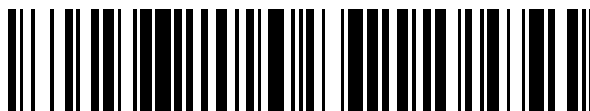


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 696**

51 Int. Cl.:

C12M 1/26 (2006.01)
B29C 67/00 (2007.01)
B41J 2/00 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015** **PCT/FR2015/053570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16097620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015** **E 15831060 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 3234102**

54 Título: **Método de impresión de elementos biológicos con láser y dispositivo para su realización**

30 Prioridad:

17.12.2014 FR 1462570

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (50.0%)
35 Place Pey Berland
33000 Bordeaux, FR y
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)

72 Inventor/es:

GUILLEMOT, FABIEN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 685 696 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

Método de impresión de elementos biológicos con láser y dispositivo para su realización

5 La presente invención se refiere a un método de impresión de elementos biológicos con láser así como a un dispositivo para su realización. La invención también tiene como objeto un método de preparación de un tejido biológico que utiliza este método de impresión.

10 De acuerdo con un primer modo de realización, es posible hacer crecer *in vitro* células sobre una matriz macroporosa biodegradable (scaffold en inglés) para obtener un tejido biológico. Este primer modo de realización no es totalmente satisfactorio ya que el crecimiento del tejido biológico se puede limitar en la profundidad de la matriz macroporosa debido a un defecto de colonización celular. Además, este modo de realización permite difícilmente tratar la complejidad de los tejidos (que se caracteriza por una multiplicidad de tipos celulares organizados de acuerdo con disposiciones específicas y, generalmente, anisótropos).

15 Para solucionar estos inconvenientes, se han desarrollado métodos de impresión de elementos biológicos para producir un tejido biológico de manera que se puede automatizar.

20 De acuerdo con las obras, estos métodos de impresión se denominan bio-impresión, microimpresión de elementos biológicos o bioprinting en inglés.

De acuerdo con estos métodos con el tejido biológico se obtiene imprimiendo gotitas de tintas biológicas. Para obtener un volumen, las gotitas se ordenan por capas que se superponen las unas sobre las otras.

25 De acuerdo con una primera variante, la tinta biológica se apilan en un depósito y pasa a través de boquillas o de capilares para formar gotitas que se transfieren sobre un soporte. Esta primera variante de impresión denominada con boquilla reagrupa la bioextrusión, la impresión con chorro de tinta o la impresión mediante microválvulas.

30 La bioextrusión permite obtener una densidad celular importante del orden de 100 millones de células por mililitro y una resolución del orden del milímetro.

35 La impresión mediante microválvulas permite obtener una densidad celular menor del orden de varios millones de células por mililitro y una resolución mejor del orden de $100\ \mu\text{m}$. La impresión con chorro de tinta permite obtener una densidad celular idéntica a la impresión mediante microválvulas, inferior a 10 millones de células por mililitro y una resolución mejor del orden de $10\ \mu\text{m}$.

40 En el caso de la bioextrusión, las células se depositan a partir de una primera boquilla y un hidrogel se deposita de forma simultánea a partir de una segunda boquilla. Por el contrario, las células y el hidrogel se mezclan en un depósito antes de extrusión. En los otros casos, la tinta es un medio acuoso que contienen las células. De acuerdo con las variantes, la bioextrusión permite depositar la tinta de manera continua en forma de filamentos o de manera discontinua en forma de gotitas.

45 De acuerdo con estos modos de impresión con boquilla, la resolución de impresión estando relacionada en particular con la sección de las boquillas, solo las tintas biológicas con características reológicas se pueden utilizar para resoluciones elevadas. Por lo tanto, las tintas biológicas de gran densidad celular difícilmente se pueden imprimir con una resolución elevada ya que esta técnica de impresión induce, en el momento del paso a través de la boquilla, limitaciones de cizallamiento importantes susceptibles de deteriorar las células. Además, con este tipo de tinta, los riesgos de obturación de las boquillas por las células son importantes debido en particular a la sedimentación de las células en el interior de los depósitos.

50 Para poder utilizar una gran gama de tintas biológicas y conseguir un nivel elevado de resolución, se ha desarrollado un método de impresión de elementos biológicos con láser. Este método de impresión denominado bio-impresión con láser, también se conoce con el nombre de "Laser-Assisted Bioprinting" (LAB) en inglés. La invención se refiere de forma más precisa a este tipo de métodos de impresión. A modo de comparación, la bioimpresión con láser permite imprimir tintas que presentan una gran densidad celular del orden de 100 millones de células por mililitro con una resolución de $10\ \mu\text{m}$.

60 Como se ilustra en la figura 1, un dispositivo de impresión de elementos biológicos con láser que se basa en la técnica denominada "Laser-Induced Forward Transfer" (LIFT) en inglés, comprende una fuente de láser pulsada 10 que emite un haz de rayos láser 12, un sistema 14 para focalizar y orientar el haz de rayos láser 12, un soporte dador 16 que comprende al menos una tinta biológica 18 y un sustrato receptor 20 colocado con el fin de recibir las gotitas 22 emitidas desde el soporte dador 16.

En particular se conocen los documentos de la técnica anterior que siguen a continuación:

- la solicitud de patente americana US2013017564

- la solicitud de patente internacional WO2014110590
- el artículo de Saunders *et al.* "3. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing" que apareció en BIOMATERIALS, 20071023 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, Vol: 29, N.º: 2, Página(s): 193 203
- 5 - el artículo de Ovisanikov "Laser printing of cells into 3D scaffolds" que apareció en BIOFABRICATION, 20100310 Institute of Physics Publishing Ltd, Reino Unido, Vol: 2, N.º: 1, Página(s): 14104-1 - 14104-7.

De acuerdo con esta técnica de impresión, el haz de rayos láser es pulsado y para cada impulsión se genera una gotita. La tinta biológica 18 comprende una matriz, por ejemplo un medio acuoso, en el que están presentes
10 elementos, por ejemplo células, a depositar sobre el sustrato receptor 20. El soporte dador 16 comprende una lámina 24 transparente a la longitud de onda del haz de rayos láser 12 que está revestida con una capa absorbente 26 sobre la que se coloca la tinta biológica 18 en forma de una película.

La capa absorbente 26 permite convertir la energía luminosa en energía cinética. Por lo tanto, el haz de rayos láser
15 12 produce un calentamiento puntual al nivel de la capa absorbente 26 que genera por vaporización una burbuja de gas 28 que por expansión provoca la eyección de una gotita 30 de tinta biológica.

De acuerdo con una distribución conocida, el haz de rayos láser 12 impacta en el soporte dador 16 que está
20 orientado de acuerdo con una dirección aproximadamente vertical y de acuerdo con un sentido a abajo, es decir en el mismo sentido que la fuerza gravitacional G. Por lo tanto, la tinta biológica 18 se coloca sobre la lámina 24 con el fin de ser orientada hacia la parte baja en dirección del sustrato receptor 20 que se coloca por debajo del soporte dador 16.

Teniendo en cuenta esta distribución, la tinta biológica 18 está en forma de una película con un grosor E inferior a un
25 umbral dado para poder que se pueda mantener sobre la lámina. Este umbral varía en particular en función de la tensión superficial, de la viscosidad y de la densidad de la tinta biológica.

La formación de las gotitas 30 a partir de la película de tinta biológica depende de numerosos parámetros que son
30 relativos en particular con respecto al haz de rayos láser 12 (longitud de onda, energía, duración de impulsión,...), a la naturaleza de la tinta biológica 18 (tensión superficial, viscosidad,...), a las condiciones exteriores (temperatura, higrometría,...).

Incluso se la impresión con láser permite obtener en teoría un caudal de impresión importante en la medida en la
35 que es posible generar varias decenas de miles de gotitas por segundo, la producción de tejidos biológicos no es rápida ya que estas gotitas no forman más que varias decenas de picolitros. Además, los soportes dadores se deben sustituir con frecuencia ya que no contienen cada uno más que un bajo volumen de tinta para imprimir del orden de varias decenas de microlitros.

De acuerdo con un segundo modo de realización que se ilustra en la figura 2 y que se describe en una publicación
40 con el título "Microdroplet deposition through a film-free laser forward technique" que apareció el 1 de octubre de 2011 en el sitio www.elsevier.com, un dispositivo de impresión con láser comprende una fuente de láser 32 que emite un haz de rayos láser 34, un sistema 36 para focalizar y orientar el haz de rayos láser 34, un soporte dador 38 que contiene al menos una tinta biológica 40 así como un sustrato receptor 42 colocado con el fin de recibir las
45 gotitas 44 emitidas desde el soporte dador 38.

A diferencia del primer modo de realización, el soporte dador 38 no comprende capa absorbente distinta de la tinta
biológica.

De acuerdo con este modo de realización, el soporte dador 38 comprende un depósito 46 sin pared superior de
50 modo que la superficie libre 48 de la tinta biológica 40 contenida en el depósito se enfrenta al sustrato receptor 42. Para obtener una superficie libre 48 regular y ligeramente plana, la tinta biológica no se presenta bajo la forma de una película fina sino de un volumen que tiene una profundidad del orden de 3 mm. De esta forma, el fondo del depósito no tiene influencia en la forma de la superficie libre 48 de la tinta biológica y las paredes laterales del
55 depósito tienen un efecto limitado en la periferia de la superficie libre 48 debido a la tensión superficial.

Teniendo en cuenta la profundidad del volumen de tinta biológica, la superficie libre 48 está orientada
necesariamente hacia la parte superior para permanecer en el depósito y el sustrato receptor 42 se coloca por la parte superior de la tinta biológica 40.

De acuerdo con el presente documento, para obtener la inyección de una gotita, el haz de rayos láser 34 se focaliza
60 justo por la parte inferior de la superficie libre 48 a una profundidad del orden de 40 a 80 μm . Por lo tanto, las gotitas emitidas a partir de la superficie libre 48 se proyectan hacia el sustrato receptor 42 de acuerdo con un sentido de desplazamiento contrario al sentido de la fuerza gravitacional G.

Incluso si este segundo modo de realización utiliza soportes dadores que contienen un volumen de tinta biológica
65 más importante, no es en gran medida adecuado para las tintas biológicas. En efecto, como se ha indicado

anteriormente, estas tintas biológicas contienen elementos a imprimir, tales como por ejemplo células, cubiertas en una matriz, que tienen tendencia por sedimentación a descender al fondo del depósito. La concentración de los elementos a imprimir siendo baja en la proximidad de la superficie libre, las gotitas impresas tienen derecho a bajas concentraciones de células lo que generalmente es perjudicial para el tejido biológico impreso. Además, de acuerdo con este método, es muy difícil controlar el número de células y la concentración de las células depositadas.

Además, la presente invención tiene como objeto solucionar los inconvenientes de la técnica anterior.

En este sentido, la invención tiene como objeto un método de impresión de al menos una tinta biológica, dicho método utilizando al menos una cabeza de impresión de tipo láser para depositar al menos una gotita de al menos una tinta biológica sobre una superficie de deposición de un sustrato receptor. El método de impresión se caracteriza por que utiliza al menos una cabeza de impresión con boquilla para depositar al menos una gotita de al menos una tinta biológica sobre una superficie de deposición del mismo sustrato receptor que la cabeza de impresión de tipo láser.

Esta combinación permite aumentar el rendimiento de fabricación de los tejidos biológicos y obtener tejidos biológicos más complejo.

Para la producción de un tejido biológico que comprende a la vez células y una matriz extracelular, los materiales que constituyen esta matriz extracelular se depositan mediante la o las cabeza(s) de impresión con boquilla y por que las células se depositan mediante la o las cabeza(s) de impresión de tipo láser.

La invención también que con objeto un método de preparación de un tejido biológico que se caracteriza por que comprende las etapas que tienen como objeto:

- Generar una representación numérica en tres dimensiones del tejido biológico a preparar, dicha representación comprendiendo varias zonas de volumen coloreadas o con texturas, cada color o textura estando asociados a una tinta biológica,
- Hacer cortes de la representación numérica en una sucesión de capas superpuestas, cada capa comprendiendo zonas coloreadas o con texturas que corresponden a las zonas de volumen de la representación numérica,
- Para cada capa, determinar la posición de las gotitas a imprimir de cada tinta biológica en función de las zonas coloreadas o con texturas y del volumen previsto de cada una de las gotitas,
- Imprimir las diferentes gotitas.

De preferencia, las capas tienen un grosor función de las dimensiones de las gotitas. De forma ventajosa, cada capa comprende un conjunto de pequeños polígonos elementales que tienen colores o texturas diferentes en función de la zona a la que pertenecen.

De acuerdo con un modo de realización, para determinar la posición de cada gotita, cada zona de un mismo color o de una misma textura se ocupa con elipses idénticas que tienen dimensiones en función de las dimensiones de las gotitas de la tinta biológica destinada a su impresión en dicha zona, el centro de cada elipse correspondiendo la posición del centro de una gotita. De preferencia, la orientación de las elipses se realiza zona a zona, por orden decreciente de tamaños.

La invención también tiene como objeto un dispositivo de impresión que comprende al menos un sustrato receptor con una superficie de deposición y al menos una cabeza de impresión de tipo láser y que se caracteriza por que comprende al menos una cabeza de impresión con boquilla para imprimir al menos una tinta biológica sobre el mismo sustrato receptor que la o las cabeza(s) de impresión de tipo láser.

De acuerdo con otra característica, el dispositivo de impresión comprende un recinto configurado para apilar al menos una base de pedestal que soporta un soporte dador, dicho recinto estando equipado con medios de confinamiento que permiten conservar en el interior una atmósfera adecuada para las tintas biológicas.

De preferencia, el recinto tiene dimensiones adecuadas para apilar varias bases de pedestal. En este caso, el dispositivo de impresión comprende al menos un núcleo configurado para su apilamiento en el interior de dicho recinto, dicho núcleo comprendiendo un compartimento para cada base. De forma ventajosa, el recinto comprende sobre una primera cara orientada hacia las cabezas de impresión una primera abertura que permite la salida de las bases de pedestal y sobre otra cara una segunda abertura que permite introducir las bases de pedestal.

De acuerdo con otra característica, el dispositivo de impresión comprende una pinza móvil para desplazar las bases de pedestal entre el recinto y la cabeza de impresión de tipo láser.

De acuerdo con otra característica, el dispositivo de impresión comprende un bastidor móvil que soporta al menos un sustrato receptor, un sistema de guía y de desplazamiento del bastidor móvil con respecto a un armazón de acuerdo con tres direcciones y un sistema de control que permite controlar los desplazamientos del bastidor móvil, dicho sistema de guía y de desplazamiento y dicho sistema de control teniendo una precisión micrométrica.

Otras características y ventajas aparecerán con la descripción de la invención que sigue a continuación, descripción proporcionada únicamente a modo de ejemplo, con respecto a las figuras adjuntas en las que:

- 5 - La figura 1 es una representación esquemática de un dispositivo de impresión con láser que ilustra una variante de la técnica anterior,
- La figura 2 es una representación esquemática de un dispositivo de impresión con láser que ilustra otra variante de la invención, la figura 3 es una representación esquemática de un dispositivo de impresión con láser que ilustra la invención,
- 10 - Las figuras 4A a 4D son vistas laterales que ilustran la formación o no de una gotita en función de diferentes regímenes,
- Las figuras 5A a 5D son esquemas que ilustran una gotita en diferentes instantes de su formación, la última figura 5D ilustrando el instante en el que una gotita alcanza un sustrato receptor,
- La figura 6 es un corte de un soporte dador que ilustra la proporción entre el tamaño de los elementos a imprimir y el grosor de una película de tinta biológica,
- 15 - Las figuras 7A y 7B son vistas laterales que ilustran la formación de un crecimiento en la superficie libre de una película de tinta biológica, previamente a la formación de una gotita, en el mismo instante pero producida con energías diferentes para el haz de rayos láser,
- La figura 8 es una representación esquemática de un dispositivo de impresión de acuerdo con un modo de realización de la invención que combina al menos una cabeza de impresión de tipo láser y al menos una cabeza de impresión de tipo chorro de tinta,
- 20 - La figura 9 es una vista en perspectiva de un dispositivo de impresión de acuerdo con un modo de realización de la invención que combina una cabeza de impresión de tipo láser y varias cabezas de impresión de tipo chorro de tinta,
- La figura 10 es una vista en perspectiva de una parte de un dispositivo de impresión de la figura 9 durante una impresión con una de las cabezas de impresión de tipo chorro de tinta,
- 25 - La figura 11 es un corte de una parte de un dispositivo de impresión de la figura 9 durante una impresión con la cabeza de impresión de tipo láser,
- La figura 12 es una vista en perspectiva de una representación en 3 dimensiones de una parte de un tejido biológico que se busca reproducir,
- 30 - La figura 13 es una vista en perspectiva de un corte de la representación de la figura 12,
- La figura 14 es una vista desde la parte superior del corte de la figura 13 que ilustra la colocación de las gotitas de tintas biológicas.

En la figura 3, se ha representado un dispositivo de impresión 50 para preparar al menos un tejido biológico montando capa a capa, de acuerdo con una disposición definida previamente, diferentes componentes tales como por ejemplo una matriz extracelular y diferentes morfógenos. Por lo tanto, el dispositivo de impresión 50 permite depositar capa a capa gotitas 52 de al menos una tinta biológica 54 sobre una superficie de deposición 56 que corresponde a la superficie de un sustrato receptor 58 para la primera capa o para la última capa depositada sobre dicho sustrato receptor 58 para las capas siguientes.

40 Con un objeto de simplificar la representación, la superficie de deposición 56 corresponde a la superficie del sustrato receptor 58 en la figura 3.

45 De acuerdo con un modo de realización en la figura 6, la tinta biológica 54 comprende una matriz 60, por ejemplo un medio acuoso, en la que están presentes los elementos 62, por ejemplo celular o agregados de células, a imprimir en la superficie de deposición 56.

Según los casos, una tinta biológica 54 comprende en la matriz 60 un solo tipo de elementos a imprimir 62 o varios tipos de elementos a imprimir 62. Por el contrario, la tinta biológica 54 puede no comprender más que un solo componente.

50 Por tinta biológica, se hace referencia de acuerdo con la presente solicitud de patente a un material biológico o biomaterial. A modo de ejemplo, la tinta biológica comprende solamente una matriz extracelular (por ejemplo colágeno), una matriz extracelular et y elementos tales como células o agregados de células, un medio acuoso que contiene elementos tales como células o agregados de células.

La tinta biológica 54 ya no se describe más porque puede tener diferentes naturalezas y características reológicas diferentes de una tinta con respecto a la otra.

60 Este dispositivo de impresión comprende una fuente de láser 64 configurada para emitir un haz de rayos láser 66 que se caracteriza entre otras cosas por su longitud de onda, su frecuencia, su energía, su diámetro, su duración de impulsión. De preferencia, la fuente de láser 64 se puede configurar con el fin de ajustar al menos una característica del haz de rayos láser, en particular su energía.

65 Para poder formar gotitas disociadas las unas de las otras, la fuente de láser 64 es una fuente pulsada. Para proporcionar un orden de magnitud, es posible expulsar 10000 gotitas por segundo.

A modo de ejemplo, la fuente de láser 64 es una fuente de láser con una longitud de onda de 1064 nm.

Además, de la fuente de láser, el dispositivo de impresión 50 comprende un sistema óptico 68 que permite una regulación de la focalización de acuerdo con un eje Z perpendicular a la superficie de deposición 56. De forma ventajosa con el sistema óptico 68 comprende una lente que permite focalizar en haz de rayos láser 66 sobre una zona impactada. De preferencia, el sistema óptico 68 comprende un espejo para modificar la posición de la zona impactada. Por lo tanto, el sistema óptico 68 permite modificar la zona impactada por el haz de rayos láser en un plano de impacto denominado Pi en la figura 3.

La fuente de láser 64 y el sistema óptico 68 no se describen más porque el experto en la materia los conoce y pueden ser idénticos a los de la técnica anterior.

El dispositivo de impresión 50 también comprende al menos un soporte dador 70 que comprende de acuerdo con un modo de realización una capa absorbente 72 a la longitud de onda del haz de rayos láser 66 sobre la que se coloca una película 74 de al menos una tinta biológica.

En lo sucesivo en la descripción, por película se hace referencia a que la tinta biológica ocupa un volumen con un grosor (dimensión de acuerdo a la dirección perpendicular al plano de impacto Pi) inferior a $500 \mu\text{m}$.

A diferencia de un depósito, el hecho de que la tinta biológica se prepare en forma de una película permite evitar los fenómenos de deposición.

La capa absorbente 72 se prepara con material adecuado para la longitud de onda del haz de rayos láser 66 para transformar la energía luminosa en un calentamiento puntual de la capa absorbente 72.

De preferencia, el soporte dador 70 se coloca con el fin de que el sistema óptico focalice en haz de rayos láser al nivel de la capa absorbente 72.

De acuerdo con un modo de realización, la capa absorbente 72 es de oro, de titanio, o cualquier otro en función de la longitud de onda del haz de rayos láser 66.

De acuerdo con otro modo de realización, el soporte dador 70 no comprende capa absorbente 72. En este caso, la tinta absorbe la energía del haz de rayos láser 66.

De preferencia, el soporte dador 70 comprende una lámina 76 de un material transparente a la longitud de onda del haz de rayos láser 66 que comprende sobre una de sus caras un revestimiento que corresponde a la capa absorbente 72. La presencia de la lámina 76 proporciona una rigidez al soporte dador 70 que permite manipularlo y conservar la tinta y/o la capa absorbente 72 ligeramente plana en el plano de impacto Pi.

La película 74 de tinta biológica comprende una superficie libre 78 que está separada de la capa absorbente 72 por una distancia E que corresponde al grosor de la película 74 y que está separada de la superficie de deposición 56 por una distancia L. La superficie libre 78 y la superficie de deposición 56 están enfrentadas. Como se ilustra en la figura 3, el haz de rayos láser 66 es adecuado para producir una calidad 80 en la superficie de contacto entre la capa absorbente y la película 74 de tinta biológica que genera una gotita 82 que se desprende de la superficie libre 78 para desplazarse hacia la superficie de deposición 56.

En lo sucesivo en la descripción, una dirección vertical es paralela a la fuerza gravitacional G y el sentido de arriba-abajo corresponde al sentido de la fuerza gravitacional G.

La dirección del haz de rayos láser 66 y la dirección del movimiento de la gotita son paralelas a la dirección vertical.

Disparo hacia la parte superior:

De acuerdo con una característica de la invención, el haz de rayos láser 66 y por lo tanto el movimiento de la gotita 82 se orientan a contrasentido con respecto a la fuerza gravitacional G. Por lo tanto, la superficie libre 78 de la película 74 de tinta biológica se orienta hacia la parte superior. Durante el movimiento de la película 74 de tinta biológica hacia la superficie de deposición 56, la gotita 82 se desplaza hacia la parte superior, de acuerdo con el sentido abajo-arriba.

Esta configuración proporciona las siguientes ventajas:

- Limita la aparición de fenómenos de deposición, la tinta biológica un estando en forma de una película,
- Permite obtener un grosor E para la película 74 de tinta biológica ligeramente constante, la influencia de la fuerza gravitacional G sobre la forma de la superficie libre 78 de la película 74 estando limitada por el hecho de que la superficie libre 78 se orienta hacia la parte superior,
- Permite utilizar una gran gama de tinta biológica cuando una capa absorbente 72 independiente de la película 74

de tinta biológica se utiliza para transformar la energía luminosa en un calentamiento puntual.

Energía cinética casi nula en el instante de la deposición de una gotita sobre el sustrato receptor:

- 5 La formación de una gotita 82 a partir de una película de tinta biológica dependerá de numerosos parámetros, esencialmente características de la tinta biológica, características del haz de rayos láser y condiciones de realización. En las figuras 4A a 4D, se ha representado la evolución en el tiempo de la deformación de la superficie libre de la película de tinta biológica, que conduce o no a la formación de una gotita, para diferentes valores de energía del haz de rayos láser 66, este último teniendo una energía de 21 uJ para la figura 4A, de 35 μJ para la
10 figura 4B, de 40 uJ para la figura 4C y 43 uJ para la figura 4D.

Para la misma tinta biológica en las mismas condiciones de realización, se observa que existen varios regímenes función de la energía del haz de rayos láser.

- 15 Como se ilustra en la figura 4A, si la energía del haz de rayos láser es inferior a un umbral inferior, la gotita no se desprende de la película 74 de tinta biológica. La altura máxima de la deformación 84 generada a nivel de la superficie libre 78 de la película 74 de la tinta siendo inferior a la distancia L que separa la película 74 et la superficie de deposición 56 ningún elemento se imprime. De acuerdo con el ejemplo elegido, el umbral inferior está comprendido entre 21 μJ y 35 uJ. Como se ilustra en la figura 4D, si la energía del haz de rayos láser es superior a
20 un umbral superior, la burbuja de gas 80 producida en el interior de la película estalla a nivel de la superficie libre provocando la proyección incontrolada de microgotitas. De acuerdo con el ejemplo elegido, el umbral superior está comprendido 40 uJ y 43 μJ .

- Entre los umbrales inferior y superior, como se ilustra en las figuras 4B y 4C, se está en presencia de un régimen
25 que permite la formación de un chorro. Si la distancia L que separa la película 74 y la superficie de deposición 56 es suficiente con este régimen permite la formación de una gotita. De preferencia, la distancia L es del orden de 1 a 2 mm para permitir la formación de una gotita y no de un chorro continuo que se extiende desde la película hasta la superficie de deposición. Esta configuración limita los riesgos de contaminación del tejido biológico preparado con la tinta biológica.

- 30 De acuerdo con otra característica de la invención, para la misma tinta biológica y en las mismas condiciones de realización con la distancia L que separa la película 74 de tinta biológica y la superficie de deposición 56 y/o la energía del haz de rayos láser 66 se ajustan con el fin de que la energía cinética de la gotita sea casi nula cuando la gotita 82 toca la superficie de deposición 56, como se ilustra en la figura 5D. Esta configuración limita el riesgo de
35 deterioro de los elementos a imprimir que son células.

- Por casi nulo, se hace referencia a que la energía cinética es nula o muy ligeramente positiva para permitir que la gotita se fije sobre la superficie de deposición 56. Esta circunstancia se hace posible por el hecho de que la gotita 82 se desplaza a contrasentido con respecto a la fuerza gravitacional G.

- 40 De preferencia, la distancia L que separa la película 74 de tinta biológica y la superficie de deposición 56 es fija. En consecuencia, la energía del haz de rayos láser 66 se ajusta con el fin de que la energía cinética de la gotita sea casi nula cuando la gotita 82 toca la superficie de deposición 56.

45 Técnica de calibración:

Como se ha indicado anteriormente, la formación de la gotita no está relacionada únicamente con la energía del haz de rayos láser. También está relacionada con la naturaleza de la tinta biológica en particular su viscosidad, su tensión superficial y las condiciones de realización.

- 50 En las figuras 5A a 5D, 7A a 7D, se ha ilustrado un método de calibración que permiten determinar la energía del haz de rayos láser para obtener un régimen óptimo con respecto a la formación y la deposición de las gotitas, en particular un régimen que conduce a una deposición con velocidad nula a una distancia L dada.

- 55 En las figuras 5A a 5D, se han representado ciertas etapas de formación de una gotita 82 entre el instante del impacto del haz de rayos láser que se ilustra en la figura 5A y la deposición de la gotita 82 sobre la superficie de deposición 56.

- 60 De acuerdo con una característica de la invención, le método de calibración que permite ajustar la energía del láser comprende las etapas que consisten en medio un ángulo máximo Θ de una deformación 86 de la superficie libre 78 de la película 74 de la tinta biológica en un instante T1 fijo después del impacto del haz de rayos láser 66 y para ajustar la energía del haz de rayos láser 66 en función del valor medido del ángulo máximo Θ .

Como se ilustra en las figuras 5B, 7A y 7B, la de formación 86 tiene una forma simétrica con respecto a este medio

Am paralelo a la dirección vertical. Esta deformación 86 comprende un vértice S centrado con respecto al eje medio Am. Este vértice S corresponde a la zona de la deformación 86 más alejada del resto de la superficie libre 78 de la película 74.

- 5 En un plano que contiene el eje medio Am, el vértice S se prolonga mediante una primera pendiente 88 desde un lado del eje medio Am y mediante la segunda pendiente 88' por el otro lado del eje medio Am, las dos pendientes 88, 88' siendo simétricas con respecto al eje medio Am.

- 10 Cada pendiente 88, 88' comprende un punto de inflexión. La primera pendiente 88 comprende a nivel de su punto de inflexión una primera tangente Tg1 y la segunda pendiente 88' comprende a nivel de su punto de inflexión la segunda tangente Tg2, las dos tangentes Tg1 y Tg2 siendo secantes en un punto del eje medio Am.

El ángulo máximo Θ corresponde al ángulo formado por las tangentes Tg1 y Tg2 y está orientado hacia la película 74 (es decir hacia la parte baja).

- 15 Para obtener la formación de una gotita, el ángulo máximo Θ debe ser inferior o igual a un primer umbral Θ_1 .

- 20 Por lo tanto, como se ilustra en la figura 7A, si el ángulo máximo Θ es superior al primer umbral Θ_1 , la energía del haz de rayos láser no es suficiente para generar una gotita. Por el contrario, como se ilustra en la figura 7B, si el ángulo máximo Θ inferior al primer umbral Θ_1 , la energía del haz de rayos láser es suficiente como para generar una gotita.

- 25 Para obtener una energía cinética casi nula en el momento en el que la gotita formada alcanza la superficie de deposición 56 colocada a una distancia L de la superficie libre 78 de la película 74, el ángulo máximo Θ debe ser superior o igual a un segundo umbral Θ_2 .

- 30 De preferencia, el valor del ángulo máximo Θ se determina gracias a una captura en el instante T1 de la de formación 86. De acuerdo con un modo de realización, la captura se realiza gracias a una cámara cuyo eje de dirección es perpendicular a la dirección vertical.

El instante T1 es función del grosor de la película y varía muy poco de una tinta con respecto a la otra. De forma ventajosa, el instante T1 es del orden de $4 \text{ a } 5 \mu\text{s}$ a contar desde el momento del impacto del haz de rayos láser para un grosor E de película del orden de $40 \text{ a } 50 \mu\text{m}$. Este instante T1 corresponde a la figura 5B.

- 35 El primer umbral Θ_1 es aproximadamente igual a 105° . Por lo tanto, si en el instante T1 el ángulo máximo Θ es inferior o igual a 105° , la energía del haz de rayos láser es suficiente para generar una gotita 82.

El segundo umbral Θ_2 es función de la distancia L entre la superficie de deposición 56 y la superficie libre 78 de la película 74 de la tinta. El segundo umbral Θ_2 es inversamente proporcional a la distancia L.

- 40 El segundo umbral Θ_2 es elevado e igual a aproximadamente 80° para una distancia L baja del orden de 1 mm. La elección de una distancia L relativamente baja será preferente para reducir las limitaciones en el chorro y en el momento del contacto de las gotitas con la superficie de deposición. El segundo umbral Θ_2 es bajo el igual a Aproximadamente 50° para una distancia L importante del orden de 10 mm. La elección de una distancia L relativamente importante será preferente si se desea imprimir a larga distancia por ejemplo si el soporte dador 70 tiene dimensiones más importantes que las de los pocillos en el fondo del cual se coloca la superficie de deposición 56.

- 50 Esta técnica de calibración de la energía del haz de rayos láser permite optimizar la velocidad del chorro reduciéndolo para limitar los riesgos de deterioro de los elementos contenidos en la tinta biológica en particular en el momento de la deposición sobre la superficie de deposición 56.

Grosor de la película de tinta:

- 55 De preferencia, la tinta biológica comprende una gran concentración de elementos a imprimir 62 con el fin de obtener un tejido biológico con una gran concentración de células. En este caso, como se ilustra en la figura 3, la gotita 82 comprende una fracción de volumen de elementos a imprimir 62 elevada.

Para las tintas biológicas con gran concentración, el grosor E de la película 74 es del orden de $40 \text{ a } 60 \mu\text{m}$.

- 60 De forma ventajosa, para mejorar la precisión de la deposición de los elementos a imprimir, la película 74 de tinta biológica tiene un grosor E comprendido entre $1,5D$ y $2D$, D siendo el diámetro de los elementos a imprimir 62 que tienen una forma aproximadamente esférica o el diámetro de una esfera en la que se registra un elemento a imprimir 62.

De acuerdo con un modo de realización, la película 74 de tinta biológica tiene un grosor E superior o igual a $20 \mu\text{m}$.

para los elementos más pequeños a imprimir que tienen un diámetro del orden de 10 a 15 μm . El grosor E de la película puede ser del orden de 400 μm cuando los elementos a imprimir 62 son agregados de células.

Generalmente con el grosor E de la película es inferior a 100 μm cuando los elementos a imprimir 62 son de Células unitarias.

De preferencia, la película 74 se caracteriza por una proporción (dimensión de la superficie libre 78)/(grosor de la película 74) superior o igual a 10, y de forma ventajosa superior o igual a 20. La dimensión de la superficie libre 78 corresponde la dimensión más grande de la superficie libre 78 de la película 74 tomada desde un plano paralelo al plano de impacto Pi.

Técnica de impresión combinando una cabeza de impresión de tipo láser y una cabeza de impresión con boquilla:

De acuerdo con otra característica de la invención, el método de impresión utiliza al menos una cabeza de impresión de tipo láser para al menos una primera tinta biológica y al menos una cabeza de impresión con boquilla Para al menos una segunda tinta biológica.

Esta combinación permite aumentar el rendimiento de fabricación.

Por cabeza de impresión con boquilla, se hace referencia a una cabeza de impresión que comprende un orificio a través del cual pasa la segunda tinta biológica. Por lo tanto, una cabeza de impresión con boquilla puede ser una cabeza de impresión de tipo chorro de tinta, una cabeza de impresión con microválvulas, una cabeza de impresión de tipo bioextrusión.

De preferencia, cada cabeza de impresión de tipo láser es idéntica a la que se describe en la figura 3. Sin embargo, la invención no se limita a esta cabeza de impresión de tipo láser. Por lo tanto, se puede prever la utilización de las cabezas de impresión de tipo láser que se describen en las figuras 1 y 2 o de otras.

Las cabezas de impresión con boquilla no se describen más ya que son de preferencia idénticas a las de la técnica anterior.

En el caso de un tejido biológico que comprende células distintas separadas por materiales extracelulares, los materiales extracelulares se depositan de preferencia mediante la o las cabeza(s) de impresión con boquilla y las células se depositan de preferencia mediante la o las cabeza(s) de impresión de tipo láser.

Al ser los materiales extracelulares menos sensibles a los efectos de cizallamiento, es posible depositarlos con una cabeza de impresión con boquilla. Los cartuchos de tinta biológica destinados a las cabezas de impresión con boquilla que tienen un volumen muy claramente superior al volumen de la tinta (del orden de 40 μl) soportado mediante un soporte dador 70 destinado a una cabeza de impresión de tipo láser, es posible depositar los materiales de la matriz extracelular con un caudal importante. Incluso si una cabeza de impresión con boquilla es capaz de depositar las cintas con un caudal importante, cada soporte dador destinado a una cabeza de impresión de tipo láser que soporta un volumen muy bajo de tinta, es necesario cambiarlos frecuentemente lo que tiende a aumentar el tiempo de deposición con respecto a una cabeza de impresión con boquilla.

De acuerdo con otra característica, la o las cabeza(s) de impresión de tipo láser y la o las cabeza(s) de impresión con boquilla están integradas en una misma máquina y se desplazan en el mismo sistema de referencia. Esta configuración permite simplificar la colocación relativa de las diferentes cabezas de impresión, mejorar la precisión de posición y garantizar la integridad de los elementos impresos.

Dispositivo de impresión que comprende un recinto de apilamiento de soportes dadores: En las figuras 8 a 11, se ha representado un dispositivo de impresión de acuerdo con un modo de realización de la invención.

Este dispositivo de impresión comprende un armazón 100 que soporta una cabeza de impresión 102 de tipo láser y varias cabezas de impresión 104, 104', 104" de tipo chorro de tinta. Este armazón 100 comprende un punto de referencia X,Y,Z, el eje Z estando orientados de acuerdo con la dirección vertical, el plano X,Y correspondiendo a un plan horizontal.

Las cabezas de impresión 102, 104, 104', 104" se fijan con respecto al armazón 100 y se colocan con el fin de que las gotitas sean emitidas de forma vertical, hacia la parte superior.

Las cabezas de impresión 102, 104, 104', 104" se desplazan de acuerdo con una primera dirección paralela al eje Y. De acuerdo con un modo de realización, las cabezas de impresión 104, 104', 104" de tipo chorro de tinta se acoplan las unas contra las otras. La cabeza de impresión 102 de tipo láser se separa de las cabezas de impresión 104, 104', 104" de tipo chorro.

El dispositivo de impresión también comprende un bastidor móvil 106, un sistema de guía y del desplazamiento del bastidor móvil 106 con respecto al armazón 100 de acuerdo con tres direcciones paralelas a los ejes X,Y,Z y un sistema de control que permite controlar los desplazamientos del bastidor móvil 106. El sistema de guía y de desplazamiento y el sistema de control se eligen con el fin de conseguir una precisión micrométrica que se refieren a los desplazamientos del bastidor móvil 106 con respecto al armazón.

Como se ilustra en la figura 10, el bastidor móvil 106 comprende un cuadro 108 que permite fijar de manera amóvil al menos un sustrato receptor 58. Cuando se asegura al bastidor móvil, los desplazamientos del sustrato receptor 58 se controlan con una precisión micrométrica.

La cabeza de impresión 102 de tipo láser comprende un cuerpo hueco cilíndrico 110, fijo con respecto al armazón, que contiene una parte de un sistema óptico y está rematado por una parte tubular 112 que comprende un extremo superior 114 colocado que sale a un plano horizontal. Estos elementos están configurados con el fin de que un haz de rayos láser guiado por el sistema óptico el barrido de la sección del extremo superior 114.

Cada soporte dador 70 tiene la forma de un disco colocado sobre una base de pedestal 116. De acuerdo con un modo de realización ilustrado en la figura 11, cada base de pedestal 116 tiene la forma de un tubo que comprende a nivel de su borde superior un receso 118 que tiene un diámetro idéntico al de un soporte dador 70 y una altura suficiente para mantenerlo. Por lo tanto, este receso 118 permite colocar un soporte dador 70 con respecto a la base de pedestal que lo recibe.

El extremo superior 114 y la base de pedestal 116 tienen formas que colaboran entre ellas con el fin de que la base de pedestal 116 que de inmovilizada de acuerdo con una posición dada con respecto al extremo superior 114 y por lo tanto con respecto al punto de referencia X,Y,Z del armazón. De acuerdo con un modo de realización, la base de pedestal 116 comprende una brida 120 exterior que se apoya contra el extremo superior 114 y permite colocar la base de pedestal de acuerdo con el eje Z. Por debajo de la brida 120, la base de pedestal 116 comprende una superficie troncocónica 122 que colabora con una parte troncocónica prevista en el interior de la parte tubular 112. Estas formas permiten centrar la base de pedestal 116 con respecto a la parte tubular 112 y colocarla en un plano XY. De preferencia, es posible utilizar materiales magnéticos para mejorar la colocación de la base de pedestal 116 con respecto a la parte tubular 112.

De forma ventajosa, el dispositivo de impresión comprende un recinto 124 configurado para apilar al menos una base de pedestal 116. Este recinto 124 comprende al menos una abertura 125 que permite hacer entrar y salir la o las bases de pedestal 116 apiladas. De acuerdo con un modo de realización, este recinto 124 tiene una forma de paralelepípedo.

De preferencia, el recinto 124 tiene dimensiones adecuadas para poder apilar varias bases. Por lo tanto, el dispositivo de impresión puede imprimir de forma sucesiva varias tintas biológicas con la misma cabeza de impresión 102 de tipo láser.

Las bases de pedestal 116 se apilan sobre un núcleo 126 que comprende compartimentos 128, un compartimento para cada base de pedestal 116. El núcleo 126 tiene una forma alargada y comprende sobre su longitud las muescas 128 en U. De acuerdo con una primera variante ilustrada en la figura 8, la longitud del núcleo 126 se orienta de acuerdo con el eje Y.

De acuerdo con una segunda variante preferente, la longitud del núcleo 126 se orienta de acuerdo con el eje X y las muescas 128 se abren en dirección de las cabezas de impresión.

De forma ventajosa, el recinto 124 comprende sobre una primera cara orientada hacia las cabezas de impresión una primera abertura 125 que permite hacer salir las bases de pedestal 116 y sobre otra cara a una segunda abertura 125' que permite introducir las bases de pedestal 116. De acuerdo con un modo de realización, el recinto 124 comprende un sistema de guía para colocar el núcleo 126, por ejemplo un rail, el núcleo 126 comprendiendo en la parte inferior una ranura cuya sección colabora con la del rail. Este rail desembocaba a nivel de la segunda abertura 125'. De preferencia se orienta de acuerdo con el eje X.

El recinto 124 comprende medios de confinamiento para conservar en el interior del recinto una atmósfera adecuada para las tintas biológicas, en particular en temperatura y/o en higrometría. Estos medios de confinamiento se prevén en particular a nivel de cada abertura 125, 125'. Pueden tomar la forma de una barrera o de una cortina de aire. Como complemento para el recinto, el dispositivo de impresión comprende una pinza móvil 130 para desplazar las bases entre el recinto 124 y la cabeza de impresión 102 de tipo láser. De acuerdo con una primera variante, la pinza móvil 130 se acopla a un carro móvil 132, independiente del bastidor móvil 106, que se configura para que se desplace de acuerdo con las direcciones X, Y, Z.

De acuerdo con otra variante, la pinza móvil 130 se acopla al bastidor móvil 106.

De acuerdo con un modo de realización, el dispositivo de impresión comprende un aparato de captura (no

representado) cuyo eje de mira es perpendicular a la dirección vertical y se orienta a nivel de la superficie superior del soporte dador. Este aparato se puede utilizar para calibrar la energía del haz de rayos láser de la cabeza de impresión 102 de tipo láser.

5 Método de preparación de un tejido biológico mediante bioimpresión:

La primera etapa de dicho método consiste en generar una representación numérica en tres dimensiones del tejido biológico a imprimir.

10 En la figura 12, se ha representado en 140 una parte de una representación de ese tipo en forma de un cubo que comprende una primera zona de volumen 142 colocar en el interior de una segunda zona de volumen 144 la misma colocada en una tercera zona de volumen 146. Para las necesidades de la descripción, la representación 140 se simplifica en gran medida.

15 Cada zona de volumen 142, 144, 146 está coloreada o con textura de forma diferente, cada color o textura correspondiendo a un conjunto de características entre las siguientes características (no limitadas) material, medio de fabricación, trayectoria,...

De preferencia, cada color o textura corresponde a una tinta biológica.

20 Todas las zonas de volumen 142, 144 y 146 están cerradas. De forma ventajosa, la representación comprende una pluralidad de pequeños volúmenes elementales que tienen colores y texturas diferentes en función de la zona de volumen a la que pertenecen. De acuerdo con un modo de realización, la representación 140 se obtiene a partir de un fichero informático de tipo PLY.

25 La segunda etapa del método consiste en hacer cortes de la representación 140 en una sucesión de capas superpuestas de acuerdo con un eje Z. En la figura 13, se ha aislado una capa 148 de la representación 140.

30 Durante la preparación de los cortes de la representación 140, a la derecha de un cambio de zona de volumen, cada capa comprende una arista que corresponde a un cambio de zona.

35 Como se ilustra en la figura 13, la capa 148 comprende una primera zona 142' que corresponde a la primera zona de volumen 142, una segunda zona 144' que corresponde a la segunda zona de volumen 144 y una tercera zona 146' que corresponde a la tercera zona de volumen 146. Para cada capa, las zonas 142', 144', 146' están coloreadas o con texturas en función del color o textura de las zonas de volumen 142, 144, 146.

Cada capa tiene un grosor ϵ que se determina en función de la altura de las gotitas impresas.

40 Si la capa no comprende más que un solo material a imprimir, la capa tiene un grosor ligeramente igual a la altura de una gotita.

45 Cuando la capa comprende varios materiales a imprimir, que puedo con una primera variante, la capa tiene un grosor igual al múltiplo común más pequeño de las alturas de las gotitas asociadas a cada material. Esta variante tiene como ventaja minimizar la diferencia con respecto a cualquier altura del objeto a imprimir y conducir a una impresión rápida.

50 De acuerdo con una segunda variante, la capa tiene un grosor igual al divisor común más grande de las alturas de las gotitas asociadas a cada material. Esta variante tiene como ventaja aumentar la resolución y el número de capas.

55 A modo de ejemplo, si el primer material se imprime mediante bio-impresión con láser, las gotitas impresas Tienen una altura del orden de $10 \mu\text{m}$. Si el segundo material se imprime mediante bio-impresión mediante microválvulas, las gotitas impresas tienen una altura del orden de $100 \mu\text{m}$. De acuerdo con la primera variante, las capas tienen un grosor del orden de $100 \mu\text{m}$. De acuerdo con la segunda variante, las capas tienen un grosor del orden de $10 \mu\text{m}$.

De preferencia, cada capa comprende una pluralidad de pequeños polígonos elementales por ejemplo triangulares que tienen colores diferentes en función de la zona a la que pertenecen.

60 Por lo tanto, el objeto a imprimir corresponde a un conjunto de capas que comprenden cada una un conjunto de polígonos que tienen cada uno un color o una textura asociados.

65 Una tercera etapa del método consiste en determinar para cada capa la posición de las gotitas a imprimir de cada tinta biológica en función de las zonas 142', 144', 146' coloreadas o con texturas y del volumen previsto de cada una de las gotitas. En este sentido, cada zona 142', 144', 146' de cada capa se ocupa con elipses 142'', 144'', 146'' cuyas dimensiones son función de las dimensiones de las gotitas de la tinta biológica destinada a su impresión en dicha zona, como se ilustra en la figura 14.

Para cada zona, las elipses tienen las mismas dimensiones. Todas las elipses tienen ejes focales paralelos.

La forma elíptica permite poder adaptar las distancias entre las gotitas de acuerdo con dos direcciones (una primera dirección paralela a los ejes focales y una segunda dirección perpendicular a la primera).

5

El centro de cada elipse corresponde a la posición del centro de una gotita.

La colocación de las elipses se hace zona a zona, por orden decreciente de tamaños. Por lo tanto, las elipses más grandes colocadas en la zona 146' se colocan en primer lugar y las elipses más pequeñas colocadas en la zona 142' se colocan al final.

10

De preferencia, a nivel de un cambio de zona, la optimización de la colocación se realiza de acuerdo con dos criterios:

- 15
- proporción máxima de polígonos elementales que tienen buen color o textura en el seno de una elipse, del orden de un 75 % por ejemplo,
 - proporción mínima de polígonos elementales que tienen mal color o textura en el seno de una elipse, del orden de un 5 % por ejemplo.

20

Las superposiciones entre elipses se pueden tolerar.

Una cuarta etapa del método consiste en sincronizar el desplazamiento de la superficie de deposición 56 sobre la que las gotitas de tinta biológica se imprimen en las diferentes cabezas de impresión.

25

Para una bio-impresión con láser, la zona de focalización del láser es el centro de cada elipse impresa con láser, y cada elipse forma el objeto de una fuente de láser. En este caso, la superficie de deposición es fija, es en la serie que hace el barrido de toda la superficie de deposición. Para una superficie de deposición más grande que el soporte dador, es posible desplazar también el sustrato (sobre el que regresan las superficies de deposición) de manera sincronizada con el barrido del láser.

30

Para una bio-impresión con boquilla, el centro de cada elipse corresponde el punto de impacto supuesto de una gotita sobre la superficie de deposición 56. En este caso, la boquilla de impresiones fija, el sustrato es el que se desplaza. Sin embargo, la boquilla de impresión podría ser móvil.

35

Aplicaciones:

La bio-impresión de acuerdo con la invención se puede utilizar para producir:

- 40
- Tejidos implantables para medicina regeneradora,
 - Tejidos individualizados, preparados a partir de células del paciente, que permiten seleccionar *in vitro* los tratamientos y desarrollar soluciones terapéuticas personalizadas,
 - Modelos predictivos que reproducen la fisiología de tejidos humanos sanos o de tejidos afectados por una patología para someter a ensayo de manera predictiva la eficacia por la toxicidad de las moléculas, de ingredientes y de los candidatos a medicamentos.

45

A modo de ejemplo y de manera no limitante, el tejido biológico es un tejido óseo.

REIVINDICACIONES

1. Método de impresión de al menos una tinta biológica, dicho método utilizando al menos una cabeza de impresión (102) de tipo láser para depositar al menos una gotita (82) de al menos una tinta biológica sobre una superficie de deposición (56) de un sustrato receptor (58), **caracterizado por que** el método de impresión utiliza al menos una cabeza de impresión (104, 104', 104'') con boquilla para depositar al menos una gotita de al menos una tinta biológica sobre una superficie de deposición (56) del mismo sustrato receptor (58) que la cabeza de impresión (102) de tipo láser.
2. Método de impresión de acuerdo con la reivindicación 1, dicho método siendo utilizado para obtener un tejido biológico que comprende células y una matriz extracelular, **caracterizado por que** los materiales que constituyen la matriz extracelular se depositan mediante la o las cabeza(s) de impresión (104, 104', 104'') con boquilla y **por que** las células se depositan mediante la o las cabeza(s) de impresión (102) de tipo láser.
3. Método de preparación de un tejido biológico utilizando el método de impresión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** comprende las etapas que tienen como objeto:
 - Generar una representación (140) numérica en tres dimensiones del tejido biológico a preparar, dicha representación comprendiendo varias zonas de volumen (142, 144, 146) coloreadas o con texturas, cada color o textura estando asociados a una tinta biológica,
 - Hacer cortes de la representación (140) en una sucesión de capas (148) superpuestas, cada capa (148) comprendiendo zonas (142', 144', 146') coloreadas o con texturas que corresponden a las zonas de volumen (142, 144, 146) de la representación (140),
 - Para cada capa, determinar la posición de las gotitas a imprimir de cada tinta biológica en función de las zonas (142', 144', 146') coloreadas o con texturas y del volumen previsto de cada una de las gotitas,
 - Imprimir las diferentes gotitas.
4. Método de preparación de un tejido biológico de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** un método de impresión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 se utiliza para imprimir las diferentes gotitas.
5. Método de preparación de un tejido biológico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, **caracterizado por que** las capas (148) tienen un grosor en función de las dimensiones de las gotitas.
6. Método de preparación de un tejido biológico de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado por que** cada capa comprende un conjunto de pequeños polígonos elementales que tienen colores o texturas diferentes en función de la zona a la que pertenecen.
7. Método de preparación de un tejido biológico de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizado por que** para determinar la posición de cada gotita, cada zona (142', 144', 146') se ocupa con elipses (142'', 144'', 146'') idénticas que tienen dimensiones en función de las dimensiones de las gotitas de la tinta biológica destinada a su impresión en dicha zona, el centro de cada elipse correspondiendo a la posición del centro de una gotita.
8. Método de preparación de un tejido biológico de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** la orientación de las elipses se realiza zona a zona, por orden decreciente de tamaños.
9. Dispositivo de impresión que comprende al menos un sustrato receptor (58) con una superficie de deposición (56) y al menos una cabeza de impresión (102) de tipo láser que comprende:
 - al menos una fuente de láser (64) pulsada configurada para emitir un haz de rayos láser (66),
 - un sistema óptico (68) para focalizar y orientar dicho haz de rayos láser (66),
 - al menos un soporte dador (70) que comprende al menos una tinta biológica, **caracterizado por que** el dispositivo de impresión comprende al menos una cabeza de impresión (104, 104', 104'') con boquilla para imprimir al menos una tinta biológica sobre el mismo sustrato receptor (58) que la o las cabeza(s) de impresión (102) de tipo láser.
10. Dispositivo de impresión de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** el dispositivo de impresión comprende un recinto (124) configurado para apilar al menos un base de pedestal (116) que soporta un soporte dador (70), dicho recinto (124) estando equipado con medios de confinamiento que permiten conservar en el interior una atmósfera adecuada para las tintas biológicas.
11. Dispositivo de impresión de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** el recinto (124) tiene dimensiones adecuadas para apilar varias bases de pedestal (116) y **por que** el dispositivo de impresión comprende al menos un núcleo (126) que comprende compartimentos (128), un compartimento para cada base de pedestal (116), dicho núcleo siendo configurado para su apilamiento en el interior de dicho recinto (124).
12. Dispositivo de impresión de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** el núcleo (126) comprende

un sistema de guía para colocarlo en el recinto (124).

5 13. Dispositivo de impresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado por que** el recinto (124) comprende en una primera cara orientada hacia las cabezas de impresión una primera abertura (125) que permite la salida de las bases de pedestal (116) y sobre otra cara una segunda abertura (125') que permite introducir las bases de pedestal (116).

10 14. Dispositivo de impresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado por que** el dispositivo de impresión comprende una pinza móvil (130) para desplazar las bases de pedestal entre el recinto (124) y la cabeza de impresión de tipo láser (102).

15 15. Dispositivo de impresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 14, **caracterizado por que** el dispositivo de impresión comprende un bastidor móvil (106) que soporta al menos un sustrato receptor (58), un sistema de guía y de desplazamiento del bastidor móvil (106) con respecto a un armazón (100) de acuerdo con tres direcciones y un sistema de control que permite controlar los desplazamientos del bastidor móvil (106), dicho sistema de guía y de desplazamiento y dicho sistema de control teniendo una precisión micrométrica.

20 16. Dispositivo de impresión de acuerdo con las reivindicaciones 14 y 15, **caracterizado por que** la pinza móvil (130) está unida al bastidor móvil (106).

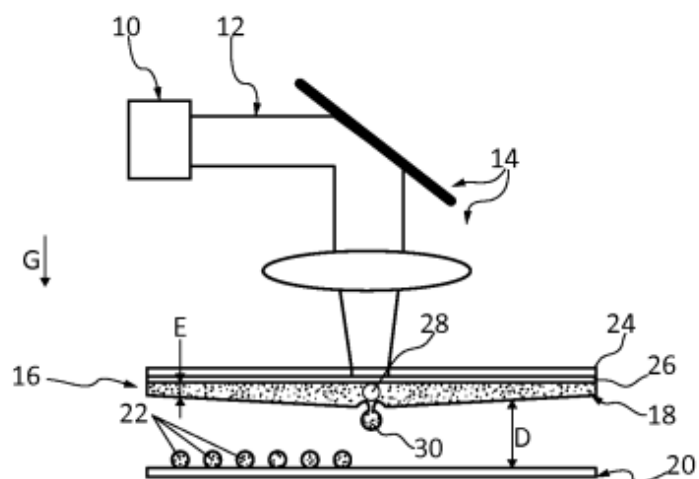


FIG. 1
Técnica anterior

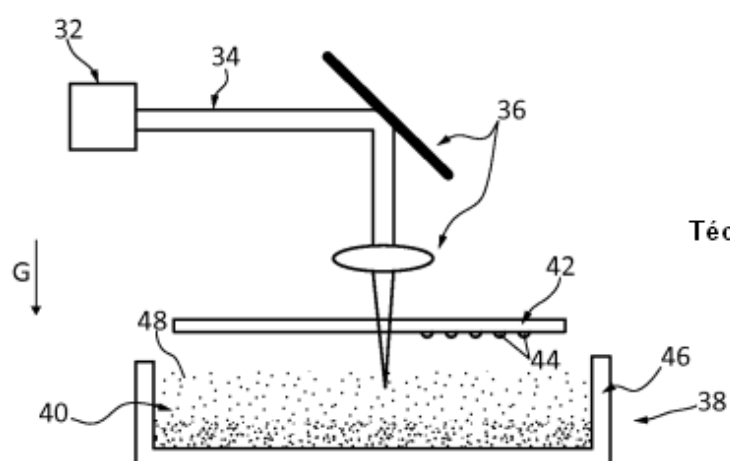


FIG. 2
Técnica anterior

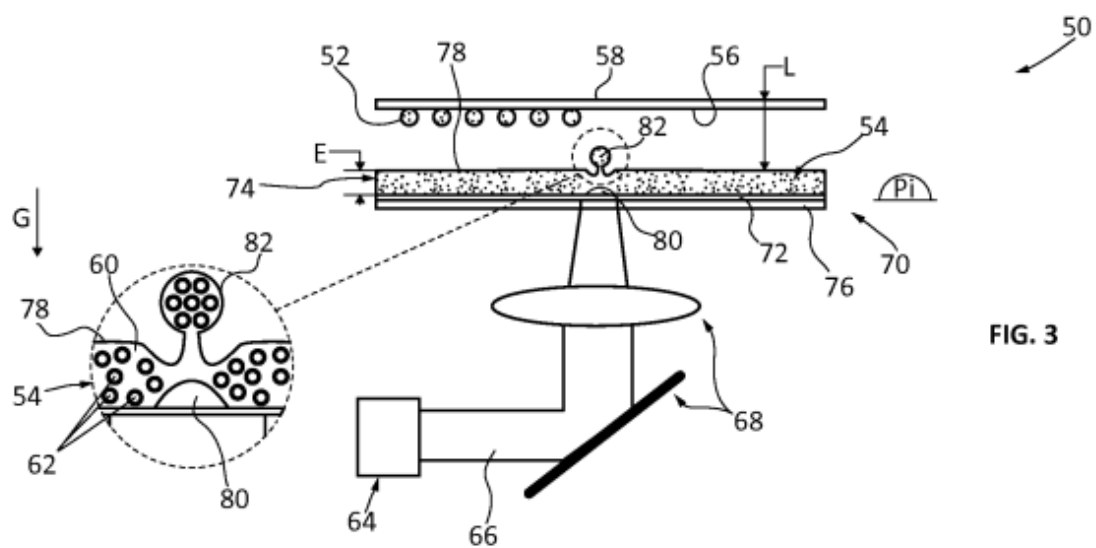
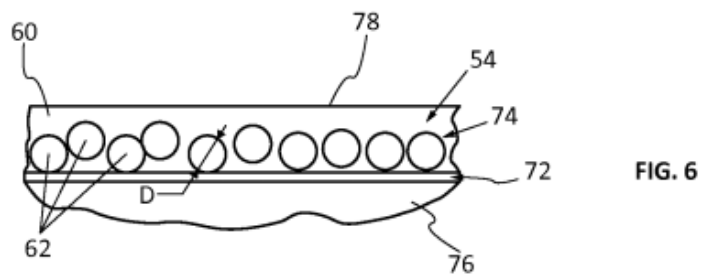
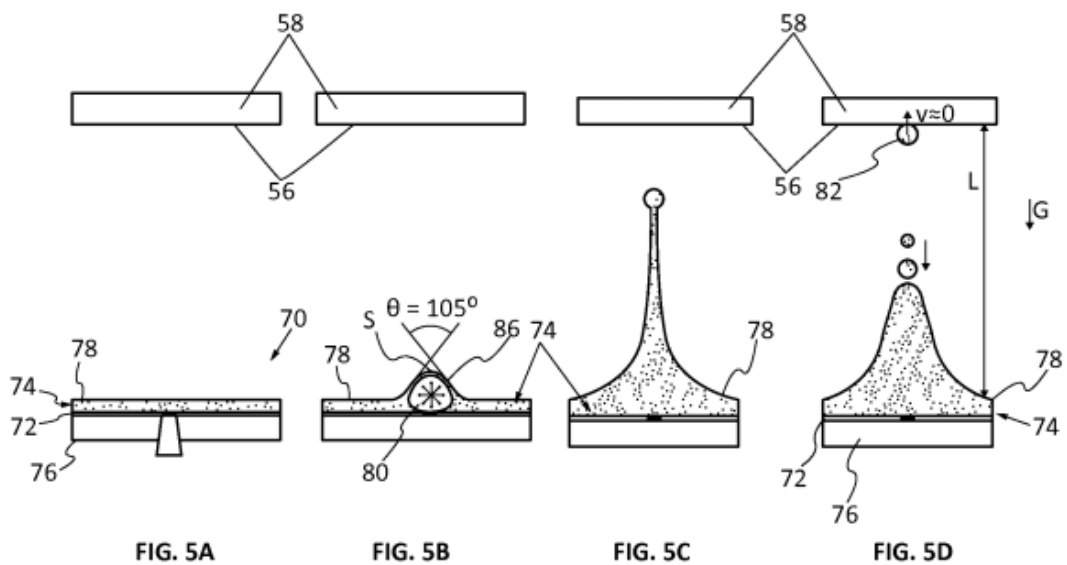
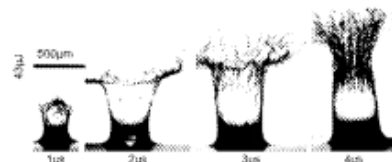
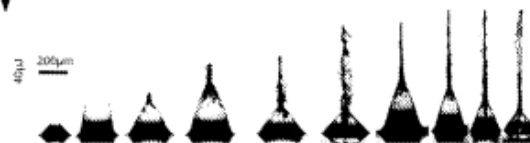
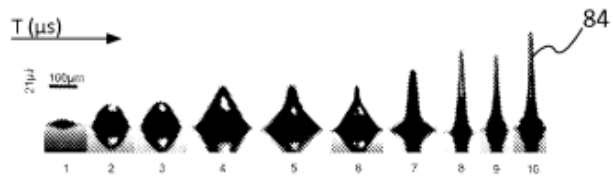
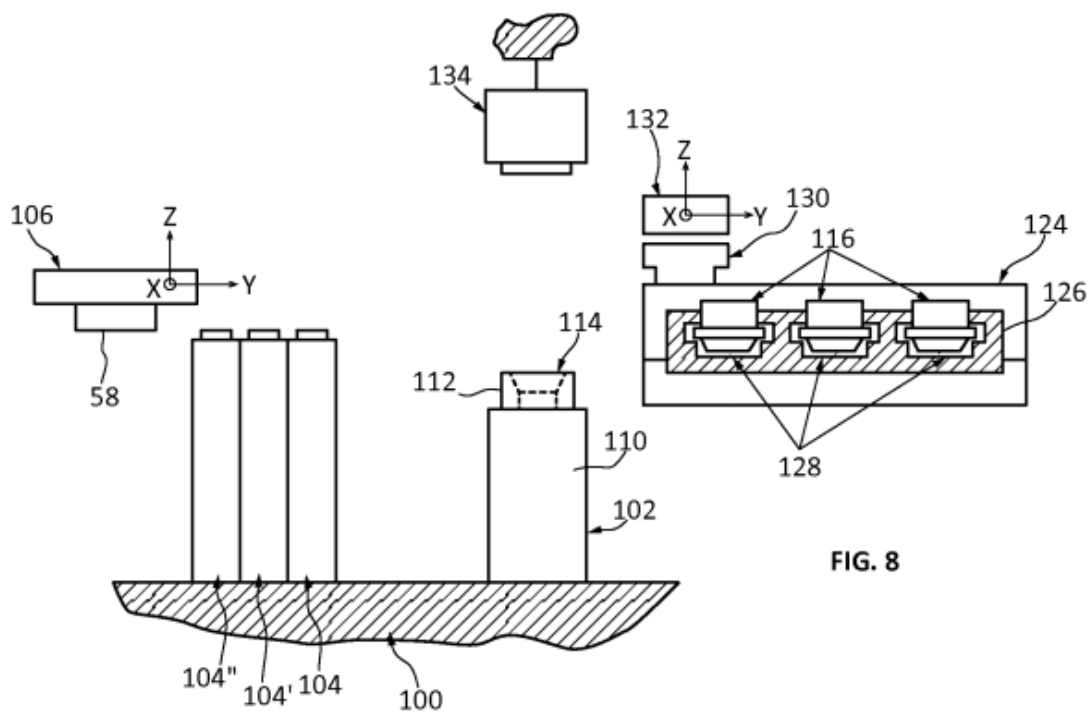
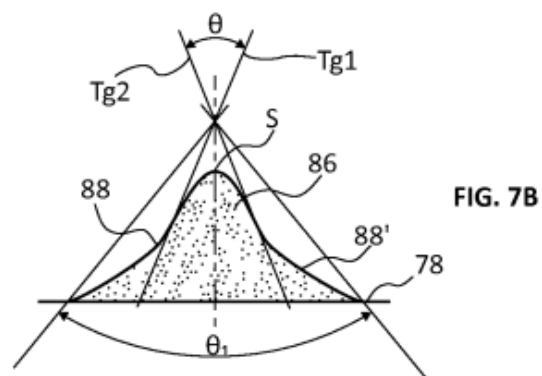
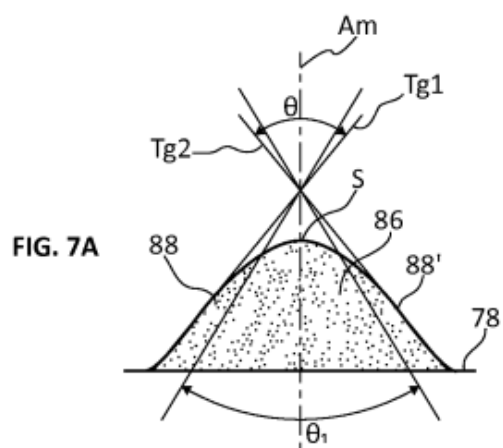
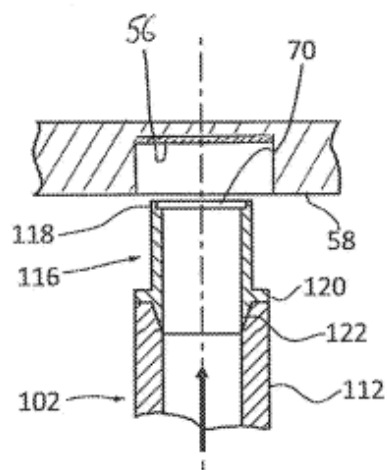
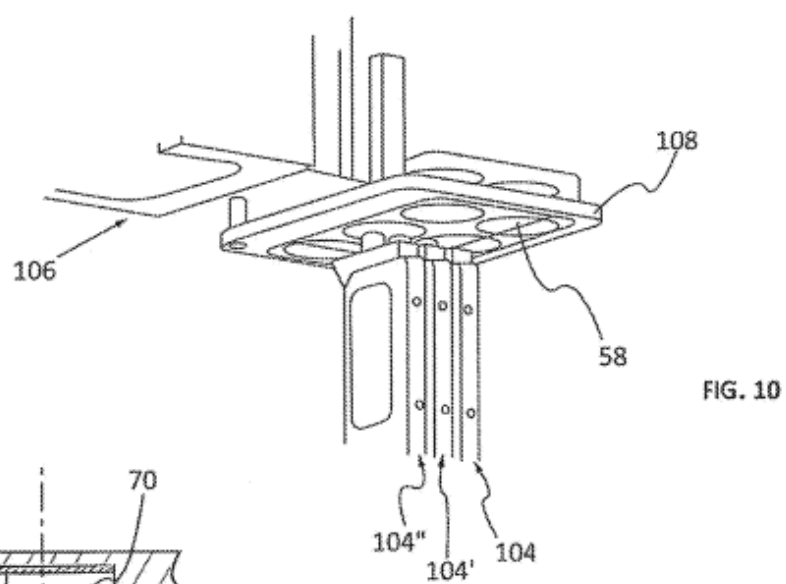
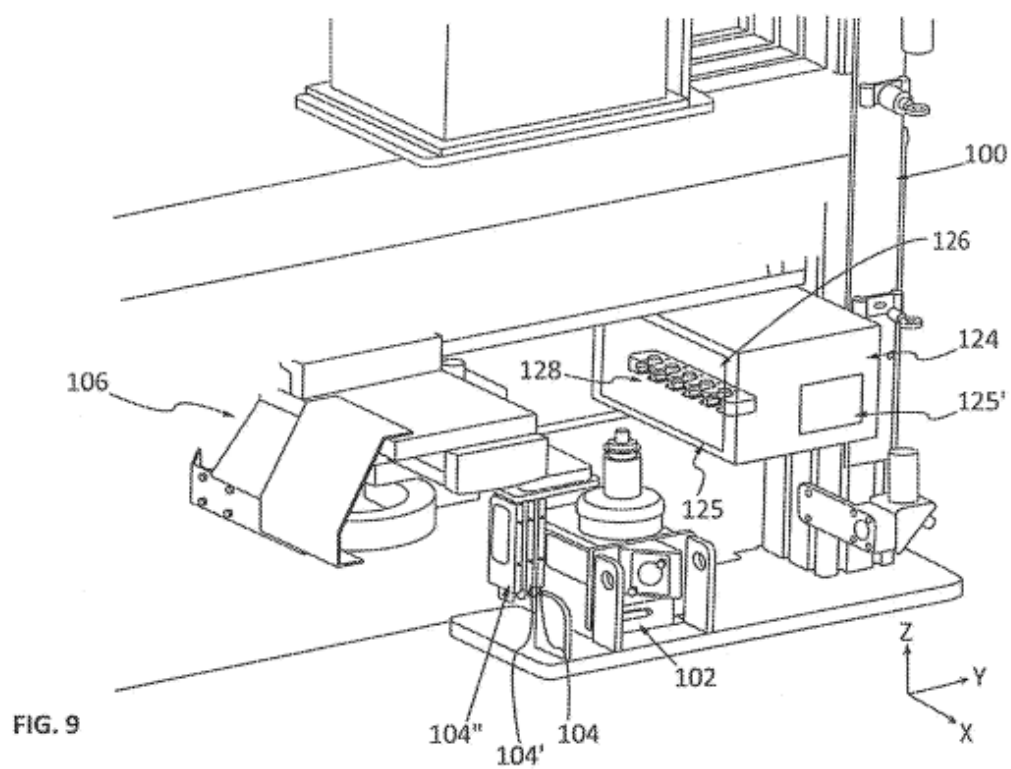


FIG. 3







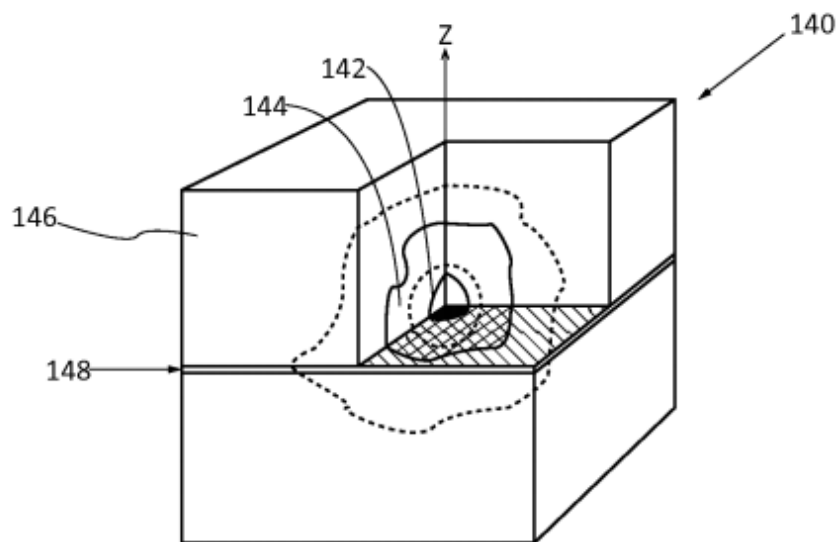


FIG. 12

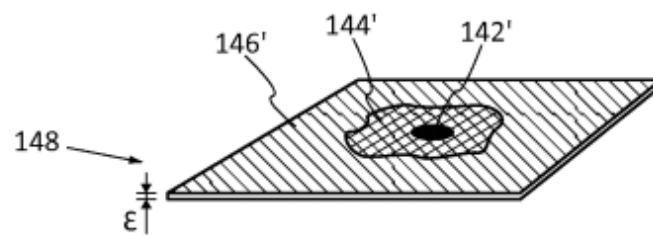


FIG. 13

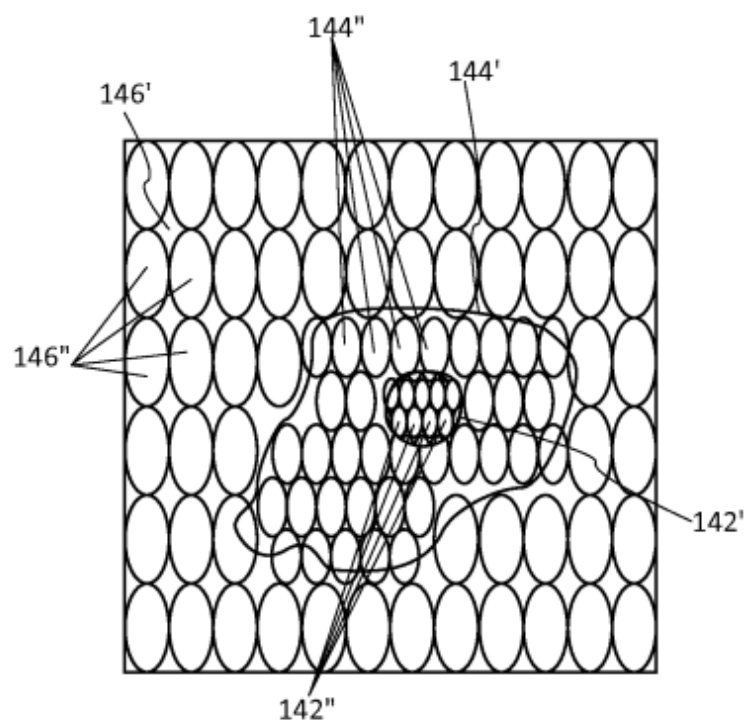


FIG. 14