices, vol. 10, octubre de 2008, 719-25). La bioimpresión consiste en un depósito automatizado capa por capa asistido por ordenador, transferencia y formación de patrones de materiales biológicos que incluyen células y agregados celulares ("Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering", V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, y R.R. Markwald, Trends in Biotechnology, vol. 21, abril de 2003, 157-161; "Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm", V. Mironov, T. Trusk, V. Kasyanov, S. Little, R. Swaja, y R. Markwald, Biofabrication, vol. 1, 2009, pág. 022001; "Jet-based methods to print living cells", B.R. Ringeisen, C.M. Othon, J.A. Barron, D. Young, y B.J. Spargo, Biotechnology Journal, vol. 1, septiembre de 2006, 930-48). Recientemente, la definición de bioimpresión se amplió a "el uso de procesos de transferencia asistidos por ordenador para formación de patrones y ensamblaje de materiales vivos y no vivos con una organización 2D o 3D prescrita para producir estructuras biogenomanipuladas que sirven para medicina regenerativa, estudios farmacocinéticos y de biología celular básica" (F. Guillemot, V. Mironov, M. Nakamura, Biofabrication, vol. 2, 2010).

60 Para este fin, se han rediseñado las impresoras de chorro de tinta disponibles en el mercado ("Application of inkjet printing to tissue engineering", T. Boland, T. Xu, B. Damon, y X. Cui, Biotechnology Journal, vol. 1, 2006, 910-917) o se han construido nuevas ("Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells", Makoto Nakamura, Akiko Kobayashi, Fumio Takagi, Akihiko Watanabe, Yuko Hiruma, Katsuhiko Ohuchi, Yasuhiko Iwasaki, Mikio Horie, Ikuo Morita, Setsuo Takatani, Tissue Eng 2006; "Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing", Saunders RE, Gough JE, Derby B., Biomaterials 2008; 29: 193-203.) para formar patrones de ensamblajes biológicos de acuerdo con un molde de diseño asistido por ordenador. Las extrusoras mecánicas accionadas por presión tales como bioplóter también se han desarrollado para manipular células vivas y agregados celulares ("Tissue Engineering by Self-Assembly of Cells Printed into Topologically Defined Structures", K. Jakab, C. Norotte, B. Damon, F. Marga, A. Neagu, C.L. Besch-Williford, A. Kachurin, K.H.

Church, H. Park, V. Mironov, R. Markwald, G. Vunjak-Novakovic, y G. Forgacs, Tissue Engineering Parte A, vol. 14, 2008, 413-421).

5 Paralelo a estos métodos de bioimpresión, ha surgido la impresión asistida por láser como método alternativo para el ensamblaje y formación de micropatrones de materiales biológicos.

10 La escritura directa guiada por láser (LGDW) es una técnica que puede atrapar múltiples células en un rayo láser y depositarlas como una corriente constante sobre superficies no absorbentes arbitrarias ("Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering" Nahmias Y, Schwartz RE, Verfaillie CM, Odde DJ, Biotechnol Bioeng 2005; 92: 129-36; "Micropatterning of living cells by laserguided direct writing: application to fabrication of hepaticendothelial sinusoid-like structures", Yaakov Nahmias, David J. Odde, Nat Protoc 2006).

15 La bioimpresión asistida por láser (LAB) se basa en la técnica de transferencia directa inducida por láser (LIFT) en la que se usa un láser por impulsos para inducir la transferencia de material biológico de una cinta como depósito, formada de una capa de material biológico extendido sobre un soporte de cuarzo ópticamente transparente, hasta un sustrato en cercana proximidad a o en contacto con la cinta ("Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells", Ringeisen BR, Kim H, Barron JA, Krizman DB, Chrisey DB, Jackman S, Auyeung RYC, Spargo BJ, Tissue Eng 2004; 10: 483-91).

20 Los métodos de bioimpresión asistida por láser conocidos comprenden la escritura directa por evaporación láser por impulso asistida por matriz (MAPLE-DW) ("Application of laser printing to mammalian cells", Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB, Thin Solid Films 2004: 383-7), LIFT asistida por película absorbente (AFA-LIFT) ("Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer", Bela Hopp, Tomi Smausz, Norbert Kresz, Norbert Barna, Zsolt Bor, Lajos Kolozsvari, Douglas B. Chrisey, Andras Szabo, Antal Nogradi, Tissue Eng 2006) y bioimpresión asistida por láser (LAB) ("Laser-Assisted Bioprinting: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns", Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR, Biomed Microdev 2004; 6: 139-47; "Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress", Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR, Ann Biomed Eng 2005; 33: 121-30). Usando LAB, en condiciones de irradiación adecuadas, y para líquidos que presentan una amplia gama de reologías, el material puede depositarse en forma de  
30 gotas circulares bien definidas con un alto grado de resolución espacial.

35 La invención tiene como objetivo mejorar la precisión en la determinación del patrón de la bioimpresión para depositar un patrón de material biológico que coincida de forma precisa con la zona de interés en la que tiene que depositarse este patrón de material biológico.

Para este fin, la invención propone un puesto de bioimpresión del tipo mencionado anteriormente que comprende un sistema de imágenes adaptado para adquirir una imagen del sustrato y poner de manifiesto en la imagen adquirida el elemento de la zona de interés con respecto a la parte restante, procesándose la imagen adquirida del sustrato para detectar la zona revelada de interés sobre la imagen adquirida y para determinar el patrón correspondiente a la  
40 zona de interés detectada sobre la imagen adquirida.

Por tanto, el puesto de bioimpresión de acuerdo con la invención proporciona una adquisición directa automatizada de la zona de interés en la que tiene que depositarse el patrón y para determinar el patrón específico para la zona de interés mostrada en la imagen adquirida. El patrón depositado de material biológico, por lo tanto, puede coincidir de  
45 forma precisa con la zona de interés, mostrada, por ejemplo, por contraste con respecto a la parte restante del sustrato en la imagen adquirida del sustrato y detectada por un operario a través de la unidad de control o de forma automática por la unidad de control, y la precisión global de la bioimpresión puede mejorarse. La unidad de control electrónico está adaptada para procesar la imagen adquirida del sustrato para detectar de forma automática la zona revelada de interés sobre la imagen adquirida y para determinar de forma automática el patrón correspondiente a la  
50 zona de interés detectada en la zona adquirida.

La unidad de control electrónico puede adaptarse además para determinar una ubicación de la zona de interés en un tramo de referencia del puesto de bioimpresión y para dirigir el dispensador y el sistema de colocación uno respecto al otro de acuerdo con la ubicación determinada. Por lo tanto, puede proporcionarse una ubicación automatizada de  
55 la zona de interés.

Además, para mejorar la precisión, la unidad de control electrónico puede adaptarse para dirigir el sistema de imágenes de acuerdo con una trayectoria óptica correspondiente al patrón determinado a depositar. Al hacerlo, el sistema de imágenes puede seguir la distribución del material biológico.  
60

En una realización ventajosa particular, el puesto de bioimpresión implementa la bioimpresión asistida por láser.

A este respecto, el dispensador puede comprender:

- 65 - un dispositivo de alojamiento para alojar al menos una cinta que contiene el material biológico, estando provisto el dispositivo de alojamiento de al menos un espacio de trabajo abierto adaptado para recibir al menos una parte

de la cinta, estando adaptada la unidad de control electrónico para dirigir el dispositivo de alojamiento y el sistema de colocación uno respecto al otro de modo que el espacio de trabajo abierto esté enfocado al área de interés,

- un sistema de láser dispuesto para emitir un rayo láser adaptado para transferir el material biológico desde la cinta hasta el sustrato, estando adaptada la unidad de control electrónico para dirigir el sistema de láser para dirigir el rayo láser de acuerdo con el patrón determinado dentro del espacio de trabajo abierto.

En particular, el sistema de láser puede comprender un dispositivo de láser para emitir el rayo láser, tal como un láser de impulsos infrarrojos y un dispositivo de barrido óptico adaptado para orientar el rayo láser dentro del espacio de trabajo abierto.

Una cinta, que actúa como un depósito para el material biológico, entonces puede recibirse al menos parcialmente en el espacio de trabajo abierto del dispositivo de alojamiento, presentando la cinta una primera superficie que enfoca al rayo láser y una segunda superficie provista con una capa de material biológico, enfocando dicha segunda superficie al sistema de colocación. La cinta puede comprender un soporte transparente al rayo láser y recubierto con la capa de material biológico, y una capa de transducción intermedia dispuesta entre el soporte y la capa de material biológico.

Dicho puesto de bioimpresión asistida por láser está en consonancia con el desarrollo de intervenciones médicas asistidas por ordenador (CAMI), resultantes de la convergencia de los avances en medicina, física, materiales, electrónica, informática, robótica, etc. Las CAMI tienen como objetivo proporcionar herramientas que permitan al médico usar datos de múltiples modalidades de una manera racional y cuantitativa para planear, para simular y para ejecutar miniintervenciones médicas invasivas de forma precisa y segura. Las intervenciones médicas incluyen acciones tanto de diagnóstico como terapéuticas (cirugía, radioterapia, inyección local de fármacos, etc.). En este objetivo, la informática y la microtecnología han acompañado al desarrollo de la práctica clínica y allanado el camino para aplicaciones robóticas a la cabeza. De hecho, gracias a CAMI:

- (i) se manipulan cada vez más datos para cada paciente (por ejemplo, imágenes, señales) durante la preparación y/o las acciones médicas de control,
- (ii) se ha organizado la rastreabilidad y control de calidad, y
- (iii) los procedimientos de diagnóstico y tratamiento tienden a ser cada vez menos invasivos.

Además, la robótica médica se ha mejorado por el desarrollo de la automatización, que proporciona ayuda al médico cuando sus capacidades (o presencia) están limitadas. En medicina, como en muchos campos, las ventajas de los robots provienen de la precisión, la capacidad de repetir una tarea indefinidamente, la conexión potencial a datos informatizados y detectores, u otra capacidad de funcionar en entornos hostiles. Desde un punto de vista operativo, las capacidades potenciales de un robot específico son, por ejemplo:

- (i) lograr tareas geométricas complejas (por ejemplo, mecanizar una cavidad ósea 3D),
- (ii) disminuir la fuerza de forma controlable hasta escalas de fuerza muy pequeñas,
- (iii) ejecutar movimientos de alta precisión y de alta resolución (para microcirugía),
- (iv) rastrear órganos en movimiento y sincronizar con eventos externos basándose en algunas señales y, además
- (v) introducirse en el paciente para acciones intracorporales.

Realmente, el puesto de bioimpresión asistida por láser puede ser parte de un ensamblaje médico adaptado para realizar diferentes tareas con respecto a tratamientos de terapia y quirúrgicos. En particular, el propio dispositivo láser puede usarse para otras tareas diferentes a transferir el material biológico desde la cinta hasta el sustrato, tal como ablación, mecanizado, calentamiento, soldadura, etc.

Cuando se implementa en ingeniería tisular, el dispositivo de bioimpresión puede adaptarse para formar una estructura de tejido biológico mediante el depósito del patrón de material biológico, la zona de interés que tiene un relieve con respecto a la parte restante del sustrato como elemento, teniendo dicho relieve una geometría, estando adaptado el sistema de imágenes para revelar en la imagen adquirida el relieve, detectándose el propio relieve revelado en la imagen adquirida y determinándose el patrón correspondiente a la geometría del relieve detectado en la imagen adquirida, para formar la estructura de tejido biológico correspondiente al relieve.

La unidad de control electrónico puede adaptarse para detectar de forma automática el relieve revelado en la imagen adquirida y para determinar de forma automática el patrón correspondiente a la geometría del relieve detectado en la imagen adquirida.

Se ha descubierto que la invención es de interés particular en la aplicación de formación de estructura de tejido biológico, en depósito 2D o 3D hasta capa a capa de material biológico (incluyendo células y agregados celulares en dicha aplicación), en un rebaje del sustrato como zona de interés. En dicha aplicación, el sistema de imágenes está adaptado para medir una diferencia en la distancia entre el sustrato y el dispensador de material biológico, y para mostrar esta diferencia a través de un contraste correspondiente en la imagen del sustrato. La invención no está

limitada, sin embargo, a dicha aplicación y puede implementarse en otra aplicación, tal como el tratamiento de otra enfermedad y traumatismo. Por ejemplo, el puesto de bioimpresión podría implementarse para el depósito de fármacos u otras moléculas que tienen un efecto biológico sobre las células de un tejido como material biológico en células determinadas, tales como células de un tumor, que se pueden mostrar por contraste con la parte restante del sustrato. A este respecto las células pueden tener una disposición específica detectable por el sistema de imágenes o pueden marcarse por un marcador adecuado previamente adherido a las mismas, para presentar un elemento óptico que pueda revelarse por un ajuste apropiado del sistema de imágenes (filtro, etc.)

De acuerdo con otro aspecto, la invención propone un ensamblaje que comprende un puesto de bioimpresión como se define anteriormente, y un sustrato que presenta al menos una zona de interés y una parte restante, teniendo dicha zona de interés el elemento que distingue dicha zona de interés de la parte restante, estando dispuesto el sustrato en el sistema de colocación.

Cuando se implementa en ingeniería tisular, la zona de interés puede tener un relieve, tal como un rebaje, con respecto a la parte restante del sustrato, teniendo dicho relieve una geometría, estando adaptado dicho puesto de bioimpresión para formar la estructura de tejido biológico correspondiente al relieve.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención propone un método de bioimpresión que comprende las siguientes etapas:

- A - proporcionar un dispositivo de bioimpresión que comprende un medio de acuerdo con la reivindicación 1 para depositar un patrón de material biológico,
- B - proporcionar un sustrato que presenta al menos una zona de interés y una parte restante, teniendo dicha zona de interés un elemento que distingue dicha zona de interés de la parte restante,
- C - colocar la zona de interés con respecto al dispositivo de bioimpresión
- D - adquirir una imagen del sustrato y revelar en la imagen adquirida el elemento de la zona de interés,
- E - procesar la imagen adquirida del sustrato para detectar la zona de interés revelada en la imagen adquirida y determinar el patrón correspondiente a la zona de interés detectada en la imagen adquirida,
- F - depositar el material biológico de acuerdo con el patrón determinado en la zona de interés.

En una realización, la etapa E, puede comprender detectar automáticamente la zona de interés revelada en la imagen adquirida y determinar automáticamente el patrón correspondiente a la zona de interés detectada en la imagen adquirida.

En una realización particular, la zona de interés del sustrato tiene un relieve con respecto a la parte restante del sustrato como elemento, teniendo dicho relieve una geometría, y la etapa D comprende revelar en la imagen adquirida el relieve, la etapa E comprende detectar el relieve revelado en la imagen adquirida y determinar el patrón correspondiente a la geometría del relieve detectado en la imagen adquirida, y la etapa F comprende formar una estructura de tejido biológico correspondiente al relieve.

Además, la etapa E, puede comprender además determinar una ubicación de la zona de interés, y la etapa F puede comprender depositar el material biológico en la ubicación determinada.

Otros objetivos y ventajas de la invención surgirán de la siguiente divulgación hecha en referencia a los dibujos adjuntos, en que:

- la figura 1 es una vista esquemática de un puesto de bioimpresión de acuerdo con una realización de la invención, estando adaptado el puesto de bioimpresión para bioimpresión asistida por láser de una estructura de tejido biológico,
- la figura 2 es una vista de dos defectos de la bóveda craneal realizados en un ratón en una primera experimentación que implementa el puesto de bioimpresión de la figura 1, consistiendo la primera experimentación en un tratamiento *in vivo* de uno de los dos defectos de la bóveda craneal de ratón, como sitio de ensayo, por impresión de material biológico (nanohidroxiapatita, n-HA) adecuado para promover el crecimiento de tejido óseo dentro de los defectos de la bóveda craneal de ratón en el sitio de ensayo, quedando el otro defecto de la bóveda craneal de ratón vacío como sitio de control,
- la figura 3 es una vista lateral parcial del puesto de bioimpresión de la figura 1, que ilustra la colocación de los defectos de la bóveda craneal de ratón en la primera experimentación con respecto a un dispensador de material biológico,
- la figura 4a y 4b son presentaciones de MRI de un edema de la duramadre en el lado de ensayo (flecha) sometido a irradiación directa con láser por impulsos casi infrarrojo después de una semana (figura 4a) y después de 2 semanas (figura 4b) en la primera experimentación, mostrando la figura 4a y 4b que el edema ha sufrido regresión,
- la figura 5 ilustra una sección coronal descalcificada del cerebro del ratón en la primera experimentación, quince días después de que se realizara los defectos de la bóveda craneal y uno de ellos sometido a irradiación por láser, mostrando la figura 5 que la inflamación ha sufrido regresión y sin necrosis observable en los tejidos cerebrales,

- las figuras 6a, 6b, 6c, 6d, 6e y 6f son imágenes de histología descalcificadas de los defectos de la bóveda craneal de ratón en la primera experimentación, indicando la letra B hueso; indicando las letras NT tejidos nerviosos e indicando las letras FT tejidos fibrosos en la figura 6a-6f,
- la figura 6a muestra la n-HA impresa por láser (flecha) en cercano contacto de la superficie cerebral, en el lado de ensayo, una semana después del tratamiento,
- la figura 6b muestra algo de n-HA (flecha) a una distancia de la superficie cerebral, en el sitio de control, una semana después del tratamiento,
- la figura 6c muestra el hueso maduro e inmaduro, en el sitio de ensayo, un mes después del tratamiento,
- la figura 6d muestra tejidos fibrosos en el defecto, en el sitio de control, un mes después del tratamiento,
- la figura 6e muestra el tejido óseo maduro que repara el defecto completo en el sitio de ensayo, tres meses después del tratamiento,
- la figura 6f no muestra tejido óseo en el centro del defecto, en el sitio de control, tres meses después del tratamiento,
- la figura 7 es una vista de la histología descalcificada de los defectos de la bóveda craneal de ratón en la primera experimentación, que muestra una reparación ósea completa en el lado de ensayo después de tres meses (estrella), no reconstruyéndose el defecto de la bóveda craneal de ratón en el sitio de control (flecha),
- la figura 8a y 8b son de imágenes de microtomografía de rayos-X de los defectos de la bóveda craneal de ratón en la primera experimentación, una semana (figura 8a) y un mes (figura 8b) después del tratamiento,
- la figura 9 es una vista de un defecto de la bóveda craneal realizado en un ratón en una segunda experimentación que implementa el puesto de impresión biológica de la figura 1, consistiendo la segunda experimentación en una impresión *in vivo* de células MG63 transfectadas con enzima luciferasa (MG63-Luc) como material biológico dentro de un defecto de la bóveda craneal de ratón de la línea media,
- la figura 10 es una representación de una imagen del defecto de la bóveda craneal de ratón tomada por una cámara de un sistema de imágenes del puesto de impresión biológica de la figura 1,
- la figura 11 es una representación de una imagen del ratón tomada por un generador de imágenes de fotones del sistema de imágenes del puesto de impresión biológica de la figura 1 después de haber inyectado un marcador adecuado (luciferina),
- la figura 12 es un diagrama que muestra la evolución del número de fotones por segundo por estereorradián como función del tiempo después de bioimpresión en una tercera experimentación que implementa el puesto de impresión biológica de la figura 1, consistiendo la tercera experimentación en una impresión *in vivo* de células madre mesenquimatosas murinas (línea celular D1 adquirida de la ATCC) transfectadas por enzima luciferasa como material biológico (D1-Luc) dentro de un defecto de la bóveda craneal de ratón lateral, ilustrando el diagrama la proliferación de células madre mesenquimatosas.

En las figuras, las mismas referencias se refieren a los mismos elementos o análogos.

La figura 1 representa esquemáticamente un puesto de bioimpresión 1 adaptado para depositar sobre un sustrato 3 material biológico 2 para un tratamiento terapéutico o quirúrgico de un tejido de un organismo.

A este respecto, el material biológico 3 puede ser cualquier material biológico adecuado que tenga efecto terapéutico o quirúrgico, incluyendo células vivas y agregados celulares, así como fármacos o cualquier molécula adaptada para interactuar con las células del tejido.

El sustrato 3 forma un soporte sobre el que puede recibirse el material biológico para interactuar con células del tejido, para cultivarse o para crecer. En particular, el material biológico 2 puede imprimirse directamente sobre un sustrato 3 formado por una parte del propio organismo, o indirectamente, el material biológico 2 depositado se implanta posteriormente, junto con el sustrato 3 o no. En el último caso, el sustrato 3 puede ser un cultivo celular, un tejido natural extraído del organismo, un tejido artificial o un armazón, especialmente hecho de material biocompatible o implantable, u otro.

La invención se divulga, en particular, en relación a un puesto de bioimpresión 1 destinado a bioimpresión asistida por láser de alto rendimiento (HT-LAB) para una aplicación en ingeniería tisular, dado como un ejemplo no limitante ilustrativo. Dicho puesto permite imprimir diferentes tipos de material biológico 2 a resolución micrométrica, especialmente para el ensamblaje de estructuras de tejido biológico complejas bidimensionales (2D) o tridimensionales (3D).

En particular, el puesto de bioimpresión asistida por láser 1 descrito puede usarse para formar una estructura de tejido biológico destinada a restaurar, mantener o mejorar un tejido que tiene un defecto mediante el depósito de un patrón que corresponde de forma precisa con la forma del defecto.

Como puede observarse en la figura 1, el sustrato 3, hecho directamente del tejido a reparar o de cualquier otro soporte apropiado que permita un posterior efecto o interacción con las células del tejido, presenta al menos una zona de interés 3a en la que tiene que imprimirse el material biológico 2, y una parte restante 3b.

La zona de interés 3a tiene un elemento que distingue esta zona de interés 3a de la parte restante 3b. En el ejemplo ilustrado, la zona de interés 3a es un rebaje que la distingue de la parte restante 3b del sustrato 3 mediante una

compensación interna de la superficie superior con respecto a la de la parte restante 3b. La zona de interés 3a podría ser, sin embargo, cualquier otro tipo de relieve que proporcione una diferencia de nivel de superficie con respecto a la parte restante 3b.

- 5 El depósito de material biológico 2 puede realizarse directamente sobre la zona de interés 3a que forma el defecto del propio tejido, o indirectamente del tejido, en una zona de interés que tiene una geometría que acopla con la del defecto, implantándose después la estructura de tejido biológico resultante en el defecto del tejido.

10 Debe apreciarse que la invención podría implementarse en cualquier otro tipo de puesto de bioimpresión asistida por láser, usando, por ejemplo, LGDW, MAPLE-DW o AFA-LIFT. Más generalmente, la invención podría usarse en cualquier otro tipo de puesto de bioimpresión, incluyendo impresoras de chorro de tinta, extrusoras mecánicas accionadas por presión tales como bioplóter, impresión de microcontacto, litografía y otras.

15 Además, la invención no se limita a una aplicación en ingeniería tisular y podría implementarse para el tratamiento de otra enfermedad y traumatismo. Realmente, el puesto de bioimpresión puede usarse para depositar de forma precisa fármacos u otra sustancia activa en células identificadas de una manera apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un marcador que proporcione a las células un elemento, tal como un elemento óptico, diferente del de la parte restante del sustrato.

20 El puesto de bioimpresión 1 comprende un dispositivo de bioimpresión 4 adaptado para depositar el patrón de material biológico 2 y controlado por una unidad de control electrónico 5.

25 El dispositivo de bioimpresión 4 comprende al menos un dispensador de material biológico y un sistema de colocación, no mostrados, que recibe el sustrato 3. El dispensador y el sistema de colocación están dispuestos uno respecto al otro para permitir el depósito del material biológico 2 sobre el sustrato 3. La unidad de control 5, electrónica, está conectada al dispensador y al sistema de colocación para mover al menos uno de ellos, por ejemplo, el sistema de colocación, con respecto al otro para colocar la zona de interés 3a con respecto al dispensador.

30 Un ejemplo de un dispositivo de bioimpresión asistido por láser 4 adecuado se divulga en los artículos "High-throughput Laser Printing of Cells and Biomaterials for Tissue Engineering", F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Remy, S. Bellance, P. Chabassier, J. Fricain, y J. Amédée, Acta Biomaterialia, 2009 and "Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime", C. Mézel, L. Hallo, A. Souquet, J. Breil, D. Hébert, y F. Guillemot. Phys. Plasmas 16, 123112  
35 (2009).

40 El sistema de colocación está hecho, por ejemplo, de un sistema de colocación de cinco ejes sofisticado, con el propósito de imprimir patrones de múltiples colores y construir estructuras biológicas 3D. El sustrato 3 puede mantenerse con una plataforma de traslado micrométrica motorizada (x, y, z) cuya resolución es 1 µm para el eje longitudinal x y el eje longitudinal transversal y, y de 5 µm para el eje vertical z.

Además, en este dispositivo de bioimpresión asistido por láser 4 ilustrado esquemáticamente en la figura 1, el dispensador comprende:

- 45 - una cinta 6 que forma un depósito de material biológico 2, teniendo la cinta 6 una primera superficie 6a y una segunda superficie 6b opuesta a la primera superficie 6a y provista de una capa de material biológico 2, enfocando la segunda superficie 6b al sistema de colocación y el sustrato 3,  
- un dispositivo de alojamiento 7 provisto con un espacio de trabajo abierto 7a en que una parte central de la cinta 6 se extiende, manteniéndose de forma extraíble los bordes opuestos de la cinta 6 en cada lado de la parte  
50 central por el dispositivo de alojamiento 7,  
- un sistema de láser 8 dispuesto para emitir un rayo láser 9 adaptado para transferir el material biológico 2 desde la cinta 6 hasta el sustrato 3, enfocando el sistema de láser a la primera superficie 6a de la parte central de la cinta 6.

55 Como puede observarse en la figura 1, la cinta 6 comprende un soporte transparente al rayo láser, por ejemplo, un disco hecho de cuarzo transparente a IR, y recubierto con la capa de material biológico 2. En el ejemplo, el dispositivo de bioimpresión asistida por láser 4 realiza una absorción de LIFT asistida por película (AFA-LIFT). Una capa de transducción intermedia, por lo tanto, se dispone entre el soporte y la capa de material biológico 2 para cambiar la energía óptica que se recibe del rayo láser 9 en energía mecánica para transferir el material biológico 2.  
60 La cinta 6 podría adaptarse, sin embargo, a cualquier otro tipo de método de impresión por láser, donde no se usa dicha capa de transducción intermedia.

65 Para conseguir impresión en múltiples colores, el dispositivo de alojamiento 7 puede consistir en un carrusel motorizado de alta resolución (resolución angular de 1°) montado de forma giratoria con respecto al sistema de láser 8 y provisto con varios espacios de trabajo abierto que reciben las respectivas cintas 6 provistas con diferentes materiales biológicos 2. En particular, el carrusel puede tener una capacidad de carga de cinco diferentes cintas 6. El

sistema de colocación de sustrato y el carrusel se mantienen en el mismo eje vertical con el objetivo de variar las condiciones de centrado sin cambiar la distancia del hueco. El dispositivo de alojamiento está conectado a la unidad de control 5 de modo que cada espacio de trabajo abierto puede enfocar a la zona de interés 3a del sustrato 3.

5 El sistema de láser 8 comprende un dispositivo láser 10 para emitir el rayo láser 9 y un dispositivo de barrido óptico adaptado para orientar el rayo láser 9 dentro del espacio de trabajo abierto 7a y en la primera superficie 6a de la cinta 6.

10 Por ejemplo, el dispositivo láser 10 puede ser un láser de impulsos infrarrojo que tienen una longitud de onda  $\lambda$  que evita inducir alteraciones de los materiales biológicos usados. En particular, puede seleccionarse un rayo láser de cristal sólido de Nd:YAG (Navigator I, Newport Spectra Physics) con las siguientes especificaciones:  $\lambda = 1064$  nm,  $s = 30$  ns,  $f = 1-100$  kHz,  $q = 3.4$  mrad, TEM00,  $ptp < 1,5\%$  rms,  $P = 7$  W. En otras realizaciones, sin embargo, podría usarse un láser UV.

15 Además, el depósito de material biológico 2 mediante la generación de gotas desde la segunda superficie 6b de la cinta 6 puede realizarse dirigiendo el rayo láser 9 mediante el dispositivo de barrido óptico que comprende, por ejemplo, un sistema de barrido de alta velocidad compuesto de dos espejos galvanométricos 11 (SCANgine 14, ScanLab), con una velocidad de barrido que alcanza  $2000$  mm.s<sup>-1</sup>, y una lente F-teta óptica 12 de campo grande (S4LFT, Sill Optics, Francia) ( $F = 58$  mm).

20 El sistema de láser está conectado a la unidad de control que controla el parámetro láser del dispositivo láser 10 y dirige los espejos galvanométricos 11 y la lente F-teta óptica 12 para dirigir el rayo láser 9, que tiene los parámetros adecuados para causar la transferencia del material biológico, de acuerdo con un patrón determinado en la primera superficie 6a de la cinta 6.

25 Como puede observarse en la figura 1, el puesto de bioimpresión comprende además un sistema de imágenes 15, tal como una cámara CCD y/o cualquier otro dispositivo de imágenes adecuado adaptado para proporcionar imágenes anatómicas y/o funcionales, por ejemplo, un generador de imágenes de fotones, MRI, fMRI, PET u otro, conectado a la unidad de control 5 y dirigido de acuerdo con una trayectoria óptica correspondiente al patrón determinado a depositar para el ajuste focal en la cinta 6 y la colocación del sustrato (x, y, z) realizada mediante el sistema de barrido óptico 11, 12.

30 De acuerdo con la invención, el sistema de imágenes 15 está adaptado para adquirir una imagen del sustrato 3, por ejemplo, mediante un barrido realizado moviendo la trayectoria óptica a lo largo del sustrato, y para revelar el rebaje 3a con respecto a la parte restante 3b del sustrato 3. En particular, el sistema de imágenes es sensible a la compensación superficial entre la superficie superior del rebaje 3a y la de la parte restante 3b y puede mostrar, por ejemplo, por contraste, el rebaje 3a en la imagen del sustrato.

35 En aplicaciones donde tiene que detectarse una zona de interés diferente al relieve, el sistema de imágenes 15 puede adaptarse en consecuencia para revelar la zona de interés. Por ejemplo, la zona de interés puede consistir en células de un tipo diferente del de la parte restante, estando adaptado el sistema de imágenes 15 para detectar las células de la zona de interés. En particular, las células pueden tener una disposición espacial que las hace distinguibles de otras células. Las células de la zona de interés pueden iluminarse o marcarse de otro modo para que se revelen por el sistema de imágenes 15 provisto, cuando sea necesario, de un filtro adecuado y/o ajustes adecuados.

40 La unidad de control 5 incluye instrucciones que permiten que la imagen del sustrato adquirida por el sistema de imágenes 15 se procese automáticamente para detectar el rebaje revelado y determinar el patrón correspondiente a la geometría del rebaje 3a, para formar la estructura de tejido biológico correspondiente al rebaje 3a. De forma ventajosa, puede hacerse una ubicación del rebaje 3a en un marco de referencia del puesto de bioimpresión de una manera automatizada por la unidad de control que procesa la imagen del sustrato para dirigir el sistema de colocación, el dispositivo de alojamiento 7 y/o el dispensador en consecuencia.

45 Como alternativa, la imagen del sustrato adquirida por el sistema de imágenes 15 puede procesarse por un operario. El operario puede detectar y posiblemente localizar el rebaje revelado en la imagen adquirida mediante la unidad de control 5, y después puede determinar e introducir el patrón que se ajusta mejor al rebaje.

50 En relación a la figura 1, la implementación del puesto de bioimpresión descrito anteriormente en un método de bioimpresión se divulga ahora. El método de bioimpresión comprende las siguientes etapas:

- 60
- colocar el sustrato 3 en el sistema de colocación y colocar la cinta 6 en el dispositivo de alojamiento 7,
  - dirigir el sistema de colocación y el dispositivo de alojamiento 7 uno respecto al otro para colocar el rebaje 3a del sustrato con respecto al espacio de trabajo abierto 7a,
  - dirigir el dispositivo de imágenes para explorar el sustrato 3 para obtener una imagen del sustrato, siendo sensible el dispositivo de imágenes a compensación superficial para revelar el rebaje 3a.
- 65
- procesar por la unidad de control, trabajando de una manera automatizada o controlada por el operario, la



imagen del sustrato para detectar el rebaje revelado 3a y para determinar tanto la ubicación del rebaje 3a como el patrón correspondiente a la geometría del rebaje 3a,

- mover el rayo láser 9 sobre la primera superficie 6a de la cinta 6 de acuerdo con el patrón determinado para depositar, en la ubicación determinada, el material biológico 2 de acuerdo con el patrón determinado sobre el rebaje, para formar una estructura de tejido biológico correspondiente a la geometría del rebaje 3a.

En el ejemplo ilustrado, la duración del impulso  $\tau$  y la tasa de repetición  $f$  pueden considerarse con el propósito de procesos de alto rendimiento. Además, la calidad del rayo, incluyendo la divergencia  $q$ , el modo espacial y la estabilidad de un impulso a otro (ptp) deben tenerse en cuenta para asegurar la reproducibilidad, la estabilidad y la alta resolución del sistema.

Realmente, se obtiene impresión sin contacto mediante la formación de chorro que se produce ("Jet Formation in the laser forward transfer of liquids", M. Duocastella, J. Fernandez-Paras, P. Serra, y J. Morenza, Applied Physics A: Materials Science and Processing, vol. 93, 2008, 453-456), a una escala de tiempo de microsegundos, por encima de un umbral complejo cuyo valor depende de las propiedades reológicas y el grosor de las películas líquidas, el grosor de la capa de absorción metálica, así como la energía láser ("High-throughput Laser Printing of Cells and Biomaterials for Tissue Engineering", F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J. Fricain, y J. Amédée, Acta Biomaterialia, 2009; Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime ", C. Mézel, L. Hallo, A. Souquet, J. Breil, D. Hébert, y F. Guillemot. Phys. Plasmas 16, 123112 (2009)).

Por analogía con otros estudios en física, se ha propuesto que la formación de chorro podría estar relacionada con la dinámica de burbujas. El crecimiento de burbujas depende principalmente de la viscosidad y la tensión superficial del líquido, mientras que el hundimiento de burbujas está relacionado con la distancia entre el frente de burbuja y la superficie libre. Por consiguiente, como la expulsión de gotas está dirigida por la dinámica de burbujas, el LAB de alto rendimiento (HT-LAB) requiere proximidad espacio-temporal entre dos impulsos y, por tanto, dos burbujas tienen que tenerse en cuenta para evitar la perturbación del hundimiento de la burbuja inicial por otra.

El puesto de bioimpresión asistida por láser de alto rendimiento descrita anteriormente puede usarse ventajosamente en ingeniería tisular para formar una estructura de tejido biológico, en dos dimensiones o tres dimensiones, pretendido para restaurar, mantener o mejorar un tejido que tiene un defecto mediante el depósito de un patrón que corresponde de forma precisa a la geometría del defecto. El depósito puede realizarse directamente en el defecto y el tejido, o indirectamente del tejido y después implantarse en el tejido.

Por ejemplo, el puesto de bioimpresión asistida por láser de alto rendimiento descrita anteriormente se ha implementado en tres experimentaciones particulares detalladas en esta ocasión a continuación para la ingeniería tisular para promover la reparación de huesos.

#### Primera experimentación

La primera experimentación descrita en relación a las figuras 2 a 8 consiste en depositar nanohidroxiapatita (n-HA) en defectos de la bóveda craneal de ratón de tamaño crítico, *in vivo*.

#### Materiales y métodos

##### Síntesis de n-HA imprimible

Se preparó suspensión de nanohidroxiapatita (n-HA) mediante precipitación química en húmedo a temperatura ambiente depositando por goteo una solución de ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) en solución de hidróxido de calcio ( $Ca(OH)_2$ ). El análisis TEM del material sintetizado secado presentaba cristales con forma de aguja de 50 nm de longitud. El análisis FTIR mostró bandas específicas de iones de fosfato a  $559\text{ cm}^{-1}$ ,  $601\text{ cm}^{-1}$  y  $1018\text{ cm}^{-1}$  y una banda carbonato no específica a  $1415\text{ cm}^{-1}$ . El análisis de difracción de rayos-X (XRD) del material secado reveló cristales con parámetros de red hexagonal específicos de hidroxiapatita.

Para los experimentos LAB, se añadió glicerol al 30% (v/v) a la solución de n-HA al final de la preparación. La esterilización de la suspensión que contenía n-HA se realizó por irradiación UV durante 15 minutos. Las propiedades biológicas del material en polvo se ensayaron previamente *in vitro* e *in vivo*: se demostró que la n-HA sintetizada era biocompatible con células osteoblásticas y no causaba inflamación *in vivo* en defectos de la bóveda craneal de ratones.

##### Preparación de la cinta

Como se describe anteriormente, la cinta está hecha de tres capas: un soporte, una capa absorbente metálica delgada, como capa de transducción intermedia y una solución de hidrogel compuesta de una suspensión de n-HA.

El soporte es un disco de 30 mm de diámetro hecho de cuarzo transparente a IR. Se recubrió en primer lugar con

una capa absorbente de titanio delgada (60 nm) usando un recubridor de titanio de alto vacío. El grosor se eligió para que fuera mayor que la profundidad cutánea óptica en longitudes de onda cerca de IR (1064 nm).

5 Después, se extendieron 30  $\mu$ l de la solución sobre la superficie de la cinta mediante la ayuda de un dispositivo de "racleta" (Aplicador de película 3570, Elcometer, Francia) para obtener una capa de un grosor de 30  $\mu$ m de suspensión de n-HA.

#### Establecimiento del defecto de tamaño crítico de la bóveda craneal en ratones

10 Se usaron treinta y seis ratones OF-1 macho de 12 semanas de edad (Charles Rivers, Francia) para este estudio: Seis se usaron para ensayar la irradiación láser de infrarrojos en cerebro de ratón y treinta se usaron para impresión *in vivo* con n-HA. En primer lugar, se anestesiaron con quetamina y xilacina mediante inyección intraperitoneal. Después de la antisepsia de la piel (Betadine) se realizó una incisión en la línea media del cráneo y se diseccionó el cráneo para exponer la bóveda craneal, después se retiró cuidadosamente el periostio. Se realizaron dos defectos laterales de la bóveda craneal de 4 mm de anchura (figura 2) en cada animal con un trépano de 4 mm de diámetro (TBR, Toulouse, Francia).

20 Se usó un defecto para el procesamiento por láser mientras que el sitio contralateral estaba sin tratar como control negativo.

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo irrigación con solución salina constante y se tuvo cuidado de evitar lesión en la duramadre. Después, los animales se pusieron dentro del puesto de bioimpresión para experimentos de impresión *in vivo* (véase a continuación). Al final del experimento, se volvieron a colocar los tejidos blandos y se suturaron usando 3/0 Vicryl. Los animales se recuperaron en un entorno cálido antes de devolverse a las instalaciones animales.

#### Efecto de la irradiación de láser por impulsos casi infrarrojo en el cerebro de ratón

30 El efecto de la irradiación de láser en la duramadre del ratón se evaluó antes de realizar los experimentos de impresión por láser. Se lograron defectos óseos de tamaño crítico en la bóveda craneal de seis ratones macho OF-1, después los animales se colocaron dentro del puesto de impresión y se centró directamente el láser sobre la duramadre en un lado. Según el rayo láser estaba enfocado directamente sobre la duramadre, los efectos perjudiciales hipotéticos sobre la duramadre deben ser peores que los observados durante la impresión con n-HA. De hecho, para la impresión con n-HA, el punto de enfoque del láser estaba 1,5 mm por encima de la superficie de la duramadre. El sitio contralateral se mantuvo sin láser como control negativo. La piel se suturó al final del experimento.

40 Como se muestra en las figuras 4a y 4b, se hizo un seguimiento de la inflamación de forma longitudinal por imágenes de resonancia magnética (MRI) usando un sistema horizontal 4,7 T Biospec (Bruker, Alemania). Este sistema estaba equipado con un inserto de gradiente de 6 cm con capacidad de resistencia máxima de 950 mT/m y un tiempo de ascenso de 80  $\mu$ s. Los ratones se anestesiaron con isofluorano al 1,5-2% (Centravet, La Palisse, Francia) mezclado en aire y después se colocaron en decúbito prono dentro del imán, con la cabeza colocada en el centro de la bobina de RMN. Se realizaron imágenes 3D con la secuencia de TrueFISP: TE/TR = 3,2/6,4 ms, ángulo de inclinación: 65°, FOV: 30 x 18 x 18 mm, matriz: 256 x 96 x 96, resolución: 117 x 188 x 188  $\mu$ m, orientación de corte: coronal, ancho de banda de recepción: 195 Hz/pixel. El número total de promedios fue igual a 24 (6 imágenes por magnitud) produciendo un tiempo de adquisición total de 23 minutos y 26 segundos.

50 Se sacrificó a tres animales después de una semana y los tres restantes se sacrificaron después de un mes mediante exposición a dióxido de carbono hiperbárico. El cráneo y el cerebro se recogieron en bloques y se prepararon para secciones histológicas desmineralizadas: Las muestras se desmineralizaron 12 horas (Decalcifiant osseux BAYER, ref. 70033, Francia), después se deshidrataron en etanol (70%, 80%, 95%, 100%) después se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones coronales de 10  $\mu$ m y se tiñeron con hematoxilina-eosina-azafrán (HES) y se observaron en un fotomicroscopio (Nikon eclipse 80i, Países Bajos). Las secciones se observaron para la presencia de inflamación en la superficie de contacto del cerebro/cráneo.

#### Impresión *in vivo* en defecto de la bóveda craneal de ratón

60 Para experimentos *in vivo*, como se muestra en la figura 3, se instaló el ratón en un dispositivo de alojamiento configurado para recibir al ratón y los defectos de la bóveda craneal se colocaron para enfocar a la cinta.

Por consiguiente, el método de impresión se realizó de la siguiente manera:

- el ratón se colocó en su alojamiento después se introdujo dentro del puesto en las plataformas de traslado motorizadas (x, y, z),
- 65 • gracias al sistema de video (es decir, cámara CCD con una pantalla instantánea), se visualizaron los defectos de la bóveda craneal y se centraron trasladando el alojamiento del ratón de acuerdo con el eje z; de hecho, se

registró la superficie de la duramadre en el programa informático en cuanto a la posición del sustrato siguiendo el eje z; esta posición z se registró como la posición física del sustrato en el programa informático; el centro del defecto derecho entonces se marcó como diana a través de la pantalla táctil, induciendo el traslado del alojamiento del ratón de acuerdo con los ejes (x, y). Esta posición entonces se registró como el origen del patrón impreso,

- se computó el patrón (un disco de 3 mm de diámetro) con el programa informático y se acopló con los parámetros de láser (potencia, frecuencia), una velocidad de barrido y una distancia de hueco de impresión. En el marco de este estudio, de acuerdo con estudios previos sobre impresión por láser de n-HA, la energía del láser fue 12  $\mu$ J por impulso (con un tamaño de mancha de 40  $\mu$ m), la frecuencia fue de 5 kHz, la velocidad de barrido fue de 200 mm/s y el hueco de impresión fue de 150  $\mu$ m,
- se realizó impresión 3D reproduciendo este patrón 30 veces; entre cada patrón, el alojamiento se desplazó automáticamente desde una distancia dada igual a la distancia entre 2 patrones impresos en la cinta; antes de cualquier capa adicional, se descendió el alojamiento de ratón 20  $\mu$ m, que corresponde al grosor de una capa de n-HA;
- al final del proceso, el alojamiento se descendió en una distancia adecuada para evitar cualquier contacto entre el ratón y la cinta.

Se incluyeron treinta y un ratones OF1 macho (12 semanas de edad) dentro de esta cohorte. Después de la generación de defectos óseos de la bóveda craneal, cada animal recibió la misma cantidad de material, que consistía en 30 capas apiladas (de 20  $\mu$ m cada una) de n-HA impresas en HT Bio-LP en el defecto izquierdo (sitio de ensayo). El defecto contralateral (derecha) se dejó vacío para el control negativo (sitio de control). La piel entonces se suturó y el animal se devolvió a las instalaciones animales.

Se usó MRI como metodología no invasiva para evaluar la inflamación cerebral *in vivo* longitudinalmente en los animales del grupo de 3 meses en el día 7, día 15 y día 30. Los parámetros usados en este estudio fueron similares a los presentados anteriormente.

Respecto al seguimiento de n-HA y la formación de hueso nuevo, los ratones se sacrificaron después de una semana (número de ratones, n = 10), un mes (n = 10) o tres meses (n = 10) mediante exposición a dióxido de carbono hiperbárico y se retiraron las cabezas completas "en bloque" y se fijaron 3 días en PFA al 4%. Se hicieron adquisiciones de microtomografía de rayos-X para todas las muestras, usando un General Electric  $\mu$ CT. La tensión e intensidad usadas para la generación de rayos-X fueron 80 kV y 60 mA, respectivamente; se adquirieron 800 imágenes con un tiempo de exposición de 3000 ms. La resolución obtenida fue de 0,015 mm. Se usó el programa informático Image J para evaluar la superficie no reconstruida del defecto óseo. Se realizaron análisis estadísticos usando el programa informático Medcalc® (Bélgica). Se hicieron comparaciones de los tres grupos independientes (muestras independientes: una semana, un mes y tres meses) con el ensayo U de Mann-Whitney no paramétrico. Las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0,05$ .

Finalmente, se desmineralizaron tres muestras de cada grupo para histología. Las secciones descalcificadas se prepararon como se describe anteriormente, se tiñeron con hematoxilina-eosina-azafrán (HES) y se observaron en un fotomicroscopio (Nikon eclipse 80i, Países Bajos) para la presencia de n-HA y hueso recién formado.

#### Resultados y análisis

##### Fundamento para la impresión de n-HA en defectos de tamaño crítico de la bóveda craneal creados en ratones vivos

Este modelo animal descrito anteriormente se retuvo para evaluar la potencialidad de bioimpresión *in vivo*. A pesar del proceso potencialmente traumático, la mayoría de los animales se recuperaron rápidamente y no presentaron signos de infección o trastornos neurológicos.

Se realizó impresión *in vivo* de n-HA usando el puesto HT Bio-LP de la invención.

Se eligió hidroxiapatita porque es el componente no orgánico principal del hueso.

Como resultado preliminar, sobre treinta ratones macho, veintinueve se recuperaron después del proceso completo, incluyendo la secuencia quirúrgica y experimentos adicionales de impresión por láser. No se desarrollaron ni infección de la herida ni trastornos neurológicos en los animales después de la cirugía y la impresión de n-HA. Además, después de conseguir el defecto óseo, se comprobó la duramadre para su integridad, lo que se confirmó por la presencia de vasos sanguíneos pulsantes.

##### Efecto de irradiación láser casi infrarroja en cerebro de ratones

Aunque la bioimpresión asistida por láser se ha estudiado en mayor medida usando láseres por impulsos UV a 248 nm y 355 nm, se usó un láser por impulsos de nanosegundos que emite a 1064 nm debido a la hipotética inocuidad de los impulsos láser casi infrarrojos en tejidos biológicos.

Se realizó irradiación láser directa en la duramadre de seis ratones, usando una exposición similar a los experimentos de impresión.

Como se muestran en las figuras 4a y 4b, los análisis de MRI revelaron que el efecto del láser y el traumatismo quirúrgico consistía en un edema por debajo de la duramadre en el lado de ensayo en el día 7, que sufrió regresión en el día 15 y desapareció después de 21 días. Las secciones descalcificadas presentaban miofibroblastos dentro de los defectos tanto de ensayo como de control, sin inflamación o necrosis del tejido nervioso y el tejido óseo (figura 5). Basándose en estos experimentos, se concluyó que el láser infrarrojo usado en este experimento no tenía efectos perjudiciales sobre los tejidos cerebrales estudiados.

#### Impresión de n-HA *in vivo* dentro de los defectos de la bóveda craneal y reparación del hueso

Respecto a la impresión de n-HA dentro de los defectos de la bóveda craneal, el examen macroscópico al final del experimento confirmó la presencia de material impreso de acuerdo con la forma del patrón dibujado por ordenador. Además, no se modificaron las propiedades químicas y biológicas del material impreso por impresión láser.

El seguimiento de la inflamación cerebral realizada por MRI en animales con impresión de n-HA presentó la misma intensidad de inflamación que las muestras previas irradiadas por láser (véase anteriormente). Por consiguiente, la impresión láser de n-HA *per se* no provoca efectos dañinos en el cerebro de los ratones.

Se hizo un análisis longitudinal de la reparación del hueso en tres puntos temporales (10 ratones después de una semana, 10 ratones después de un mes y 10 ratones después de tres meses) basándose en las secciones histológicas descalcificadas y microtomografía computarizada.

Las secciones descalcificadas revelaron que el material estaba presente en cercano contacto con la duramadre en los sitios de ensayo después de una semana (figura 6a). Después de un mes, se observó hueso maduro e inmaduro recién formado y agregados de n-HA dentro de macrófagos en los sitios de ensayo (figura 6c), mientras que no se observó reparación del hueso en los sitios de control (figura 6d). Tres meses después de la impresión, se observó tejido óseo maduro en los sitios de ensayo (figura 6e); en los sitios de control (figura 6f) la reparación del hueso permaneció incompleta en muchos casos. Además, de una semana a tres meses, la cantidad de partículas de n-HA observadas *in situ* disminuyó, probablemente a causa de la integración del material en el hueso en remodelación o debido a la disolución de los líquidos intersticiales y la fagocitosis por células inflamatorias.

Estos resultados se confirmaron a través de análisis de microtomografía de rayos-X. Como puede observarse en las figuras 8a y 8b, la formación de hueso se observa claramente un mes después de la impresión. Las superficies no reconstruidas eran significativamente menores a un mes frente a una semana ( $p < 0,05$ ), significativamente menores a tres meses frente a un mes ( $p < 0,01$ ) y significativamente menores a tres meses frente a una semana ( $p < 0,01$ ). Además, no se produjo formación de hueso en sitios de control negativo en ningún momento.

En algunos casos, también se observó material de n-HA en el defecto contralateral, que es una zona no afectada por el experimento de impresión. Como se muestra en la figura 6b, puede observarse n-HA a una distancia desde la superficie cerebral (sitios de control, línea media de la bóveda craneal). Estas partículas de n-HA pueden haberse movido desde el sitio impreso debido a la ausencia de inmovilización de materiales impresos en el sitio destinatario. Las presiones aplicadas sobre la piel durante la sutura y después de la recuperación del animal podrían haber inducido, por tanto, la migración de n-HA impresa desde el defecto impreso hasta el sitio contralateral. En el futuro, se pondrá atención específica en la inmovilización de los materiales impresos y en la sutura de la piel del ratón. Con este objetivo, se prevé el uso de pegamento quirúrgico y otras biomembranas.

#### Conclusiones y perspectivas

La bioimpresión *in vivo* de nanohidroxiapatita se ha realizado mediante un puesto CAD-CAM destinado a bioimpresión asistida por láser de alto rendimiento. Estos resultados demuestran que la impresión *in vivo* es posible, y pueden demostrar ser útiles en el futuro para robótica médica e intervenciones médicas asistidas por ordenador.

La actualización de los robots médicos con la capacidad de bioimpresión puede permitir, en primer lugar, la mejora de la precisión quirúrgica. De hecho, aunque actualmente pueden manipularse volúmenes de  $\mu\text{l}$  de materiales o fármacos en el organismo por los cirujanos (o robots actuales) mediante el uso de jeringas, podrían depositarse volúmenes mucho más pequeños usando impresoras biológicas ya que estas últimas pueden generar gotas de un volumen de  $\text{pl}$ . Además, en paralelo a la reducción del volumen, la resolución espacial también se mejoraría en gran medida mediante el uso de impresoras láser u otras bioimpresoras.

Finalmente, que la impresión *in vivo* aparezca como una aplicación original de las tecnologías láser, la combinación de la impresión láser con otros procesos asistidos por láser (por ejemplo, ablación tisular por láser, calentamiento por láser, etc.) podrían ofrecer nuevas perspectivas para los fabricantes de robots y, por lo tanto, los médicos.

Segunda experimentación

5 La segunda experimentación descrita en relación a las figuras 9 a 11, consiste en una impresión *in vivo* de células MG63 transfectadas con enzima luciferasa (MG63-Luc) como material biológico dentro de un defecto de la bóveda craneal de ratón en la línea media.

Materiales y métodos

10 Síntesis de MG63-Luc imprimible

En este experimento, el material biológico depositado fue una solución de células MG63 transfectadas por enzima luciferasa (MG63-Luc). La concentración de células fue de 50 millones de células/ml y las células se suspendieron en medio de cultivo complementado con alginato al 0,5% (v/v).

15 Establecimiento del defecto de tamaño crítico de la bóveda craneal en ratones

En este caso, se usaron ratones desnudos (Charles River, Francia) para realizar un defecto de la bóveda craneal de la línea media de 4 mm de anchura con una fresa con diámetro de trépano (TBR Toulouse, Francia) (véase la figura 9). La preparación del animal es similar al procedimiento mencionado anteriormente.

20 Impresión *in vivo* en defecto de la bóveda craneal de ratón

Se usó el puesto de impresión biológica 1 descrito anteriormente y se preparó una cinta, similar a la descrita en relación a la primera experimentación excepto por la capa de material biológico que recubre el soporte.

25 El ratón como receptor de sustrato 3 se colocó en el sistema de colocación (figura 9) con el defecto de la bóveda craneal de la línea media como zona de interés enfocando al área de trabajo abierta del dispositivo de alojamiento y la cámara CCD.

30 El defecto se detectó por la cámara CCD del sistema de imágenes del puesto de impresión biológica como puede observarse en la figura 11 que muestra una captura de video del defecto.

De acuerdo con la morfología del defecto, se determinó un patrón anular de 3 mm de diámetro. El centro del anillo se ajustó al centro del defecto.

35 Resultados y análisis

La observación macroscópica realizada inmediatamente después de la bioimpresión muestra el círculo de células MG63.

40 Además, se inyectó por vía intraperitoneal luciferina para el análisis de imágenes de fotones (Biospace, Francia). Los resultados de las observaciones del generador de imágenes de fotones inmediatas se muestran en la figura 11 que evidencia la presencia de un patrón de forma anular de células MG63 en la ubicación determinada de forma preliminar por el sistema de imágenes.

45 Este experimento demuestra que la impresión celular *in vivo* es factible.

Tercera experimentación

50 La tercera experimentación descrita en relación a la figura 12 consiste en una impresión *in vivo* de células madre mesenquimatosas murinas (línea celular D1 adquirida de la ATCC) transfectadas por enzima luciferasa como material biológico (D1-Luc) dentro de un defecto de la bóveda craneal lateral de ratón.

Materiales y métodos

55 Preparación de una solución de D1-Luc imprimible

60 En esta experimentación, el material biológico depositado fue una solución de células D1 transfectadas por enzima luciferasa (D1-Luc). La concentración de células fue de 50 millones de células /ml y las células se suspendieron en medio de cultivo complementado con alginato al 1% (v/v).

Establecimiento de defecto de tamaño crítico de la bóveda craneal en ratones

65 En este caso, se usaron Balb/c (Charles River, Francia) para realizar dos defectos de la bóveda craneal laterales de 3,3 mm de anchura con una fresa con diámetro de trépano (TBR Toulouse, Francia). La preparación del animal es similar al procedimiento mencionado anteriormente.

Impresión *in vivo* en defecto de la bóveda craneal de ratón

Se usó el puesto de impresión biológica 1 descrito anteriormente y se preparó una cinta, similar a la descrita en relación a la segunda experimentación excepto por la capa de material biológico que recubre el soporte

5 El ratón como receptor de sustrato 3 se colocó en el sistema de colocación con uno de los defectos de la bóveda craneal laterales como zona de interés enfocando al área de trabajo abierta del dispositivo de alojamiento y la cámara CCD.

10 El defecto se detectó por la cámara CCD del sistema de imágenes del puesto de impresión biológica.

De acuerdo con la morfología del defecto, se determinó un patrón anular de la siguiente manera: diámetro exterior: 3.2 mm y diámetro interior: 2,8 mm. El centro del anillo se ajustó al centro del defecto.

15 Resultados y análisis

Se siguió la proliferación celular *in vivo* hasta 3 semanas después de la bioimpresión usando imágenes de fotones (Biospace, Francia). Como se muestra en la figura 12, las células madre mesenquimatosas proliferan hasta 21 días después de la bioimpresión.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Puesto de bioimpresión (1), que comprende:

5 a. un dispositivo de bioimpresión (4) que comprende un medio para depositar un patrón de material biológico (2) en una zona de interés (3a) de un sustrato (3), teniendo dicha zona de interés (3a) un elemento que distingue dicha zona de interés (3a) de una parte restante (3b) del sustrato (3), comprendiendo dicho dispositivo de bioimpresión (4):

10 - al menos un dispensador de material biológico (6, 7, 8) adaptado para dispensar el material biológico (2) a depositar, y  
 - un sistema de colocación adaptado para recibir el sustrato (3) y para colocar la zona de interés (3a) con respecto al dispensador (6, 7, 8),

15 b. una unidad de control electrónico (5) adaptado para dirigir el dispensador (6, 7, 8) y el sistema de colocación uno respecto al otro de acuerdo con el patrón a depositar,

estando el puesto de bioimpresión (1) **caracterizado por que** comprende un sistema de imágenes (15) que comprende un medio:

20 - para adquirir una imagen del sustrato (3) y  
 - para revelar en la imagen adquirida el elemento de la zona de interés (3a) con respecto a la parte restante (3b),

25 Estando conectado dicho sistema de imágenes a una unidad de control que comprende un medio para procesar la imagen adquirida del sustrato para detectar la zona de interés revelada en la imagen adquirida y para determinar el patrón correspondiente a la zona de interés (3a) detectada en la imagen adquirida.

30 2. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la unidad de control electrónico (5) está adaptada para procesar la imagen adquirida del sustrato (3) para detectar automáticamente la zona de interés (3a) revelada en la imagen adquirida y para determinar automáticamente el patrón correspondiente a la zona de interés (3a) detectada en la imagen adquirida.

35 3. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la unidad de control electrónico (5) está adaptada para determinar una ubicación de la zona de interés (3a) en un marco de referencia del puesto de bioimpresión (1) y para dirigir el dispensador (6, 7, 8) y el sistema de colocación uno respecto al otro de acuerdo con la ubicación determinada.

40 4. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que la unidad de control electrónico (5) está adaptada para dirigir el sistema de imágenes (15) de acuerdo con una trayectoria óptica correspondiente al patrón determinado a depositar.

5. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dispensador comprende:

45 - un dispositivo de alojamiento (7) para alojar al menos una cinta (6) que contiene el material biológico (2), estando provisto el dispositivo de alojamiento (7) de al menos un espacio de trabajo abierto (7a) adaptado para recibir al menos una parte de la cinta (6), estando adaptada la unidad de control electrónico (5) para dirigir el dispositivo de alojamiento (7) y el sistema de colocación uno respecto al otro de modo que el espacio de trabajo abierto (7a) enfoque a la zona de interés (3a),

50 - un sistema de láser (8) dispuesto para emitir un rayo láser (9) adaptado para transferir el material biológico (2) desde la cinta (6) hasta el sustrato (3), estando adaptada la unidad de control electrónico (5) para dirigir el sistema de láser (8) para dirigir el rayo láser (9) de acuerdo con el patrón determinado dentro del espacio de trabajo abierto (7a).

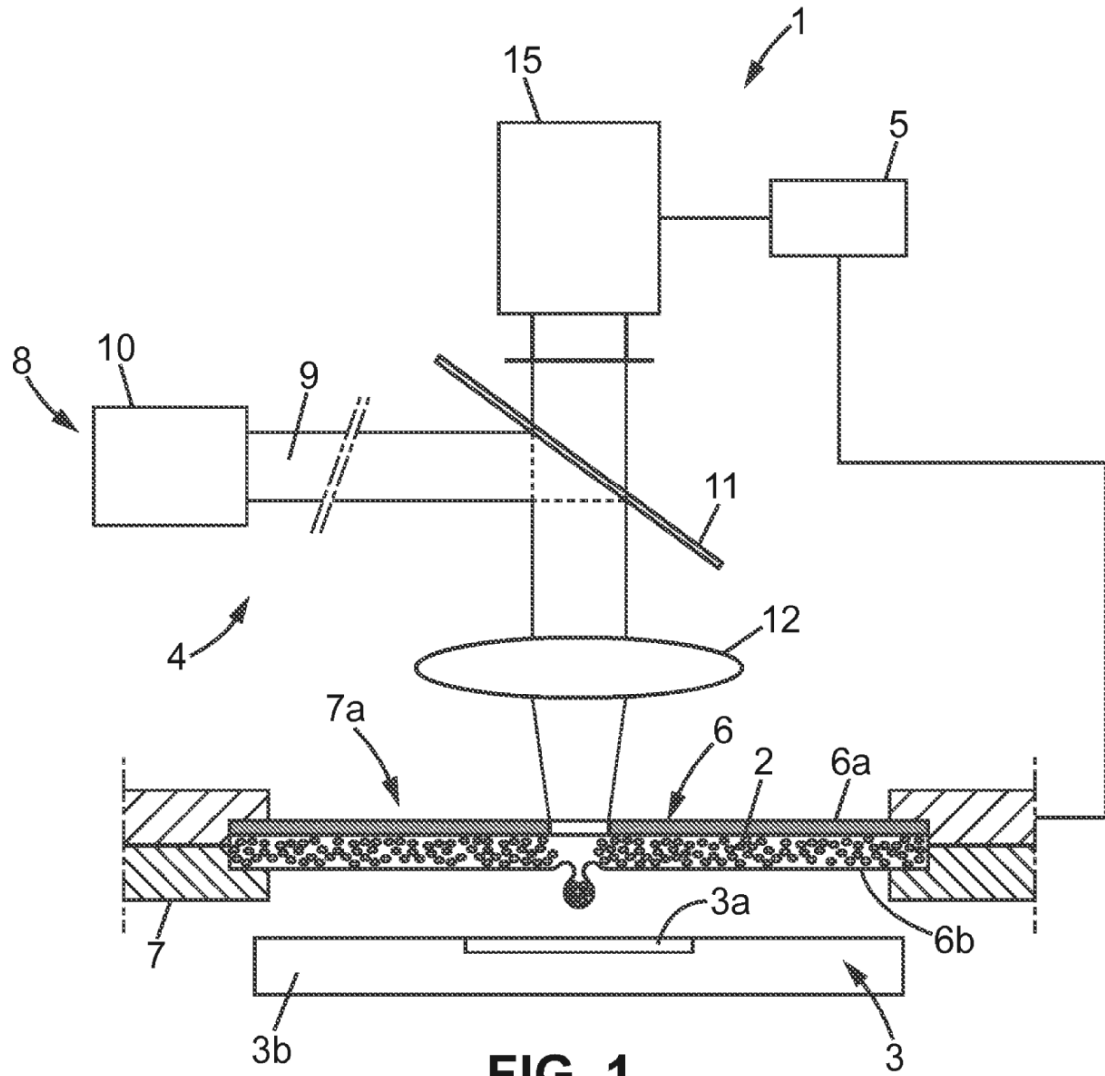
55 6. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el sistema de láser (8) comprende un dispositivo de láser (10) para emitir el rayo láser (9) y un dispositivo de barrido óptico (11, 12) adaptado para orientar el rayo láser (9) dentro del espacio de trabajo abierto (7a).

60 7. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el dispositivo láser (10) es un láser de impulsos infrarrojo.

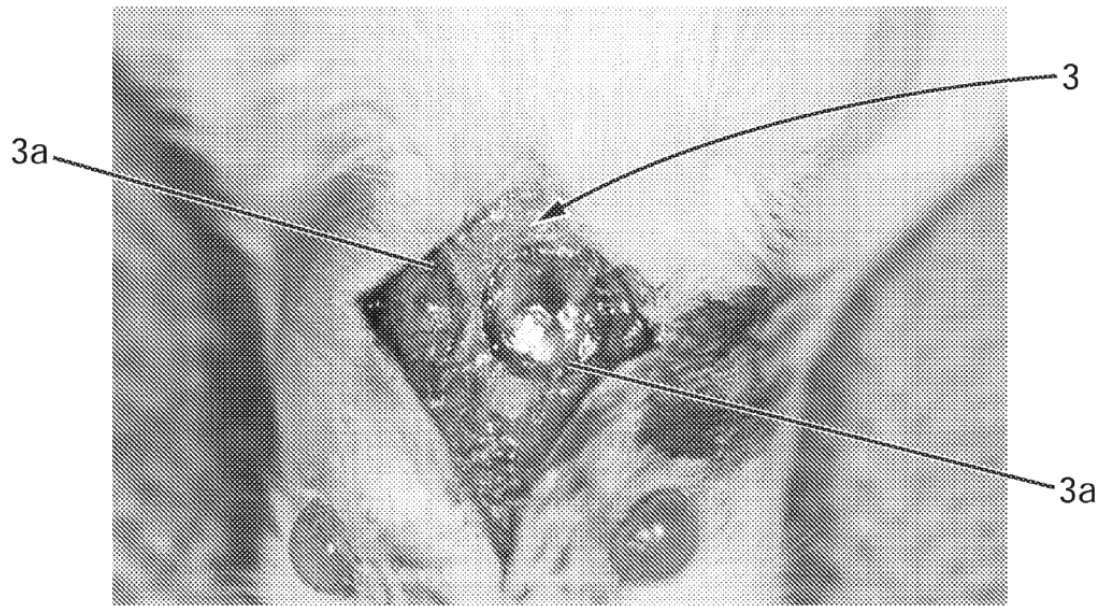
65 8. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende además una cinta (6) recibida al menos parcialmente en el espacio de trabajo abierto (7a) del dispositivo de alojamiento (7), presentando la cinta (6) una primera superficie (6a) que enfoca al sistema de láser (8) y una segunda superficie (6b) provista de una capa de material biológico (2), enfocando dicha segunda superficie (6b) al sistema de colocación.

9. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la cinta (6) comprende un soporte transparente al rayo láser (9) y recubierto con la capa de material biológico (2), y una capa de transducción intermedia dispuesta entre el soporte y la capa de material biológico (2).
- 5 10. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el dispositivo de bioimpresión (4) está adaptado para formar una estructura de tejido biológico mediante el depósito del patrón de materia biológico (2), teniendo la zona de interés un relieve (3a) con respecto a la parte restante (3b) del sustrato (3) como elemento, teniendo dicho relieve (3a) una geometría, estando adaptado el sistema de imágenes (15) para revelar en la imagen adquirida el relieve (3a), detectándose el relieve revelado en la imagen adquirida y correspondiendo el patrón a la geometría del relieve detectado en la imagen adquirida que se está determinando, para formar la estructura de tejido biológico correspondiente al relieve (3a).
- 10 11. Puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la unidad de control electrónico (5) está adaptada para detectar automáticamente el relieve (3a) revelado en la imagen adquirida y para determinar automáticamente el patrón correspondiente a la geometría del relieve (3a) detectado en la imagen adquirida.
- 15 12. Ensamblaje que comprende un puesto de bioimpresión (1) de acuerdo con la reivindicación 1 a 11 y un sustrato (3) que presenta al menos una zona de interés (3a) y una parte restante (3b), teniendo dicha zona de interés (3a) el elemento que distingue dicha zona de interés (3a) de la parte restante (3b), estando dispuesto el sustrato (3) en el sistema de colocación.
- 20 13. Ensamblaje de acuerdo con la reivindicación 12 que depende de la reivindicación 10, en el que la zona de interés tiene un relieve (3a) con respecto a la parte restante (3b) del sustrato (3), teniendo dicho relieve (3a) una geometría.
- 25 14. Ensamblaje de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el relieve es un rebaje (3a).
15. Ensamblaje de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el sustrato (3) se forma por una parte del propio organismo o que es un cultivo celular, un tejido natural, un tejido artificial o una estructura, especialmente hecha de material biocompatible o implantable.
- 30 16. Método de bioimpresión que comprende las siguientes etapas:
- 35 A - proporcionar un dispositivo de bioimpresión que comprende un medio de acuerdo con la reivindicación 1 que deposita un patrón de material biológico (2),  
 B - proporcionar un sustrato (3) que presenta al menos una zona de interés (3a) y una parte restante (3b), teniendo dicha zona de interés (3a) un elemento que distingue dicha zona de interés (3a) de la parte restante (3b),  
 C - colocar la zona de interés (3a) con respecto al dispositivo de bioimpresión (4)  
 40 D - adquirir una imagen del sustrato (3) y revelar en la imagen adquirida el elemento de la zona de interés (3a),  
 E - procesar la imagen adquirida del sustrato (3) para detectar la zona de interés (3a) revelada en la imagen adquirida y para determinar el patrón correspondiente a la zona de interés (3a) detectada en la imagen adquirida,  
 F - depositar el material biológico (2) de acuerdo con el patrón determinado en la zona de interés (3a).
- 45 17. Método de bioimpresión de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la etapa E comprende detectar automáticamente la zona de interés (3a) revelada en la imagen adquirida y determinar automáticamente el patrón correspondiente a la zona de interés (3a) detectada en la imagen adquirida.
- 50 18. Método de bioimpresión de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en el que la zona de interés del sustrato (3) tiene un relieve (3a) con respecto a la parte restante (3b) del sustrato (3) como elemento, teniendo dicho relieve (3a) una geometría, y la etapa D comprende revelar en la imagen adquirida el relieve (3a), la etapa E comprende detectar el relieve revelado (3a) en la imagen adquirida y determinar el patrón correspondiente a la geometría del relieve (3a) detectado en la imagen adquirida, y la etapa F comprende formar una estructura de tejido biológico correspondiente al relieve (3a)
- 55 19. Método de bioimpresión de acuerdo con la reivindicación 16 A 18, en el que la etapa E comprende además determinar una ubicación de la zona de interés (3a), y la etapa F comprende depositar el material biológico (2) en la ubicación determinada.
- 60 20. Un puesto de bioimpresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un tratamiento terapéutico o quirúrgico de un tejido de un organismo.

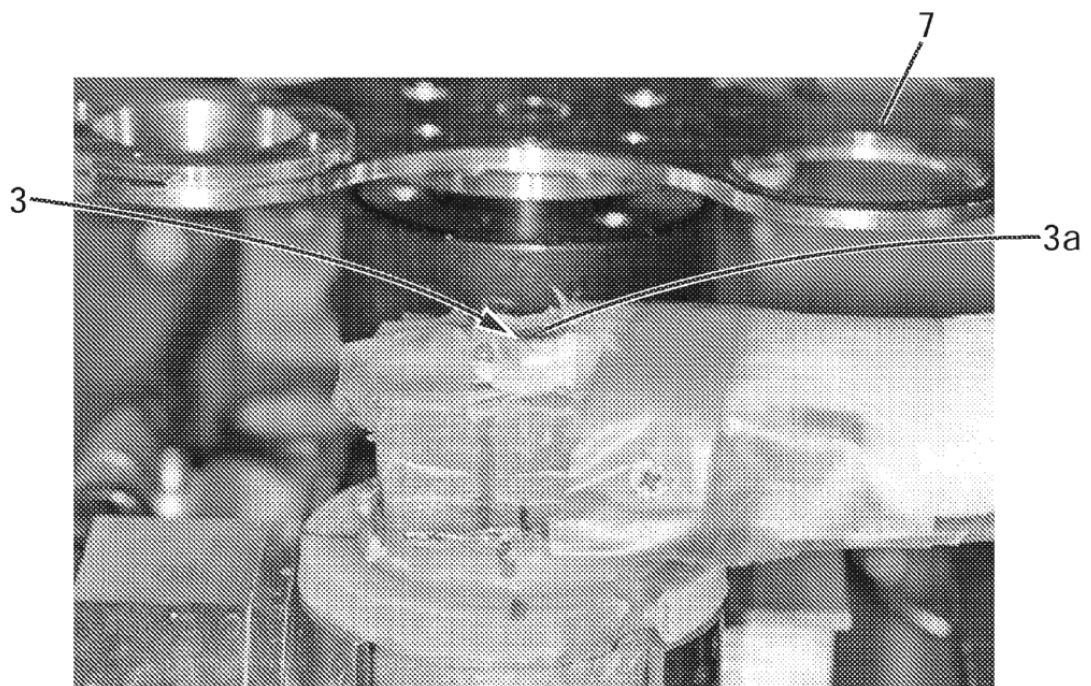




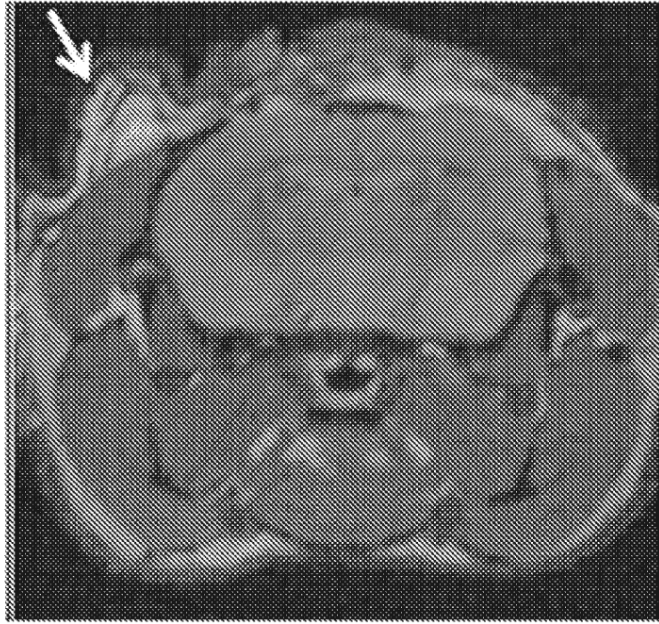
**FIG. 1**



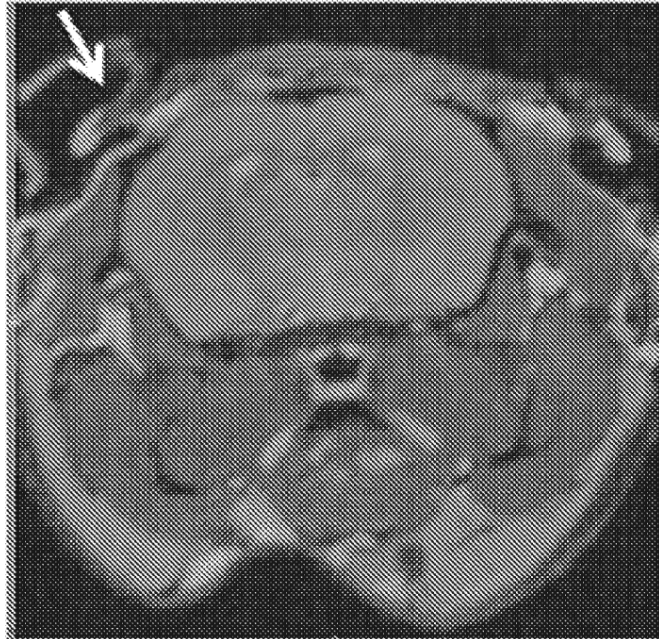
**FIG. 2**



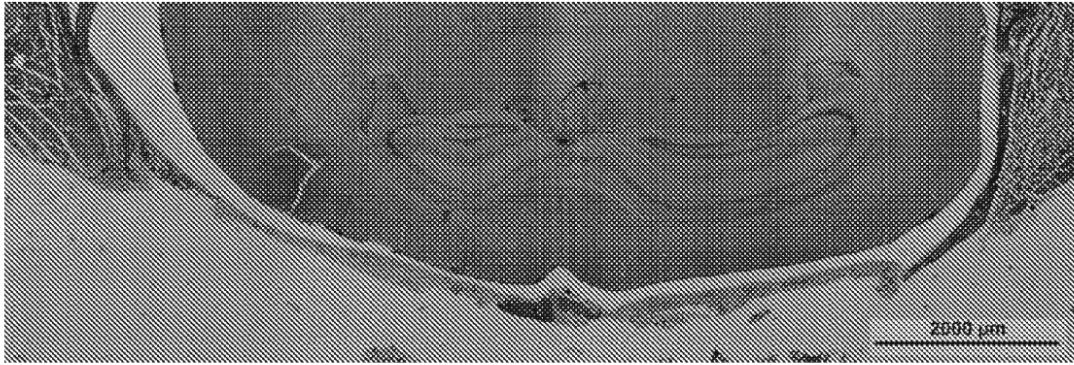
**FIG. 3**



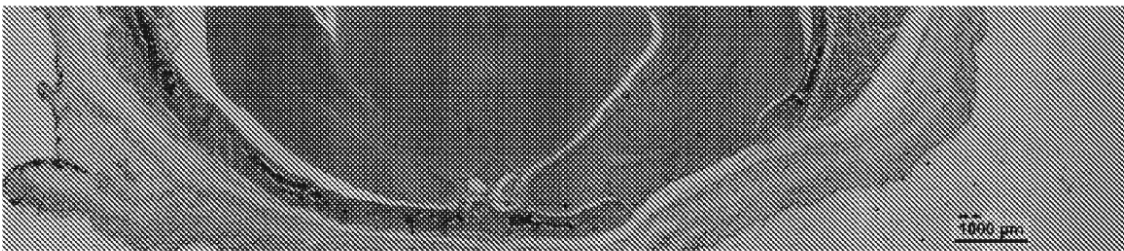
**FIG. 4a**



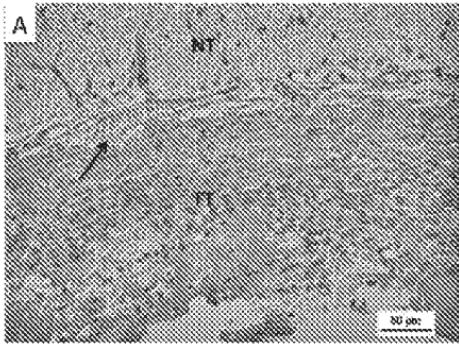
**FIG. 4b**



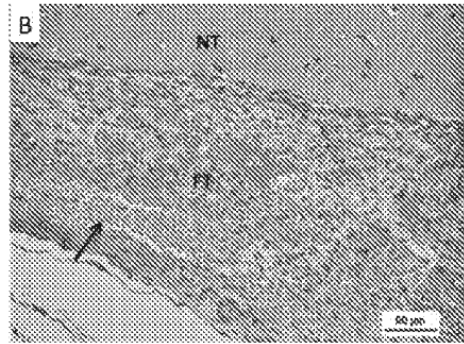
**FIG. 5**



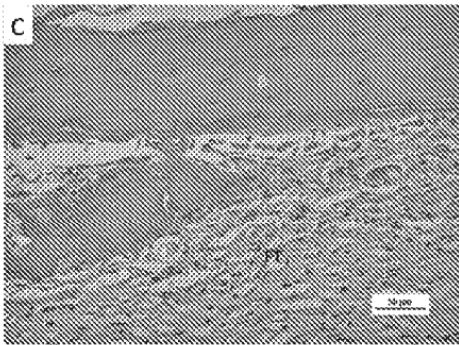
**FIG. 7**



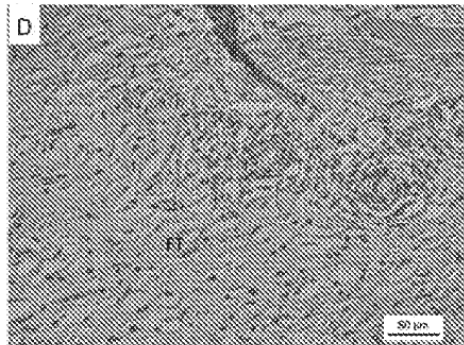
**FIG. 6a**



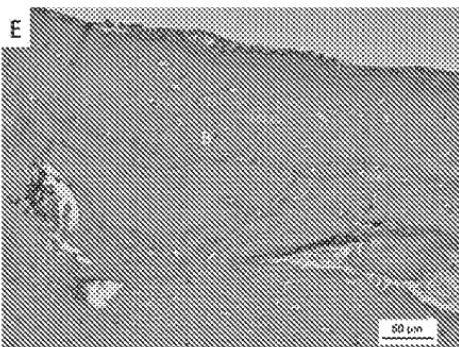
**FIG. 6b**



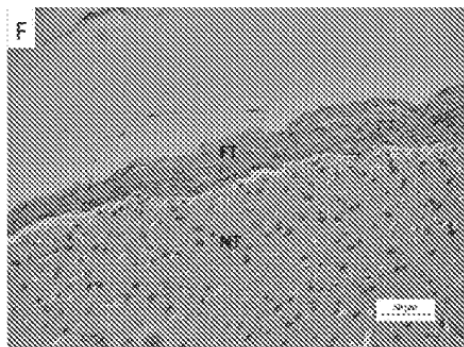
**FIG. 6c**



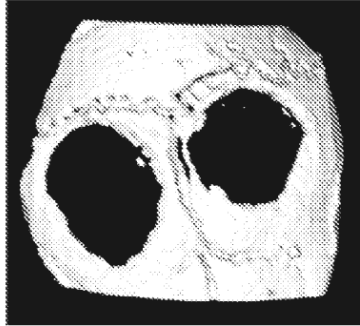
**FIG. 6d**



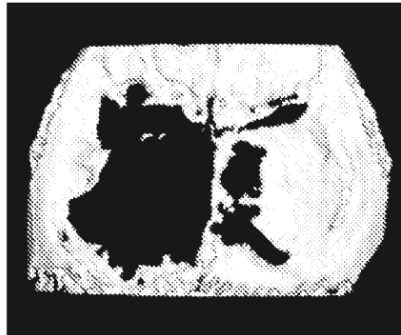
**FIG. 6e**



**FIG. 6f**



**FIG. 8a**

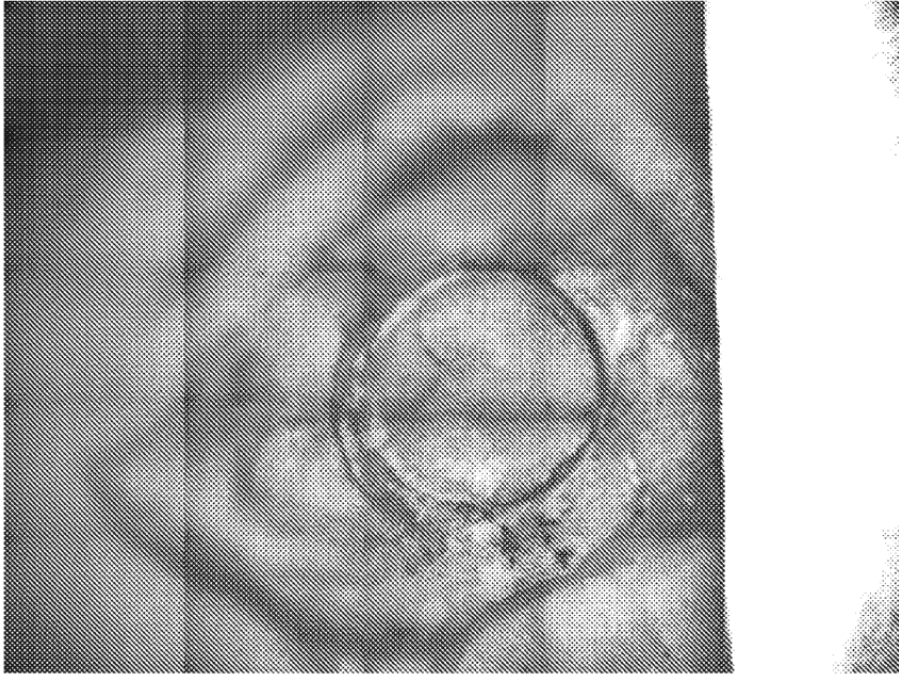


**FIG. 8b**

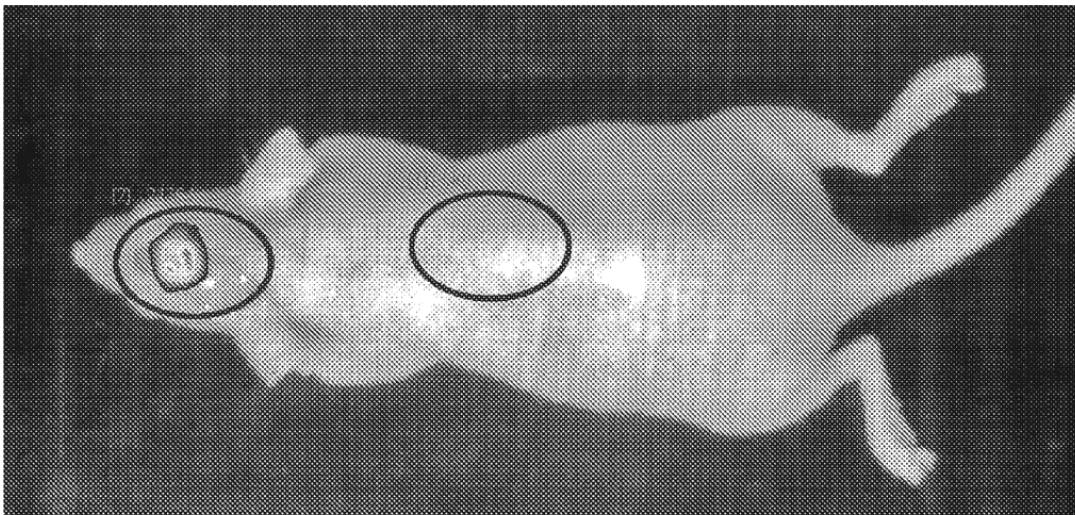


**FIG. 9**

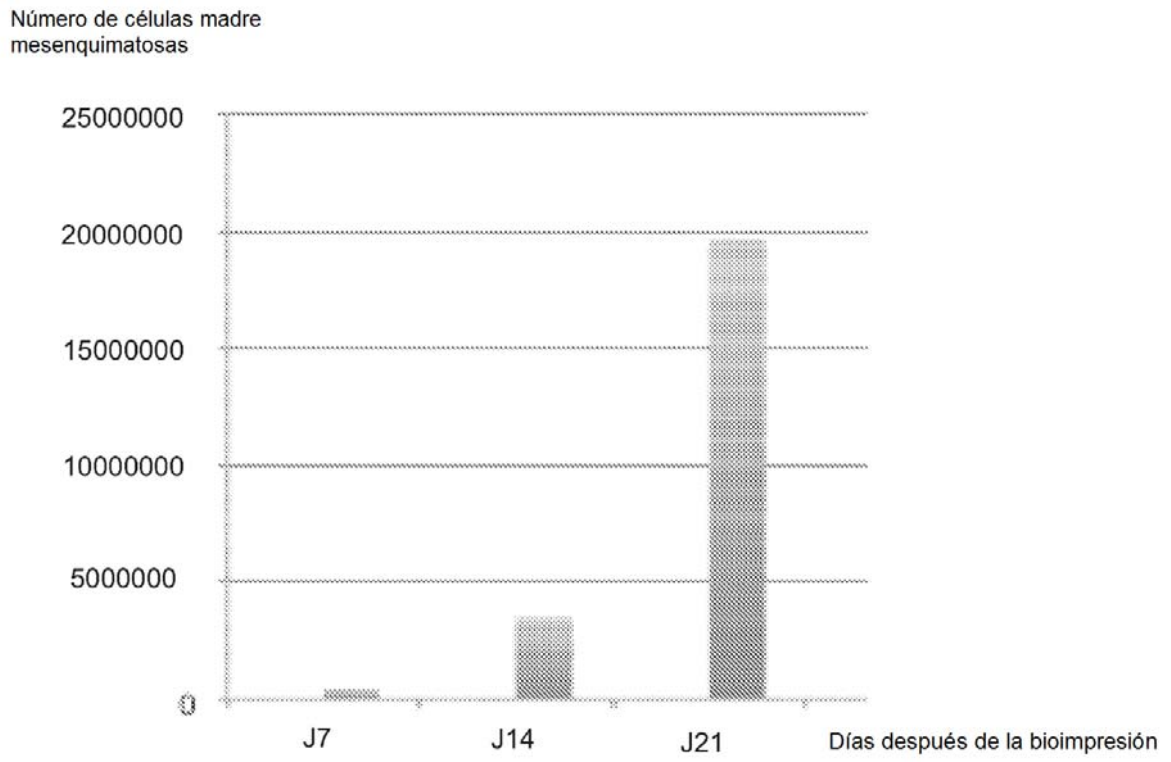




**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**