

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 696**

51 Int. Cl.:

B33Y 10/00 (2015.01)

B29C 64/40 (2007.01)

B29C 64/106 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2015 PCT/US2015/064063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16090286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2015 E 15865693 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3227116**

54 Título: **Impresión 3D utilizando materiales de cambio de fase como soporte**

30 Prioridad:

05.12.2014 US 201462088385 P

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

03.03.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (33.3%)**

223 Grinter Hall

Gainesville, FL 32611 , US;

**GEORGIA TECH RESEARCH CORPORATION
(33.3%) y**

MARQUEZ, SAMANTHA M. (33.3%)

72 Inventor/es:

MARQUEZ, SAMANTHA M.;

FERNANDEZ-NIEVES, ALBERTO;

ANGELINI, THOMAS ETTOR y

CHANG, YA-WEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 745 696 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

Impresión 3D utilizando materiales de cambio de fase como soporte

5 Antecedentes

El uso de un andamio tridimensional como plantilla para la regeneración celular es fundamental para la ingeniería de tejidos. La identificación de la relación de la respuesta celular en una superficie bidimensional (2D) con la de un objeto tridimensional (3D) es cada vez más importante a medida que la biotecnología pasa de los cultivos celulares convencionales 2D a 3D, que imitan mejor a sus homólogos *in vivo*.

La generación actual de topografía de superficie a escala de micrones a milímetro se basa en micropatrones, técnicas de litografía o creación rápida de prototipos basada en la integración del diseño asistido por ordenador (CAD) 3D y la impresión 3D o un método de capa aditiva, que requieren equipos o instalaciones especializadas, y que a menudo implican métodos tediosos. Sustratos con geometría compleja, tales como andamios cilíndricos, toroidales y esféricos son difíciles de fabricar y requieren mucho tiempo con los métodos antes mencionados.

Las técnicas de procesamiento de andamios existentes han evolucionado a partir de los enfoques sustractivos más tradicionales, que implican la eliminación constante de materiales, a los enfoques aditivos convencionales, que utilizan la fabricación de forma libre sólida mediante la adición selectiva de materiales capa por capa. Los sistemas actuales de impresión 3D disponibles comercialmente implican imprimir un soporte sólido al mismo tiempo que la estructura impresa, capa por capa. Después de imprimir, el material de soporte se lava y se desecha.

Una técnica de formación libre es el electrohilado, un método que produce estructuras fibrosas no tejidas con diámetros de fibra en el rango de decenas de nanómetros a un micrómetro. La solución de polímero utilizada se alimenta a través de una jeringa y se extruye desde el hilador (punta de la aguja) conectado a una alta tensión, donde se generan las nanofibras. La técnica de impresión 3D también utiliza una boquilla dispensadora (cabezal de impresión de inyección de tinta) en su proceso de formación libre para depositar polvo de polímero y líquido de unión en cada capa.

El documento US 6.942.830 B2 describe un dispositivo y un método para la producción de objetos tridimensionales.

Sumario

El objetivo de la invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que ilustra un aparato para imprimir tridimensionalmente de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 2 es un esquema de un dispositivo para impresión tridimensional de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 3 es un gráfico del límite elástico del fluido de silicona en función de la concentración de material puro (con 10 cst de aceite de silicona como disolvente) de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 4 ilustra (a) un esquema de la vista superior de un toro inestable y (b) y un ejemplo de la escala de longitud más pequeña (*ac*) que se puede lograr utilizando material de silicona de diferente límite elástico de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 5 ilustra esquemáticamente la impresión en un cartucho que contiene un gel granular como medio de dibujo 3D.

La figura 6 ilustra estructuras que pueden formarse usando técnicas como las descritas en el presente documento, incluyendo gotitas (a) toroidales, (b) en forma de media luna y (c) en forma de espiral (izquierda: vista superior; derecha: vista lateral) de acuerdo con algunas realizaciones. Las barras de escala pueden representar 1 milímetro. La figura 7 ilustra esquemas de tres variaciones de una configuración de matriz de células que pueden formarse usando técnicas como las descritas en el presente documento de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 8 ilustra ejemplos de (a) células de levadura y (b) células epiteliales de MDCK cultivadas en una gotita toroidal que puede formarse usando técnicas como se describe en el presente documento de acuerdo con algunas realizaciones, donde las células epiteliales pueden migrar hacia regiones de curvatura gaussiana negativa, y las células de levadura no móviles pueden dividirse y crecer desde posiciones donde la población se ha sedimentado inicialmente.

La figura 9 ilustra la minimización de la tensión superficial con la impresión 3D de estructuras basadas en agua y agua y aceite que pueden formarse usando técnicas como se describe en el presente documento de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 10 ilustra un dibujo 3D de estructuras complejas, blandas y robustas que pueden formarse usando técnicas como las descritas en el presente documento de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 11 ilustra redes vasculares 3D jerárquicas con relación de aspecto variable que pueden formarse usando técnicas como las descritas en el presente documento de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 12A es un diagrama de flujo de un método para imprimir tridimensionalmente de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 12B es un diagrama de flujo de otro método para imprimir tridimensionalmente de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 13 ilustra las estructuras celulares extruidas en materiales de límite elástico para un estudio experimental a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones.

5 La figura 14 ilustra un sistema de extrusión 3D para un estudio experimental a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 15 ilustra estructuras extruidas para un estudio experimental a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones.

10 La figura 16 ilustra gotitas extruidas en materiales de límite elástico para un estudio experimental a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 17 ilustra la interacción celular con gotitas extruidas que permite un estudio experimental a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 18 ilustra técnicas de cálculo del estrés para un estudio experimental a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones.

15 La figura 19 ilustra la interacción celular con diversas curvaturas para un estudio experimental a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 20 es una representación gráfica del esfuerzo de corte frente a la velocidad de corte para algunos materiales ilustrativos de esfuerzo de deformación con los que pueden actuar algunas realizaciones.

20 La figura 21 es un gráfico del límite elástico frente al tiempo tixotrópico para algunos materiales de límite elástico con el que pueden actuar algunas realizaciones y, para comparación, otros materiales que no son materiales de límite elástico.

La figura 22 es un gráfico del índice tixotrópico frente al tiempo tixotrópico para algunos materiales de límite elástico con los que pueden actuar algunas realizaciones y, para comparación, otros materiales que no son materiales de límite elástico.

25

Descripción detallada

Los inventores han reconocido y apreciado que al imprimir en un material modificado temporalmente (por ejemplo, un material tixotrópico o "de límite elástico"), se puede imprimir una estructura deseada sin tener que imprimir también material de soporte. En su lugar, el material cambiado de fase puede convertirse en el material de soporte, conforme al volumen impreso y volviendo a una fase que restringe el volumen. Los inventores han reconocido y apreciado que este enfoque puede disminuir los costes y el tiempo de fabricación en comparación con los sistemas de impresión 3D convencionales, para lo cual la tensión superficial entre el material impreso y el material de soporte juega un papel clave en la limitación del tamaño mínimo de la característica que se puede imprimir. La impresión se puede lograr, por ejemplo, inyectando un segundo material en el material cambiado de fase. El material cambiado de fase puede crearse temporalmente, por ejemplo, en una región localizada de un material de límite elástico energizando esa región.

30

En algunas realizaciones, el material inyectado en el material modificado temporalmente puede ser miscible con él. Los inventores han reconocido y apreciado que el tamaño mínimo de la característica que puede imprimirse puede reducirse imprimiendo con un material tan miscible. En casos donde el material impreso es inmiscible con un material de límite elástico de soporte, la competencia entre la tensión superficial y el límite elástico puede establecer un límite en el tamaño de la característica imprimible, comparable a la impresión 3D tradicional donde la inestabilidad de Rayleigh-Plateau establece el tamaño mínimo de la característica. Sin embargo, puede no haber tensión superficial si los dos materiales son miscibles, y el límite inferior teórico sobre el tamaño de la característica impresa puede establecerse mediante (a) el tamaño de las partículas de microgel que constituyen el material de límite elástico, (b) el tamaño de las partículas en el material impreso, o (c) el tamaño de la boquilla de extrusión. La mayoría de los sistemas de impresión 3D de "creación rápida de prototipos" utilizan materiales inmiscibles. El material impreso es normalmente material orgánico hidrofóbico, y el material de soporte es normalmente material hidrofílico soluble en agua. Por lo tanto, el tamaño mínimo de la característica de la mayoría de las impresoras 3D disponibles comercialmente está limitado por la tensión superficial. Los inventores han reconocido y apreciado que la impresión de materiales en partículas en materiales de límite elástico de partículas, ambos solubles en los mismos materiales, puede eliminar la limitación de la tensión superficial, que puede evitar décadas de desafíos tecnológicos asociados con la humectación de la superficie y la energía interfacial. Esta mejora puede ser posible para la impresión basada en "agua-agua" y la impresión basada en "aceite-aceite"; las suspensiones acuosas en partículas se pueden imprimir en materiales de límite elástico acuosos, y las suspensiones de partículas solubles en aceite se pueden imprimir en materiales de límite elástico a base de aceite.

40

Los materiales de límite elástico pueden ser sólidos o en alguna otra fase en la que conservan su forma bajo tensiones aplicadas a niveles inferiores a su límite elástico. En tensiones aplicadas que exceden el límite elástico, estos materiales pueden convertirse en fluidos o en alguna otra fase más maleable en la que pueden alterar su forma. Cuando se elimina la tensión aplicada, los materiales de límite elástico pueden volverse sólidos nuevamente. Por lo tanto, los materiales de límite elástico pueden proporcionar una autocuración, estructura de soporte autosellante en la que se pueden imprimir estructuras complejas de diseño arbitrario. Muchos materiales de límite elástico son particulados. Por ejemplo, los materiales de límite elástico pueden incluir paquetes densos de microgeles - partículas microscópicas hechas de una red de polímero reticulada hinchada. Los microgeles pueden estar hechos de agua, polímeros hidrófilos o de polímeros hidrófobos como PDMS.

60

65

El estrés se puede aplicar a dichos materiales de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, se puede agregar energía a dichos materiales para crear una carga de fase. La energía puede estar en cualquier forma adecuada, incluyendo, mecánica, eléctrica, radiante o fotónica, etc. Los inventores han reconocido y apreciado que los sustratos con geometría compleja como tubos, toroides, esferas, cilindros, redes de recipientes jerárquicamente ramificadas, objetos de alta relación de aspecto y conchas delgadas cerradas, puede ser un desafío y llevar mucho tiempo fabricar con métodos convencionales, y que tales sustratos y estructuras con geometría compleja se puedan imprimir de manera más fácil y más rápida utilizando materiales con cambio de fase temporal. Asimismo, la impresión en un material con cambio temporal de fase puede permitir aplicaciones en las que la estructura impresa no se solidifica rápidamente o no se solidifica en absoluto, ya que puede que no sea necesario hacerlo. El fluido puede permanecer fluido para siempre porque el material cambiado temporalmente de fase puede mantener la estructura impresa en su lugar después de la impresión o extrusión. Al atrapar el fluido o material dentro de los materiales cambiados temporalmente de fase, los efectos de la tensión superficial, gravedad, y la difusión de partículas puede ser negada, lo que puede permitir la fabricación de materiales delicados finamente detallados con relaciones de aspecto casi ilimitadas. Asimismo, los inventores han reconocido y apreciado que las estructuras pueden "no imprimirse" usando los mismos materiales invirtiendo la trayectoria de la boquilla de extrusión e invirtiendo la dirección del flujo.

Los inventores han reconocido y apreciado que se puede usar una amplia variedad de materiales como materiales con cambio de fase temporal, incluidas las siliconas, hidrogeles, partículas coloidales y células vivas. Los materiales poliméricos blandos pueden reticularse en estructuras y eliminarse del material cambiado temporalmente de fase, mientras que los sistemas de partículas no reticuladas, como los coloides y las células, pueden dejarse soportados dentro del material por tiempos aparentemente infinitos. La precisión y el nivel de detalle logrados al escribir dentro de un material modificado temporalmente en fase pueden estar limitados por el tamaño de los gránulos del material, que se puede hacer en micrones y sub-micrones. Este enfoque puede ayudar en el desarrollo y la fabricación de andamios jerárquicos precisos de cultivo celular, redes vasculares, tejidos complejos y, en algunas realizaciones, órganos enteros.

Los inventores han reconocido y apreciado que, si bien la mayoría de las técnicas de impresión de tejidos existentes implican la deposición capa por capa en un baño fluido con un método de fundición con solvente, en el que el material extruido se solidifica por la acción de un compuesto en el baño (como el alginato extruido en un baño de cloruro de calcio), Los tejidos impresos en 3D pueden generarse directamente dentro de un "baño" de su medio nutriente sin un etapa de solidificación intermedio o matriz extracelular utilizando materiales con cambio de fase temporal. De esta manera, las células de tejido vivo se pueden imprimir en estructuras 3D arbitrarias, con o sin material de matriz extracelular suplementario. El material de soporte cambiado temporalmente de fase (por ejemplo, material de límite elástico energizado) puede proporcionar solidez, que puede funcionar sin un "agente de curado" para reforzar la estructura impresa. Asimismo, los inventores han reconocido y apreciado que el uso de materiales con cambio de fase temporal puede evitar los desafíos de los métodos de fundición con disolventes, como que la boquilla se obstruya con frecuencia a medida que el material se solidifica antes de salir al baño. El medio de crecimiento celular puede usarse como disolvente para microgeles acuosos, fabricando, por ejemplo, una matriz de límite elástico de cultivo de tejidos. Como un ejemplo alternativo, las células pueden imprimirse en un material de límite elástico a base de aceite, usando tensión interfacial para mantener una superficie bien definida.

Las técnicas de impresión en 3-D se pueden aplicar de varias maneras. Específicamente, los inventores han reconocido y apreciado las demandas significativas de un sustrato 3D de propiedad de topología y material bien definido controlable que ayudará a deconstruir la complejidad de las interacciones celulares con los sistemas de cultivo 3D. Los inventores también han reconocido y apreciado que la impresión en un material cambiado temporalmente de fase puede permitir la ingeniería de un entorno *in vitro* 3D artificial, que puede satisfacer el creciente interés en aislar señales ambientales específicas (por ejemplo, curvatura del sustrato) que podría proporcionar un cultivo 3D.

Los inventores han reconocido y apreciado que al imprimir células en forma de suspensiones particuladas o cualquier tinta utilizada comúnmente en la impresión 2D y 3D, en un material particulado, cambiado temporalmente de fase, como un material de límite elástico de partículas, la estructura impresa puede ser miscible con la estructura de soporte sin pérdida de precisión de impresión. Esta miscibilidad sin pérdida de precisión es posible porque la estructura impresa puede quedar atrapada instantáneamente en el material de límite elástico circundante tan pronto como se extruye. En el caso de componentes miscibles, dado que puede no haber tensión superficial entre el material impreso y el material de soporte, el límite fundamental de la mayoría de las estrategias de impresión 3D puede ser eludido. Es posible que no haya fuerza impulsora para que las características impresas se "junten". Por lo que, los materiales acuosos pueden imprimirse en soportes acuosos, y los materiales a base de aceite pueden imprimirse en soportes a base de aceite. Estos se suman a cualquier caso de combinaciones inmiscibles, que también puede ser posible.

Los inventores han reconocido y apreciado que la impresión en un material con cambio de fase temporal puede permitir la fabricación de un sustrato 3D o una matriz de encapsulación de células de geometrías definidas. Por ejemplo, los materiales de límite elástico pueden exhibir propiedades de adelgazamiento por corte, caracterizado por la reducción de la viscosidad bajo tensión y un retorno a su estado sólido original cuando se elimina la tensión. Esta propiedad de flujo transitorio puede permitirle dar forma al material mediante un simple corte. De acuerdo con algunas realizaciones, el estrés puede ser proporcionado a través de un inyector, como una aguja de jeringa, corte a través del material de

límite elástico (denominado fluido externo) y la inyección de un líquido inmiscible (denominado fluido interno). El estrés puede producir una pequeña región del fluido externo, que puede volver a solidificarse cuando el movimiento de la aguja se detiene y puede atrapar una gotita del líquido interno. Gotitas de topología compleja, por ejemplo, gotitas toroidales o en forma de media luna, se pueden generar girando la fase continua alrededor de un eje central mientras se extrusiona el líquido interno de una aguja de inyección colocada ligeramente descentrada. Las dimensiones del toro pueden controlarse (1) variando la cantidad de líquido inyectado y (2) cambiando la posición de la aguja con respecto al centro de rotación. Tenga en cuenta que cuando se combina con el movimiento horizontal de la aguja, también se pueden hacer gotitas en forma de espiral.

De acuerdo con algunas realizaciones, se puede fabricar una superficie o superficies curvas 2D con siembra celular simultánea. Proporcionando un fluido de estrés oleoso como medio externo y una dispersión acuosa de células como fluido interno, las gotitas esféricas o no esféricas que contienen células pueden formarse directamente en un proceso de una sola etapa. Como alternativa o adicionalmente, se pueden fabricar superficies curvas 2D de propiedades químicas y mecánicas ajustables adecuadas para el cultivo celular posterior. En este caso, el fluido interno puede comprender hidrogel común o una solución precursora de materiales de matriz extracelular sintética (ECM). La solidificación o gelificación de la solución precursora puede ser inducida por procesos ultravioleta (UV) o termogelificante, después de lo cual el sólido puede aislarse del material de límite elástico y usarse como sustrato celular.

De acuerdo con algunas realizaciones, se puede fabricar una matriz de encapsulación de células 3D de geometría esférica o toroidal. La técnica de atrapamiento celular puede usarse junto con algunas realizaciones simplemente usando una mezcla de solución precursora de hidrogel y dispersión celular como fluido interno. Una vez polimerizado a través de cambios en las condiciones físicas o químicas, dependiendo de los materiales de elección, la estructura final puede aislarse nuevamente del material de límite elástico externo.

Los inventores reconocen que los términos "límite elástico" y "material de límite elástico" se han usado y caracterizado de diferentes maneras en la técnica. Para facilitar la descripción en el presente documento, se usan los términos "límite elástico" y "material de límite elástico" pero, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse como un límite elástico de Herschel-Bulkley determinado utilizando la ecuación de Herschel-Bulkley

$$\sigma = \sigma_y + k\gamma^p$$

donde σ_y es el límite elástico, σ es el esfuerzo de corte, k es el índice de viscosidad del material, γ es la velocidad de corte, y p es un número positivo, y un material que tiene ese límite elástico.

Además, los inventores reconocen que "límite elástico" (es decir, el límite elástico de Herschel-Bulkley) se ha medido de diferentes maneras en la técnica. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el límite elástico de una muestra se determina cortando la muestra en un reómetro usando geometría placa-placa y mediante la ecuación de Herschel-Bulkley, a través del siguiente proceso. Antes de cortar, las superficies de la herramienta del reómetro pueden ser rugosas para evitar o mitigar el deslizamiento en la interfaz de la herramienta de muestra. Usando el reómetro, la muestra se corta a varias velocidades de corte, que se extiende desde altas velocidades de corte (por ejemplo, 1000 s^{-1}) a velocidades de corte bajas ($0,001 \text{ s}^{-1}$). Para cada velocidad de corte, la muestra se corta durante 30 segundos, después de lo cual se recopilan y promedian los datos de esfuerzo de corte. Una serie de mediciones de esfuerzo de corte se recolectan secuencialmente para cada velocidad de corte. Estas tasas de corte se usan entonces, a través de la ecuación de Herschel-Bulkley, para determinar (1) si el material tiene un límite elástico (es decir, un límite elástico de Herschel-Bulkley) y (2) el límite elástico del material. Los expertos en la materia apreciarán que, para un material que tiene un límite elástico, una gráfica de tensión de corte versus velocidad de corte exhibirá una región de meseta a bajas velocidades de corte, con los puntos de datos acercándose asintóticamente al límite elástico del material a bajas tasas de corte. El límite elástico es el esfuerzo de corte a estas velocidades de corte bajas, cercanas a cero, o una estimación del esfuerzo de corte a una velocidad de deformación cero determinada usando una velocidad de corte baja o casi cero, tal como una velocidad de corte de 10^{-3} s^{-1} . Como se usa en el presente documento (a menos que se indique lo contrario), un "material de límite elástico" será un material que tenga un límite elástico determinable mediante este proceso. Los expertos en la materia apreciarán que para un material de límite elástico (es decir, un material de límite elástico de Herschel-Bulkley) a bajo corte (por ejemplo, una velocidad de corte cercana a cero), un esfuerzo de corte es independiente de la velocidad de corte y, en cambio, exhibe solo un esfuerzo de corte que depende solo de un componente elástico del material.

Para ilustrar tal comportamiento, la figura 20 ilustra 6 curvas de esfuerzo de corte versus velocidad de corte, para un polímero de carbómero en varias concentraciones y sumergido en varios solventes. Las curvas muestran el comportamiento de Herschel-Bulkley (una región de meseta) y, por lo tanto, corresponden a materiales que tienen un límite elástico. Como debe apreciarse de la figura 20, el 0,05 % Carbopol® en un solvente de agua/NaOH casi no es un material de límite elástico, en que los puntos de datos apenas exhiben una región de meseta a baja velocidad de corte. Esto demuestra que algunos microgeles (incluidos los hidrogeles) en solventes, basado en otros factores como solvente o concentración, puede no ser materiales de límite elástico que tengan un límite elástico (es decir, un límite elástico de Herschel-Bulkley).

Para las pruebas que dan como resultado los datos de la figura 20, Carbopol® en diversas concentraciones se hinchó en agua y NaOH (a pH 6) o se hinchó en medio de crecimiento celular (a pH 7,4). Los medios de crecimiento celular utilizados fueron medios MEBM que incluyeron suero bovino fetal al 10 % y penicilina estreptomina al 1 %. Como debe apreciarse de la figura 20, el límite elástico del Carbopol® en los medios de crecimiento celular disminuye con una concentración más baja. Esto se debe a que las partículas de Carbopol® reducen su tamaño en ambientes con alto contenido de sal. Los ejemplos de la figura 20 demuestran la capacidad de Carbopol® y otros hidrogeles (por ejemplo, otros polímeros de carbómero) para ser "ajustados" para tener límites elásticos deseados para una aplicación dada, por factores variables como la concentración y el solvente.

Como debería apreciarse de la discusión a continuación, materiales de límite elástico (es decir, los materiales que tienen un límite elástico Herschel-Bulkley) pueden usarse deseablemente en una impresora 3D en realizaciones, como material de soporte durante la impresión. Como se apreciará en la discusión a continuación de materiales de límite elástico específicos, los inventores han reconocido y apreciado la conveniencia, para usar como materiales de soporte durante la impresión 3D, de materiales de límite elástico que tienen límites elásticos en un rango de 1 a 100 Pascales o de 10 a 100 Pascales. Por ejemplo, a continuación se describen realizaciones en las que los polímeros de carbómero (tales como Carbopol®) que tienen tensiones de rendimiento entre 1 y 100 Pascales se usan en la impresión 3D. Algunas realizaciones pueden funcionar con materiales de límite elástico que tengan cualquier límite elástico inferior a 100 Pascales, con un límite de fluencia mínimo solo definido por el límite físico inferior en los límites de fluencia de Herschel-Bulkley.

Por separado, los inventores han reconocido y apreciado la conveniencia de los materiales de límite elástico que tienen un límite elástico dentro de estos mismos rangos de 1 a 100 Pascales o 10 a 100 Pascales que se analizan a continuación. Los inventores han reconocido y apreciado que, durante la impresión 3D en un material de límite elástico, el movimiento de una boquilla de impresión dentro de un baño de material de límite elástico puede crear "grietas" no deseadas (e indeseables) en el material. La impresión en un baño de material de límite elástico sin formación espontánea de grietas no deseadas puede evitarse utilizando un material de límite elástico con un límite elástico bajo, como un material (como los materiales Carbopol® que se describen a continuación) con un límite elástico inferior a 100 Pascales. Para materiales de límite elástico que son hidrogeles, un límite superior en el límite elástico es la presión hidrostática del hidrogel, determinado por $p \cdot g \cdot h$, donde p es la densidad del material de límite elástico, g es la aceleración debida a la gravedad, y h es una profundidad de impresión debajo de la superficie. Para algunas realizaciones en las que las células vivas se imprimen en 3D en placas de Petri y/o placas de pocillos que contienen un hidrogel (como Carbopol®), las células pueden imprimirse a una profundidad de hasta 1 cm. En tales realizaciones, el límite superior del límite elástico (según lo determinado por la presión hidrostática) es de aproximadamente 100 Pascales. Los materiales de hidrogel deseables (incluidos los materiales Carbopol®) que tienen tensiones de rendimiento de hasta 100 Pascales se analizan en detalle a continuación.

Los expertos en la materia que los materiales que tienen un límite elástico tendrán ciertas propiedades tixotrópicas, como un tiempo tixotrópico y un índice tixotrópico.

Como se usa en el presente documento, un tiempo tixotrópico es un tiempo para que el esfuerzo de corte se establezca tras la eliminación de una fuente de corte. Los inventores reconocen que el tiempo tixotrópico puede medirse de diferentes maneras. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, el tiempo tixotrópico se determina aplicando a un material, por varios segundos, una tensión igual a 10 veces el límite elástico del material, seguido de bajar la tensión a 0,1 veces el límite elástico. La cantidad de tiempo para que la tasa de corte se establezca después de la caída del esfuerzo es el tiempo tixotrópico.

Como se usa en el presente documento, un índice tixotrópico (para un material de límite elástico) se define como la relación de viscosidad a una velocidad de deformación de 2 s^{-1} a viscosidad a una velocidad de deformación de 20 s^{-1} .

Los materiales de límite elástico con límites elásticos deseables también pueden tener propiedades tixotrópicas deseables, tales como índices tixotrópicos deseables o tiempos tixotrópicos. Por ejemplo, materiales deseables de límite elástico (incluyendo materiales de hidrogel que tienen un límite elástico inferior a 100 Pascales, algunos de los cuales se describen en detalle a continuación, como los materiales Carbopol®) pueden tener tiempos tixotrópicos menores de 2,5 segundos, menos de 1,5 segundos, menos de 1 segundo, o menos de 0,5 segundos, y más de 0,25 segundos o más de 0,1 segundos. La figura 21 es un gráfico de límite elástico (según lo indicado por la estimación de tensión de velocidad de corte cero) versus tiempo tixotrópico para varios materiales, incluyendo soluciones de hidrogel como las soluciones Carbopol® en algunos de los solventes y concentraciones mostrados en la figura 20 y discutido en detalle a continuación. Las soluciones Carbopol® exhiben un límite elástico inferior a 100 Pascales (y muchos inferiores a 25 Pascales), así como tiempos tixotrópicos bajos. Los tiempos tixotrópicos de las soluciones Carbopol® que tienen un límite elástico por debajo de 100 Pascales es inferior a 2,5, menos de 1,5 segundos, menos de 1 segundo, o menos de 0,5 segundos, y más de 0,25 segundos o más de 0,1 segundos.

De forma similar, la figura 22 muestra una gráfica de índice tixotrópico a tiempos tixotrópicos, para las mismas soluciones ilustradas en la figura 21. Para materiales de límite elástico de hidrogel con un límite elástico inferior a 100 Pascales (incluidos los que se detallan a continuación, como las soluciones Carbopol®), el índice tixotrópico es inferior

a 7, menos de 6,5, o menos de 5, y más de 4, o más de 2, o más de 1.

5 Materiales deseables de límite elástico, como hidrogeles como las soluciones Carbopol® que se describen a continuación, por lo tanto, puede tener tiempos tixotrópicos inferiores a 2,5, menos de 1,5 segundos, menos de 1 segundo, o menos de 0,5 segundos, y más de 0,25 segundos o más de 0,1 segundos, y/o índices tixotrópicos menos de 7, menos de 6,5, o menos de 5, y más de 4, o más de 2, o más de 1.

10 Debido al comportamiento del límite elástico de los materiales de límite elástico, los materiales depositados en un material de límite de fluencia (como a través de las técnicas de impresión 3D descritas en el presente documento) pueden permanecer fijos en su lugar en el material de límite de fluencia, sin que el material de límite elástico o el material depositado necesiten ser curados o tratados de otra manera para revertir un cambio de fase (por ejemplo, calentando para reticular, a continuación de la impresión). En su lugar, los materiales de límite elástico permiten un tiempo de trabajo indefinido en la deposición de materiales dentro de los materiales de límite elástico, incluyendo la impresión de objetos dentro de materiales de límite elástico. Por ejemplo, en los experimentos descritos en detalle a continuación, los objetos impresos permanecieron en su lugar durante varios meses (es decir, mayor de un minuto, mayor de una hora, mayor de un día, más de una semana y más de un mes) sin movimiento después de la deposición, sin curar o reticular el material de límite elástico o el material depositado, o de lo contrario sin tratamiento. Esto puede permitir la impresión/deposición continua de un material dentro de un material de soporte de límite elástico durante más de un minuto, mayor de una hora, mayor de un día, mayor de una semana o mayor de un mes, donde la impresión continua no incluiría el cese por razones relacionadas con la química del soporte o material impreso (por ejemplo, tratamiento o curado), pero puede incluir el cese por razones relacionadas con la mecánica de la impresión (por ejemplo, recarga de materiales para imprimir o movimiento del cabezal de impresión a una ubicación diferente).

25 **Implementación a modo de ejemplo del sistema**

La figura 1 ilustra un aparato a modo de ejemplo 100 para crear una estructura tridimensional. El aparato 100 puede incluir un recipiente 110, una fuente de energía enfocada 130, y un inyector 150. El contenedor 110 puede contener un primer material 120. La fuente de energía enfocada 130 puede causar un cambio de fase en una región 140 del primer material 120 aplicando energía enfocada a la región 140. El inyector 150 puede desplazar el primer material 120 con un segundo material 160.

35 De acuerdo con algunas realizaciones, el contenedor 110 puede ser una bañera, un tazón, una caja o cualquier otro contenedor adecuado para el primer material 120. El contenedor 110 puede estar configurado para liberar el primer material 120. Por ejemplo, el contenedor 110 puede incluir una abertura resellable y/o abisagrada que se puede abrir cuando se completa la impresión del segundo material 160, de modo que el primer material 120 pueda retirarse de alrededor del segundo material 160. Como alternativa o adicionalmente, el primer material 120 puede eliminarse total o parcialmente, tal como introduciendo solventes orgánicos y/o aumentando la concentración de electrolitos del primer material. La concentración de electrolitos puede aumentarse introduciendo una o más sales en el primer material o aumentando de otro modo una concentración de una o más sales en el primer material. Las sales que pueden usarse incluyen sales monovalentes, bajos niveles de sales multivalentes. Se puede utilizar cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio o sales de amoníaco. El aparato 100 puede incluir un segundo inyector (no ilustrado en la figura 1) para depositar una o más sales y/o disolventes orgánicos para eliminar el primer material, o para aumentar de otro modo una concentración de electrolitos del primer material para eliminar el primer material.

45 El primer material 120 puede incluir un material tixotrópico o de límite elástico, o cualquier material adecuado para cambio de fase temporal. En algunos ejemplos, el material tixotrópico o de límite elástico puede incluir un gel granular blando. El gel granular blando puede estar hecho de micropartículas empaquetadas poliméricamente. Las micropartículas empaquetadas poliméricamente pueden tener aproximadamente 5 micrómetros de diámetro.

50 Por ejemplo, la figura 5 ilustra (a) un capilar con una punta de microescala barriendo un patrón complejo en el espacio cuando se inyecta un segundo material 160 en medio de soporte de gel granular. El caudal, Q, y la velocidad de punta en las tres direcciones pueden determinar la circunferencia de la característica dibujada. Se pueden generar objetos de relación de aspecto arbitrario porque la estructura dibujada en sí misma puede no necesitar solidificarse o generar ningún soporte por sí misma. Adicionalmente, la figura 5 ilustra (b) la punta que atraviesa partículas de microgel sólidamente empaquetadas, lo que puede hacer que el medio de soporte se fluidifique y luego se solidifique rápidamente, dejando un cilindro dibujado a su estela. La figura 5 también ilustra (c) el medio de gel granular blando, a modo de ejemplomente como material de límite elástico, que puede deformarse elásticamente a bajas tensiones de corte, ablandar en tensiones intermedias y fluidizar en tensiones altas.

60 De acuerdo con algunas realizaciones, la energía enfocada puede incluir energía mecánica, tal como energía cinética debido al desplazamiento del inyector 150 con respecto al primer material 120. En este ejemplo, la fuente de energía enfocada 130 puede incluir el inyector 150. De acuerdo con algunas realizaciones, el inyector 150 puede incluir una punta hueca fina, que puede trazar cuidadosamente rutas espaciales dentro del primer material 120 (por ejemplo, un gel granular) mientras se inyecta el segundo material 160. El movimiento de la punta puede ceder localmente y fluidizar el primer material 120 en el punto de inyección (es decir, en la región 140). Otro ejemplo de energía mecánica puede incluir ondas de presión ultrasónicas. Como alternativa o adicionalmente, la energía enfocada puede incluir energía

radiante, como la radiación de radiofrecuencia, que puede dirigirse a la región 140.

De acuerdo con algunas realizaciones, el primer material y el segundo material pueden ser miscibles entre sí. Como alternativa, el primer material y el segundo material pueden ser inmiscibles entre sí. De acuerdo con algunas realizaciones, el segundo material puede comprender una solución precursora de materiales de matriz extracelular. Como alternativa o adicionalmente, el segundo material puede comprender una o más células.

De acuerdo con algunas realizaciones, la fuente de energía enfocada 130 puede causar un cambio de fase inversa en la región 140 del primer material 120. Por ejemplo, se puede usar un cambio de fase inverso para "sanar" y solidificar el primer material 120 alrededor del segundo material 160, atrapando e incrustando permanentemente el segundo material 160 en la estela del inyector 150. Como alternativa o adicionalmente, se puede usar un cambio de fase inversa para eliminar el segundo material 160 del interior del primer material 120.

De acuerdo con algunas realizaciones, se pueden preparar gotitas de geometrías no esféricas inyectando un líquido acuoso interno en un baño rotativo de material de tensión de deformación no polar, como se muestra esquemáticamente en la figura 2. La figura 2 ilustra un aparato 200 para impresión tridimensional. El aparato 200 puede incluir una carcasa o contenedor 210, una aguja 250, una jeringa 270 y tubos 280. El alojamiento 210 puede contener un primer material 220. La aguja 250 puede desplazar el primer material 220 con un segundo material 260. El tubo 280 puede estar conectado a una salida de la jeringa 270 y una entrada de la aguja 250. La jeringa 270 puede incluir una cantidad del segundo material 260, que puede inyectarse a través del tubo 280 y la aguja 250 en el primer material 220.

De acuerdo con algunas realizaciones, el aparato 200 puede incluir una plataforma (no mostrada) que puede causar un desplazamiento relativo entre el primer material 220 y la aguja 250. Adicionalmente, el desplazamiento relativo entre el primer material 220 y la aguja 250 puede comprender una rotación relativa entre el primer material 220 y la aguja 250, como se muestra en la figura 2. Esta rotación relativa entre el primer material 220 y la aguja 250 puede comprender la rotación alrededor de un eje del primer material 220, también mostrado en la figura 2. De acuerdo con algunas realizaciones, la plataforma puede causar el desplazamiento relativo entre el cartucho 210 y la aguja 250 a una velocidad de desplazamiento más rápida que un tiempo de ruptura característico de un chorro del segundo material 260.

De acuerdo con algunas realizaciones, el aparato 200 puede incluir además un posicionador o actuador 290. El posicionador 290 puede causar un desplazamiento relativo entre la aguja 250 y el primer material 220. Por ejemplo, el posicionador 290 puede colocar la aguja 250 tridimensionalmente de modo que el segundo material 260 entre en el primer material 220 en las ubicaciones deseadas. El posicionador 290 también se puede usar junto con la plataforma para crear formas específicas, ya que la plataforma y el posicionador 290 causan desplazamiento simultáneamente. Por ejemplo, la plataforma puede causar una rotación relativa entre el primer material 220 y la aguja 250, mientras que el posicionador 290 puede desplazar la aguja 250 hacia arriba y hacia abajo, un lado a otro, de ida y vuelta, y así sucesivamente, creando cualquier forma deseada. Como alternativa o adicionalmente, el movimiento de la aguja 250 puede sincronizarse con el movimiento del posicionador 290.

De acuerdo con algunas realizaciones, durante la infusión de fluidos, un chorro de líquido puede estirarse por el movimiento rotativo continuo del fluido externo, similar al del co-flujo líquido. El principio de formar un chorro curvo cerrado (o una gotita toroidal) dentro de un fluido externo de límite elástico puede ser similar al de formar tales gotitas en líquidos newtonianos simples (E. Priam et al. (2009), Generación y estabilidad de gotitas toroidales en un líquido viscoso, Phys. Rev. Lett. 102, 234501): para realizar una rotación completa más rápido que el tiempo de ruptura característico del chorro de líquido. La porción o región temporalmente cambiada de fase del primer material 220, que efectivamente puede "solidificarse" en condiciones estáticas, puede permitir una mayor estabilización de la geometría no esférica. Por ejemplo, el material de límite elástico puede ser inmiscible con el fluido interno, preferentemente biocompatible, y puede proporcionar claridad óptica así como propiedades mecánicas ajustables.

De acuerdo con algunas realizaciones, el primer material 220 y el segundo material 260 pueden permitir que el aparato 200 funcione sin necesidad de materiales adicionales, como un material de relleno o fluido para rellenar grietas creadas durante la impresión. Adicionalmente, el primer material 220 no necesita ser material fotoreticulado; en su lugar, el primer material 220 puede ser fotoreticulado o no fotoreticulado.

De acuerdo con algunas realizaciones, el segundo material 260 no necesita ser un material de límite elástico para usar como la "tinta" para imprimir; en su lugar, se puede usar cualquier material adecuado para el segundo material 260. Adicionalmente, el primer material 220 puede tener cualquier módulo adecuado, que no se limita a un módulo "alto". Por ejemplo, el módulo del primer material 220 puede estar en cualquier lugar dentro del rango de 100 a 10.000 Pascales, o puede estar fuera de este rango. El límite elástico de los geles puede variar, dependiendo de la consistencia deseada, pero generalmente puede estar en el rango de 1-100 Pascales, o 10-100 Pascales para algunos materiales de límite elástico tales como dispersiones de elastómero de silicona.

Los ejemplos de dispersiones de elastómero de silicona adecuadas pueden incluir mezclas de polímeros cruzados de dimeticona/vinil dimeticona de Dow Corning Corporation (Midland, Michigan) con el nombre comercial Dow Corning®

9040 elastómero de silicona (ciclopentasiloxano y polímero cruzado de dimeticona), DC-9041 (polímero cruzado de dimeticona y dimeticona), EL-9140DM (polímero cruzado de dimeticona y dimeticona); SFE 839, un polímero cruzado de ciclopentasiloxano (y) dimeticona/vinil dimeticona de Momentive Performance Materials Inc. (Waterford, Nueva York); ciclopentasiloxano (y) polímero cruzado de cetearil dimeticona/vinil dimeticona de Momentive Performance Materials Inc. bajo el nombre comercial Silsoft* Silicone Gel; KSG-15 (ciclopentasiloxano y polímero cruzado de dimeticona/dimeticona vinilo), KSG-16 (polímero cruzado de dimeticona y dimeticona/vinil dimeticona), KSG-18 (polímero cruzado de fenil trimeticona y dimeticona/fenil vinil dimeticona) y KSG-41 (aceite mineral y polímero cruzado de dimeticona/lauril dimeticona) de Shin Etsu Silicones (Akron, Ohio).

10 La dispersión de elastómero puede proporcionar un gel transparente, viscoso estable o material similar a una pasta normalmente descrito como sólido tixotrópico. El límite elástico de los geles puede ajustarse convenientemente variando la concentración de dispersión, como se muestra a modo de ejemplamente usando DC-9041 con aceite de silicona de baja viscosidad en la figura 3. El disolvente común en la dispersión prefabricada puede ser una silicona de bajo peso molecular. Otros tipos de solventes orgánicos también pueden hinchar el elastómero de silicona y, por lo tanto, se puede usar una mezcla de solventes.

La resolución, es decir, la dimensión más pequeña, de las estructuras 3D puede determinarse por el límite elástico de la dispersión de silicona, así como por la tensión interfacial entre los fluidos interno y externo. Para un par de fluidos, con límite elástico externa del fluido τ_y y tensión interfacial γ , la relación entre el tamaño mínimo de la característica (patrón) y estas propiedades del fluido puede describirse como sigue: Los chorros de líquido dentro de un material de límite elástico pueden experimentar tensiones generadas por tensión superficial, similar al del líquido newtoniano, donde la minimización del área interfacial puede ser preferible y eventualmente puede conducir a la ruptura de los chorros en gotitas esféricas. Cuando el límite elástico del fluido externo es mayor que la tensión superficial ($\tau_y > \gamma/a$, un ser el radio del chorro de líquido), como se muestra en la figura 4, la geometría del chorro puede ser estable y la ruptura puede no ocurrir. Por lo tanto, la mejora de la resolución se puede lograr aumentando τ_y y/o reduciendo γ . La distancia más corta entre los tubos vecinos (diámetro del círculo interno en el caso de un toro) y la dimensión más delgada del tubo (diámetro del tubo) generalmente puede ser del orden de cien micras. La figura 6 muestra algunos ejemplos de las diferentes geometrías que se pueden producir.

30 De acuerdo con algunas realizaciones, una mezcla de elastómero de silicona y solvente compatible puede usarse directamente como una matriz amigable con las células. La mezcla de silicona de límite elástico variable puede usarse para formar una matriz que tiene geometría controlada y curvatura interfacial para el cultivo celular. Las gotitas de dispersión celular pueden estar contenidas dentro del elastómero de silicona, que puede permitir que las células se dispersen libremente en el fluido portador (medio de cultivo) y eventualmente sedimenten en la interfaz líquido-silicona. Una vez en la interfaz, las células pueden explorar regiones de curvatura superficial variable y responder a ella. Se pueden agregar componentes adicionales al fluido portador para hacer que la superficie de silicona sea bioactiva, por ejemplo, proteínas de la matriz extracelular (colágeno u otras proteínas adhesivas), anticuerpos o drogas.

40 De acuerdo con algunas realizaciones, las matrices o andamios encapsuladores de células 3D también pueden incluir hidrogeles. Algunos de estos hidrogeles pueden ser polímeros biocompatibles. Los hidrogeles pueden dispersarse en soluciones (por ejemplo, soluciones con medio de crecimiento celular) en varias concentraciones. Un ejemplo de una concentración es inferior al 2 % en peso. Otro ejemplo de concentración es aproximadamente 0,5 % a 1 % de partículas de hidrogel en peso, y otro es aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 0,7 % en masa. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden usar otras concentraciones. Los expertos en la materia apreciarán además que, cuando se dispone en una solución como se discute en el presente documento, las partículas de hidrogel se hincharán con el solvente y pueden formar un material de gel granular, como se discute en otra parte del presente documento. Tal gel granular puede incluir partículas de hidrogel hinchadas que tienen un tamaño característico a escala micrométrica o submicrométrica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una partícula de hidrogel hinchada puede tener un tamaño entre aproximadamente 0,1 μm y 100 μm , incluyendo 5 μm como se discutió anteriormente.

50 Un ejemplo de un hidrogel con el que pueden funcionar algunas realizaciones es un polímero de carbómero, como Carbopol®. Los polímeros de carbómero pueden ser polielectrolíticos y pueden comprender partículas de microgel deformables.

55 Los polímeros carbómeros son particulados, polímeros reticulados de alto peso molecular de ácido acrílico con pesos moleculares de hasta 3 - 4 mil millones de Daltons. Los polímeros de carbómero también pueden comprender copolímeros de ácido acrílico y otros monómeros y polímeros acuosos tales como polietilenglicol.

60 Si bien el ácido acrílico es el monómero primario más común utilizado para formar ácido poliacrílico, el término no se limita a él, sino que generalmente incluye todos los monómeros insaturados α - β con grupos colgantes carboxílicos o anhídridos de ácidos dicarboxílicos y auxiliares tecnológicos como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.349.030. Otros polímeros útiles que contienen carboxilo se describen en la patente de EE.UU. n.º 3.940.351, dirigido a polímeros de ácido carboxílico insaturado y al menos un éster alquilo acrílico o metacrílico donde el grupo alquilo contiene de 10 a 30 átomos de carbono, y la patente de EE.UU. n.º 5.034.486; 5.034.487; y 5.034.488; que se dirigen a copolímeros de anhídrido maleico con vinil éteres. Otros tipos de tales copolímeros se describen en la patente de EE.UU. n.º 4.062.817 en el que los polímeros descritos en la patente de EE.UU. 3.940.351 contienen adicionalmente otro éster

alquil acrílico o metacrílico y los grupos alquilo contienen 1 a 8 átomos de carbono. Los polímeros y copolímeros carboxílicos como los del ácido acrílico y el ácido metacrílico también pueden estar reticulados con materiales polifuncionales como el divinilbenceno, diésteres insaturados y similares, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 2.340.110; 2.340.111; y 2.533.635. Las divulgaciones de todas estas patentes de EE. UU. tratan sobre polímeros y copolímeros carboxílicos que, cuando se usa en ácidos poliacrílicos, forman materiales de límite elástico como se divulga en el presente documento. Los tipos específicos de ácidos poliacrílicos reticulados incluyen el homopolímero de carbómero, monografías de copolímero de carbómero e interpolímero de carbómero en los Estados Unidos Pharmocopia 23 NR 18, y carbómero y el polímero cruzado de alquilacrilato C10-30, acrilatos de polímeros cruzados como se describe en el PCPC International Cosmetic Ingredient Dictionary & Handbook, 12ª Edición (2008).

Las dispersiones de polímeros de carbómero son ácidas con un pH de aproximadamente 3. Cuando se neutraliza a un pH de 6-10, las partículas se hinchan dramáticamente. La adición de sales al carbómero hinchado puede reducir el tamaño de partícula e influir fuertemente en sus propiedades reológicas. Los carbómeros hinchados tienen un índice de refracción casi equivalente a solventes como agua y etanol, haciéndolos ópticamente claros. El carbómero en polvo sintético original fue registrado como Carbopol® y comercializado en 1958 por BF Goodrich (ahora conocido como Lubrizol), aunque los carbómeros están disponibles comercialmente en una multitud de formulaciones diferentes.

Otros materiales a modo de ejemplo incluyen geles de polisacáridos tales como alginato y agarosa, geles de proteínas como el fibrinógeno, colágeno, Matrigel®, hidrogeles de polímeros sintéticos tales como poli (acrilamida), diacrilato de poli (etilenglicol), poli (ácido acrílico) y cualquier otro material adecuado. La forma tridimensional de estas matrices puede formarse nuevamente usando material de fase cambiada temporalmente como fluido externo y soluciones pre-gelificadas con/sin células como fluido interno. El material pre-gelificado puede reticularse utilizando productos químicos o físicos (calor, tratamiento con irradiación UV). Post gelación, el material de soporte (ahora utilizado como material de sacrificio) se puede lavar diluyendo con sales y/o solventes orgánicos y eventualmente sumergido en medios de cultivo acuosos.

Los hidrogeles pueden incluir microgeles empaquetados: partículas de gel microscópicas, ~ 5 µm de diámetro, hechas de polímero reticulado (figura 13). El límite elástico de Carbopol® está controlado por el contenido de agua. El límite elástico de Carbopol® se puede variar entre aproximadamente 1-1000 Pa [41]. Por lo tanto, ambos materiales pueden ajustarse para abarcar los niveles de estrés que las células suelen generar. Como se trató anteriormente, mientras que los materiales pueden tener tensiones de rendimiento en un rango de 1-1000 Pa, en algunas realizaciones, puede ser ventajoso usar materiales de límite elástico que tengan límites elásticos en un rango de 1-100 Pa o 10-100 Pa. Además, algunos de estos materiales pueden tener tiempos tixotrópicos inferiores a 2.5, menos de 1,5 segundos, menos de 1 segundo, o menos de 0,5 segundos, y más de 0,25 segundos o más de 0,1 segundos, y/o índices tixotrópicos menos de 7, menos de 6,5, o menos de 5, y más de 4, o más de 2, o más de 1.

De acuerdo con algunas realizaciones, las células pueden introducirse durante o después de la formación de la matriz, que puede producir tres tipos distintivos de conjuntos de células, como se muestra en la figura 7. De acuerdo con algunas realizaciones, se puede proporcionar una rápida y simple encapsulación libre de tensioactivos. Como se ha descrito anteriormente, los inventores han reconocido y apreciado la variada topología de estructuras que se pueden generar, incluidas las superficies toroidales que presentan regiones de curvatura gaussiana positiva (como en las esferas), regiones de curvatura gaussiana cero (como en planos 2D) y regiones de curvatura gaussiana negativa (como las de una silla de montar). Como alternativa o adicionalmente, se puede determinar la mecanosensibilidad de la curvatura del sustrato por las células. Esta determinación puede incluir la fabricación de andamios con geometrías controladas hechas de un material de matriz seleccionado, sembrando células en estos sustratos con diferentes curvaturas y evaluando las respuestas producidas por las células que crecen en contacto con diferentes sustratos.

Debería apreciarse de lo anterior que algunas realizaciones están dirigidas a un método para impresión tridimensional, como se ilustra en la figura 12A. El método comienza en la acción 1210, en la cual puede producirse un cambio de fase en una región de un primer material aplicando energía enfocada a la región utilizando una fuente de energía enfocada. Ese material puede ser un material que puede sufrir un cambio de un estado menos fluido a un estado más fluido tras la introducción de energía. El método luego procede a la acción 1220, en la cual el primer material puede ser desplazado con un segundo material.

Debería apreciarse además de lo anterior que otras realizaciones están dirigidas a un método para impresión tridimensional, como se ilustra en la figura 12B. El método comienza en la acción 1210, en la cual puede producirse un cambio de fase en una región de un primer material aplicando energía enfocada a la región utilizando una fuente de energía enfocada. El método luego procede a la acción 1220, en la cual el primer material puede ser desplazado con un segundo material. El método luego procede a la acción 1230, en la cual se produce el desplazamiento relativo entre el primer material y el inyector y el desplazamiento de la región. El método luego procede a la acción 1240, en el cual se produce un cambio de fase inversa en la región.

Usos a modo de ejemplo de las realizaciones

La figura 8 ilustra ejemplos de (a) células de levadura y (b) células epiteliales de MDCK cultivadas en una gotita toroidal de acuerdo con algunas realizaciones, donde las células epiteliales pueden migrar hacia regiones de curvatura

gaussiana negativa, y las células de levadura no móviles pueden dividirse y crecer desde posiciones donde la población se ha sedimentado inicialmente.

5 La figura 9 ilustra la minimización de la tensión superficial a modo de ejemplo con impresión 3D basada en agua-agua y aceite-aceite, (a) Se utiliza una micropipeta de cristal con una punta de 100 micrómetros de diámetro para dibujar estructuras 3D. La punta se llena con una suspensión de microesferas fluorescentes y se toma una imagen bajo iluminación UV, (b) Se imprime una estructura 3D que se asemeja a ADN b a partir de una suspensión acuosa de microesferas fluorescentes en medio de gel granular acuoso. Esta foto está tomada con iluminación UV, (c) Una imagen de mayor aumento de la estructura similar al ADN muestra los "pares de bases" delgados que conectan cada columna vertebral de la hélice de dos comienzos. (d, e) Una vista de arriba hacia abajo y una vista lateral inclinada de la estructura del ADN muestran la fidelidad de la escritura en 3D y la separación extremadamente estrecha entre las características. Todas las estructuras de ADN que se muestran en el presente documento son disposiciones espaciales de microesferas no reticuladas. Las estructuras no reticuladas en el presente documento no muestran signos de inestabilidad meses después del dibujo, (f) Las barras quirales verticales dispuestas en el presente documento en una matriz 3D mantienen su forma y orientación sin signos de efectos gravitacionales, (g) Las varillas delgadas en el presente documento están hechas de polímero fotoreticulable; Después de la gelificación, se retiran del medio de gel granular y se colocan en una placa de Petri. Las varillas altamente flexibles se doblan una alrededor de la otra, exhibiendo orden de orientación local. (h) Los sistemas PDMS-PDMS pueden permitir la creación de una malla a base de aceite con un tamaño de característica de aproximadamente 200 micrómetros que puede ser estable sin reticulación. (i) Una proyección de intensidad máxima a partir de pilas z de microscopía confocal de malla PDMS (arriba) y malla PVA (abajo) muestra que las estructuras de polímero no reticulado pueden estabilizarse mediante el medio de gel granular. El logaritmo de intensidad se muestra en (c, d, e) usando LUT de colores falsos para hacer los rasgos delgados, débiles visibles.

25 La figura 10 ilustra dibujos 3D a modo de ejemplo de complejos, estructuras blandas y robustas, (a) Un pulpo de concha delgada modelo está hecho de múltiples partes de hidrogel huecas conectadas con curvatura de superficie compleja, estable. Esta fotografía de campo brillante se toma antes de la polimerización. (b) Una imagen de fluorescencia del modelo de pulpo después de la polimerización, todavía atrapado en medio de gel granular, no exhibe cambios estructurales del proceso de polimerización, (c) El modelo de pulpo polimerizado conserva la integridad después de la extracción del medio de gel granular, se muestra flotando libremente en el agua. (d) Una medusa modelo incorpora tentáculos flexibles de alta relación de aspecto unidos a un cuerpo de caparazón cerrado. (e) Un modelo de medusa flotando libremente, fotografiado en agua, demuestra robustez y flexibilidad. (f, g) Un espermatozoide modelo demuestra la capacidad de encapsular material. La impresión fue pausada, se inyectaron partículas fluorescentes manualmente, y se completó la impresión programada. Las fotografías en (a, c, e, f, g) fueron tomadas bajo iluminación de luz blanca. Las fotografías en (b, c) se tomaron bajo iluminación UV y se muestran con LUT de color falso para mejorar las características débiles. El material impreso en (a-e) es una mezcla de PVA fotoreticulable y microesferas fluorescentes.

40 La figura 11 ilustra redes vasculares 3D jerárquicas a modo de ejemplo con relación de aspecto variable. (a) Se genera una red continua de vasos huecos en la que un vaso grande se ramifica a tres vasos más pequeños, cada ramificación a vasos aún más pequeños, y así sucesivamente, dando como resultado una única red vascular con características que abarcan aproximadamente tres órdenes de magnitud en tamaño y muchos órdenes de magnitud en relación de aspecto. Se utiliza una mezcla de PVA fotoreticulable y microesferas fluorescentes para escribir la estructura, (b) La misma red en (a) se muestra desde arriba. (c) Una foto de alta resolución de vasos truncados alrededor de una sola unión muestra que las características son huecas con paredes extremadamente delgadas. Se pueden ver trazas individuales del material impreso, que tienen un diámetro de aproximadamente 100 micrómetros, (d) La misma unión de (c) se muestra desde el lado sin los tres vasos superiores, demostrando que las curvaturas cóncavas y convexas se pueden crear en estructuras estables únicas, (e) La red vascular 3D está reticulada, retirado del medio de gel granular y fotografiado mientras flota libremente en agua. (f) Toda esta red vascular también se creó a partir de células endoteliales aórticas humanas (HAEC), escritas en medio de gel granular impregnado con medios de crecimiento celular. Sin embargo, la constante dieléctrica de la estructura resultante está muy cerca del medio de gel granular, y las características son tan finas, que la estructura resultante no se puede ver en las fotografías. Sin embargo, con células marcadas con fluorescencia, una porción de la estructura puede medirse utilizando microscopía de fluorescencia confocal. Se puede ver la estructura tubular inclinada que forma la base en (d), en el presente documento hecho de HAEC marcados con fluorescencia. La imagen es una proyección de máxima intensidad a lo largo de una dirección sesgada, y el recuadro es el corte XY correspondiente a la parte superior de la estructura tubular. Los inventores han monitoreado células en estructuras impresas en el transcurso de varias semanas, sin encontrar signos de toxicidad.

60 **Estudio experimental a modo de ejemplo usando algunas realizaciones**

Visión general

65 Una nueva clase de biomaterial puede permitir el estudio de la dinámica de las células de los tejidos: ensamblajes de células 3D estructuradas en materiales de límite elástico. Una de las características únicas de los conjuntos de células 3D descritos en el presente documento es el sustrato en el que están incrustados: materiales de límite elástico. La

interacción del límite elástico, la tensión interfacial y la tensión citoesquelética pueden generar nuevas inestabilidades análogas a las de los sólidos y fluidos clásicos. Los materiales de límite elástico pueden aplicarse a estos estudios porque (1) sus propiedades permiten una versatilidad sin precedentes del diseño del ensamblaje de células, (2) son homogéneos y transparentes, permitiendo imágenes de alta calidad y modelos manejables, y (3) su uso con ensamblajes de células representa la creación de una nueva clase de biomaterial.

Las inestabilidades mecánicas en estructuras simples pueden usarse para clasificar y medir las fuerzas celulares colectivas. El sello distintivo de las inestabilidades revela las fuerzas subyacentes, y estudiar las inestabilidades es estudiar la interacción de las fuerzas dominantes. Por ejemplo, las oscilaciones radiales en los chorros de fluido son el sello distintivo de la inestabilidad de Rayleigh-Plateau; medir estas fluctuaciones sondea la interacción de la tensión superficial, estrés viscoso e inercia. Para conjuntos de células incrustados en un material de soporte, las fuerzas emergentes, dominantes no se conocen. Se pueden crear estructuras celulares simples en materiales de límite elástico, permitiendo la investigación del comportamiento inestable y las características de las inestabilidades clásicas. Se puede probar la amplitud de estructuras accesibles con los métodos descritos en el presente documento. Las tensiones pueden medirse ópticamente dispersando marcadores fluorescentes en el material de límite elástico. El umbral de estabilidad de la estructura puede estudiarse ajustando el límite elástico del medio de inclusión.

La simetría y la topología de estructuras multicelulares complejas pueden tener un papel en la dinámica celular colectiva. Las observaciones de las células en las estructuras toroidales nos han llevado a un descubrimiento guía: la topología se puede utilizar para soportar cargas. Los inventores han investigado la dinámica celular colectiva en estructuras de bucle único (género topológico = 1) y en grandes conjuntos de bucles (género > 1). La estabilidad de los bucles depende del límite elástico del material y la tensión del citoesqueleto, que puede ser manipulado de muchas maneras. La simetría de los conjuntos de bucles puede controlar el movimiento colectivo; si se desarrolla vorticidad alrededor de cada ciclo, incluso transitoriamente, pueden surgir interacciones bucle-bucle. Los inventores han buscado una fase anti-ferromagnética en redes de vórtice cuadradas; las fases de cristal giratorio pueden aparecer en redes de vórtice hexagonal. La estabilidad y la correlación se comparan entre 1D, enrejados 2D y 3D.

En resumen, los materiales de límite elástico nunca se han aprovechado para crear estructuras celulares controladas, 3D complejas. Las primeras actividades que emplean este nuevo biomaterial pueden descubrir *nuevos tipos de inestabilidad mecánica* que surgen de la combinación de la vida, células autónomas con un material complejo que se estudia en otros lugares por sus propias propiedades excitantes [1-6]. Esta combinación única permite la creación de grandes, retículas multicelulares con las que se pueden explorar por primera vez preguntas fundamentales sobre los roles de la simetría y la topología en el comportamiento celular colectivo.

Enfoque

El paradigma actual en la investigación de biomateriales celulares es crear un andamio sólido y demostrar su biocompatibilidad *in vitro* o *in vivo*. Las propiedades de los sistemas de andamiaje existentes prohíben la experimentación versátil de la dinámica celular, limitar las investigaciones de las interacciones de andamios con células vivas. La característica compartida por estos sistemas de andamios: son sólidos. Crear conjuntos de células 3D bien controlados de diseño arbitrario en andamios sólidos puede no ser posible. Una pregunta es cómo se puede crear un colector de células 3D dentro de un andamio sólido sin dañar el andamio. El uso del biomaterial celular de límite elástico es significativo porque puede (1) crear una plataforma superior para llevar a cabo investigaciones fundamentales de la dinámica celular 3D; (2) crear una nueva clase de biomaterial nunca antes investigado; y (3) explorar aspectos fundamentales de la dinámica celular colectiva previamente prohibida de estudio, limitado por los materiales de soporte disponibles. Estas actividades se basan en un nuevo concepto que rompe con el paradigma establecido en biomateriales celulares.

Los materiales de límite elástico pueden cumplir los requisitos de la investigación de biomateriales celulares, tales como (1) control del tamaño y la forma del agregado celular; (2) medición de la fuerza generada por la célula; y (3) imágenes ópticas. Los materiales de límite elástico (YSM) son sólidos cuando la tensión aplicada está por debajo de el límite elástico, σ_y . En tensiones superiores a σ_y , los YSM se fluidifican. Cuando el esfuerzo aplicado cae por debajo de σ_y , un YSM fluidizado se solidifica nuevamente. Estas propiedades permiten la generación de innumerables estructuras multicelulares mediante la extrusión de células o mezclas de células/ECM en YSM. A medida que se extruyen las células, la boquilla fluidifica el YSM, y cuando la estructura está completa, la boquilla de extrusión se puede quitar del YSM, dejando material de soporte homogéneo.

Uno de los YSM que se puede usar es Carbopol®, un material disponible comercialmente que ha sido ampliamente estudiado [41, 42]. Carbopol® es popular en el estudio de los YSM porque, una vez producido, no se corta finamente a medida que aumenta la velocidad de deformación, haciéndolo "ideal" [4]. La velocidad de MRI en muestras de Carbopol® mostró que la deformación local es la misma que la deformación global a través del umbral de rendimiento [6]; Esto es notable porque demuestra la homogeneidad de Carbopol's®, planteando la posibilidad de desarrollar un método de microscopía de fuerza 3D.

Estudios

Los inventores han realizado estudios utilizando dos materiales: Carbopol ETD 2020 y Dow-Corning 9041 Silicone Elastomer Blend. El Carbopol es acuoso y el DC-9041 es a base de aceite de silicona. Ambos consisten en microgeles empaquetados: partículas de gel microscópicas, $\sim 5 \mu\text{m}$ de diámetro, hechas de polímero reticulado (figura 13). El límite elástico de DC-9041 se controla agregando o eliminando aceite PDMS; el límite elástico de Carbopol está controlado por el contenido de agua. El límite elástico de Carbopol puede variar entre aproximadamente 1-1000 Pa [41]; Las pruebas de los inventores de DC-9041 revelan un rango similar. Por lo tanto, ambos materiales pueden ajustarse para abarcar los niveles de estrés que las células suelen generar.

Construcción de instrumentos

El sistema de extrusión 3D puede comprender una etapa XYZ construida a partir de tres etapas de desplazamiento lineal (M-403, Physik Instrumente) accionado por controladores de motor DC Mercury (C-863, Physik Instrumente). El sistema de extrusión es una bomba de jeringa controlada por ordenador (Next Advance), sostenido estacionario para permitir la imagen a medida que el escenario se mueve, desplazamiento del material de soporte de límite elástico en 3D (figura 14). Las boquillas de extrusión pueden estar hechas en casa a partir de pipetas de cristal, estiradas con un extractor de micropipetas Kopf-750 y moldeadas con una micro forja Narishige. Los inventores tienen control sobre el diámetro y la forma de la boquilla; La humectabilidad de la boquilla varía con 3-aminopropil-trietoxisilano hidrófilo u octadeciltriethoxisiloxano hidrófobo.

Ejemplo: Pruebas de Carbopol®: Estructuras Acuoso-Acuoso

Las células viven en medios acuosos y Carbopol® es acuoso. Con el instrumento de extrusión 3D descrito en el presente documento, los inventores han inyectado partículas de pigmento azul suspendidas en agua ($d \sim 1 \mu\text{m}$) en Carbopol®, creando una estructura continua de forma cuadrada con una sección transversal submilimétrica. La estructura no mostró inestabilidad a largo plazo durante varios días. Para estudiar la relajación de las estructuras, los inventores inyectaron manualmente una suspensión acuosa de fluoroesferas ($d = 5 \mu\text{m}$) en Carbopol® a una velocidad de flujo alta, y tomaron imágenes de parte de la estructura en un lapso de tiempo. La alta presión y la velocidad de flujo parecen fracturar la fase Carbopol®, creando canales a microescala, pero la región inyectada se relajó marginalmente y permaneció estable (figura 15). La figura 15 ilustra: Se extruyó un contorno cuadrado de partículas (A) con una sección transversal promedio de $< 500 \mu\text{m}$ (B). Se generó una estructura lineal estable de diámetro $\sim 200 \mu\text{m}$ (C). La inyección manual de esferas de fluro creó una estructura "fracturada" (D) que se relajó brevemente y luego se estabilizó (E). *Estructuras celulares similares deben permanecer estables, aparte de la influencia de las fuerzas generadas por células.* Durante muchos días de crecimiento celular en Carbopol®, las partículas de polímero deben hincharse en medio de crecimiento celular. Los inventores han hecho una mezcla de medio de crecimiento celular Carbopol® en la que los inventores han cultivado células endoteliales aórticas humanas durante días sin signos de muerte celular.

Ejemplo: Pruebas de DC-9041: Estructuras aceite-acuosas

La inmiscibilidad de la fase celular y DC-9041 introduce una fuerza significativa: tensión interfacial, γ . La velocidad de extrusión, velocidad del extrusor, viscosidad de DC-9041 fluidizado, límite elástico de DC-9041 sólido, y γ , todos determinan la forma y la estabilidad de la estructura extruida. Cuando el límite elástico, σ_y , es demasiado bajo, no se pueden formar líneas; el equilibrio de γ y σ_y hace que las gotitas grandes permanezcan de forma irregular mientras que las gotitas pequeñas se vuelven esféricas. Cuando σ_y es grande, y la velocidad de extrusión y la velocidad del extrusor son altas, se pueden formar líneas estrechas ($d < 300 \mu\text{m}$). Las intersecciones de líneas estrechas son estables, y las características finas pueden extruirse con distancias de separación tan pequeñas como el tamaño de la característica estable. Las pruebas con medio de crecimiento celular funcionan mejor que las suspensiones acuosas de colorante o partículas (figura 16). La figura 16 ilustra: (A) Pequeño, las características lineales son inestables en tensión de bajo rendimiento DC-9041; la tensión superficial conduce pequeñas gotitas a formas esféricas; las gotitas grandes permanecen alargadas. (B, C) En tensiones de rendimiento intermedias, se generan gotitas más pequeñas y las gotitas de tamaño intermedio permanecen alargadas. (D) Con tensiones de alto rendimiento, Las líneas cruzadas perfectas se generan con diámetros de $\sim 250 \mu\text{m}$. (E) En tensiones de alto rendimiento, Se pueden dibujar dos ángulos rectos de forma estable con una distancia de separación de $< 100 \mu\text{m}$ en las esquinas. Barras de escala: 3 mm.

Ejemplo: Pruebas de células en DC-9041

Las estructuras toroides que contienen células epiteliales MDCK se extruyeron en el DC-9041 a bajas densidades. Las células se asentaron en el fondo del toroide y parecieron formar una banda continua a través de la cohesión célula-célula, contraerse hacia adentro y apretar la superficie interna. Las células parecían tomar una morfología extendida, de tipo contráctil similar a las células en superficies optimizadas para cultivo celular. Con el paso del tiempo, el radio interno del toroide disminuyó. La disminución en el radio puede generarse por la tensión celular colectiva que se origina en la contracción del citoesqueleto. El colapso asimétrico de un toroide apretó la banda celular en un tubo estrecho; Este tipo de fallo puede ser impulsado por la tensión del citoesqueleto. La realización de la correlación de imagen digital (PIV) en las películas de lapso de tiempo reveló un movimiento colectivo ecuatorial significativo, sugiriendo que emerge una vorticidad neta en esta geometría circular (figura 17). La figura 17 ilustra: (A) Las células dispersas se asientan en la superficie inferior de una gotita toroidal. (B) En ausencia de matriz, las células se unen formando una

banda y contrayéndose alrededor de la superficie interna. (C) Una imagen de gran aumento de las células en el panel B. (D) Una forma toroidal creada en un material de bajo rendimiento se colapsa asimétricamente, apretando un grupo de células hasta $\sim 30 \mu\text{m}$ de sección transversal. (E) En un toroide estable de los paneles B y C, las células contraen la superficie interna con el tiempo. (F) PIV en las células de los paneles B, C y E muestran una vorticalidad neta.

5

Aplicación a modo de ejemplo Gama de estructuras posibles

Para facilitar estudios eficientes de estructuras complejas, se puede crear una amplia gama de estructuras simples, como tubos lineales y curvos. La relación entre el diámetro del tubo y la velocidad de extrusión puede determinarse experimentalmente, crear un "libro de recetas" de datos para guiar estudios posteriores de estructuras complejas. Para aprovechar la versatilidad de los materiales de límite elástico, los límites de la estabilidad estructural pueden encontrarse en materiales sobre una amplia gama de límites elásticos. El límite elástico varía según la dilución con agua para Carbopol® y con aceite PDMS para DC-9041. Ajustar el límite elástico puede ser crucial para los estudios cuantitativos de las fuerzas celulares, a continuación. La propagación del estrés es sensible al tamaño y la velocidad de la boquilla de extrusión, que puede variar para maximizar el rango de estructuras posibles.

10
15

Marcadores fluorescentes para la observación directa del movimiento

A medida que las estructuras inestables colapsan y las estructuras estables generan o relajan el estrés, el material de límite elástico circundante puede desplazarse. Los marcadores pueden estar dispersos por los materiales de límite elástico para permitir la medición de los desplazamientos locales. En Carbopol®, las perlas fluorescentes pueden mezclarse con las partículas de microgel; las perlas grandes ($\sim 1 \mu\text{m}$) pueden quedar atrapadas entre microgeles. Como alternativa, si se requieren perlas más pequeñas o si se produce difusión de perlas, los microgeles pueden hincharse en una base fuerte (NaOH), permitiendo que las nanopartículas fluorescentes ($\sim 10 \text{ nm}$) se difundan en la malla polimérica y luego regresen el sistema a pH neutro, encogiendo los geles y atrapando las nanopartículas. Se pueden tomar enfoques similares con el fluido DC-9041. Los inventores han dispersado fluoroesferas acuosas en PDMS, con un intercambio gradual de solvente de agua a etanol a metanol. Las perlas suspendidas en metanol pueden dispersarse extremadamente bien en fluidos viscosos PDMS mediante sonicación con un sonicador de sonda de alta potencia. Si es necesario hinchar los micro geles DC-9041 para atrapar partículas en la malla de polímero, se puede usar hexano como agente de hinchamiento, y se pueden usar nanopartículas de PMMA debido a su estabilidad en hexano. El seguimiento 3D de partículas fluorescentes se puede realizar con microscopía confocal para medir desplazamientos; con suficientes datos, los campos de deformación se pueden calcular. Se pueden estudiar las propiedades del material de los materiales de límite elástico descritos en el presente documento con reología a granel, y las propiedades reológicas a granel conocidas de los materiales de límite elástico se pueden usar para calcular las tensiones (figuras 18A-C). La figura 18A-C ilustran: (A, B) Para desarrollar métodos de medición de fuerza óptica, los marcadores fluorescentes están incrustados en los YSM. (C) A medida que las estructuras celulares se mueven, los YSM circundantes están tensos. Si las propiedades del material del YSM se conocen en detalle, las tensiones pueden convertirse en tensiones en casos bien definidos.

20
25
30
35

Interfaz celular/soporte en estructuras simples

Los datos de los inventores muestran la compatibilidad de Carbopol® y DC-9041 con células cultivadas. El sorprendente comportamiento de "seguimiento" de Carbopol® durante la extrusión sugiere que cuando se usan mezclas de células y precursor de colágeno, la matriz de colágeno puede interdigitarse con canales abiertos cerca de la superficie de Carbopol®, creando enredos (figura 18D). La figura 18D ilustra cómo las estructuras de células/ECM formadas en Carbopol® pueden tener enredos en la interfaz. Por el contrario, la inmiscibilidad entre la mezcla de crecimiento celular y el fluido DC-9041 puede crear superficies lisas debido a la tensión interfacial. El precursor de colágeno puede adherirse a esta interfaz, formando conexiones a la matriz a granel; la adhesión no específica de colágeno al PDMS se usa de forma rutinaria para la adhesión celular en superficies planas (figura 18E). La figura 18E ilustra cómo las estructuras de células/ECM formadas en DC-9041 pueden tener interfaces suaves. En ambos casos, la energía de adhesión total puede escalar con el área de superficie. Sin embargo, las células de energía total se generan con escalas de estrés contráctil con el volumen y posiblemente la densidad celular. Por lo tanto, se puede estudiar la adhesión y separación de los conjuntos de matriz de células, en función del volumen y la densidad celular, en estructuras simples como esferas y cilindros. La contracción celular también puede manipularse con medicamentos como la blebbistatina y la trombina. Al realizar mediciones de lapso de tiempo durante largos períodos, se pueden determinar los efectos de la densidad celular; la densidad celular aumenta constantemente con el tiempo debido a la proliferación. La red de colágeno se puede obtener imágenes usando reflectancia confocal o marcando fluorescentemente colágeno con rodamina, utilizando la química EDC-NHS. Las células se pueden identificar utilizando tintes de células enteras (CMFDA), manchas nucleares (Hoechst), o enfoques de transfección.

40
45
50
55
60

Límite elástico y fuerzas celulares

Las diversas escalas de energía en la célula/sistema de soporte pueden competir para dar lugar a inestabilidades únicas. En un cilindro delgado, si las células se alinean axialmente, la tensión generada por células puede tomar el lugar de las fuerzas externas en el pandeo clásico de Euler, causando una curva de longitud de onda larga. Si el

65

material de soporte presta refuerzo lateral, puede surgir un pliegue de longitud de onda corta; la longitud de onda puede ser controlada por el módulo del material de soporte y la elasticidad de flexión del cilindro de colágeno celular. Si uno de estos modos surge con tensiones bajas, pero la tensión generada por las células aumenta por encima del límite elástico ($\sim 1/3$ del módulo de corte), El crecimiento de uno de estos modos de estado fundamental puede crecer sin control o la inestabilidad puede desaparecer porque el material de soporte ya no es sólido. Como alternativa, si las células generan gradientes de esfuerzo de corte en el cilindro, y el material de esfuerzo de fluencia se fluidifica, las oscilaciones interfaciales pueden surgir de manera análoga a las de la inestabilidad de Rayleigh-Plateau. El crecimiento de los modos de Rayleigh-Plateau podría causar la ruptura del tubo, determinar una escala de longitud máxima para estructuras estables, establecido por el estrés generado por la célula y la tensión interfacial entre las dos fases (figura 18F). La figura 18F ilustra cómo, dependiendo de las fuerzas dominantes en las estructuras, pueden surgir varios tipos de inestabilidades. Para explorar estas inestabilidades generadas por células, se pueden crear estructuras lineales con un rango de diámetros y longitudes, soportado en ambos tipos de material de límite elástico, preparado con una amplia gama de límites elásticos. Si la inestabilidad se puede clasificar, se puede determinar el tipo de fuerza emergente (tensión superficial, esfuerzo de corte, etc.). En el caso ideal, una única fuerza, desconocida, generada por la célula compite con una fuerza conocida en el material pasivo, permitiendo una medición de la fuerza generada por la célula.

Dinámica celular colectiva con restricciones topológicas

Los datos de los inventores demostraron la importancia de la topología: en un género = 1 objeto, las células forman una gran unidad estable sin ECM, y migrar colectivamente. Estos estudios pueden continuarse en volúmenes circulares y cuadrados para explorar muchas preguntas (figura 19A). La figura 19A ilustra cómo circulan las células en estructuras de género = 1, y las células migran hacia superficies de curvatura gaussiana o media preferida. El tamaño de la estructura puede variar para explorar la relación entre las fuerzas generadas por las células y la curvatura; la tensión puede estimarse midiendo la contracción de la superficie interna. Los volúmenes pueden llenarse con ECM para que las células puedan migrar a todas las superficies, probar si las células prefieren combinaciones específicas de curvatura gaussiana y media que existen en las estructuras de bucle. Se pueden comparar diferentes tipos de células, como células epiteliales, endoteliales y de fibroblastos para explorar la relación entre células de diferentes tejidos y diferentes tipos de curvatura. Las células pueden ser sensibles a la topología y la curvatura media o gaussiana, proporcionando una nueva clase de orientación celular para muchas aplicaciones.

Vorticidad en bucles

La longitud de correlación a gran escala observada en las mediciones del movimiento celular colectivo en toroides, y la aparente vorticidad, plantea una pregunta sobre si el tamaño del bucle puede controlar una transición entre la circulación colectiva y el movimiento aleatorio. La migración colectiva se puede explorar en estructuras de bucle de diferentes tamaños para buscar dicha transición. Pueden circular pequeños bucles, y cuando la circunferencia de un bucle excede una longitud de correlación natural, controlado por la dinámica celular individual, se puede producir un movimiento aleatorio. La circulación colectiva controlada se puede utilizar para estudiar pares de bucles para buscar coordinación en escalas más grandes (figura 19B). La figura 19B ilustra cómo surge la circulación cooperativa en pares de bucles, junto con el esfuerzo de corte. Los bucles vecinos pueden coordinarse en direcciones opuestas, minimizando el esfuerzo de corte en la interfaz. Estos estudios pueden realizarse en bucles sin ECM y en bucles llenos de ECM. La curvatura puede confundir el efecto; bucles más pequeños pueden promover la circulación colectiva, pero su alta curvatura puede inhibir la migración.

Un enrejado para revestir el espacio y los patrones de migración colectiva

La coordinación de la migración celular en bucles proximales, incluso débilmente, puede permitir repetir el patrón en una gran red para amplificar la coordinación, análogo a los efectos dependientes del tamaño en el magnetismo. Las analogías entre la migración celular colectiva y los efectos colectivos en los sistemas de espín magnético pueden explorarse mediante la creación de redes multicelulares de diferentes tamaños y simetrías. Los vórtices celulares coordinados pueden ser análogos a los espines anti-ferromagnéticos; los vórtices de células vecinas pueden rotar en direcciones opuestas, junto con el esfuerzo de corte. La disposición de las células en una red con simetría cuadrada puede generar una fase anti-ferromagnética; todo el espacio puede ser revestido por vórtices contrarrotativos. Por el contrario, colocando células en una red con simetría hexagonal (técnicamente una red de panal en este caso), la frustración geométrica puede suprimir la coordinación macroscópica de vórtices rotativos. La fase hexagonal puede ser análoga a un cristal giratorio. El acoplamiento de esfuerzo de corte puede no ser la única fuerza impulsora potencial para estas fases; El flujo celular a través de los nodos puede ser muy diferente en las dos redes. En una red cuadrada, cada nodo puede tener dos entradas y dos salidas; en una red hexagonal, cada nodo puede tener una entrada y dos salidas, o viceversa (figura 19C, D). La figura 19C, D ilustra: (C) Las células en una red cuadrada forman una fase anti-ferromagnética. (D) Las células en una red hexagonal (panal) forman un cristal giratorio. Las flechas indican la dirección de migración celular. Las flechas amarillas indican caminos cooperativos; las flechas rojas indican caminos frustrados. El uso de la simetría como principio para controlar el movimiento colectivo puede representar una nueva clase de guía celular.

Dimensionalidad en la estabilidad de la fase colectiva

Tanto en los sistemas de equilibrio como en los de no equilibrio, como las estructuras celulares descritas en el presente documento, el grado de ordenamiento, determinado por la competencia entre fluctuaciones aleatorias y las fuerzas que promueven el orden, puede depender de la dimensionalidad del sistema. Para explorar la dependencia del orden en la dimensión del sistema, redes 1D, 2D y 3D pueden crearse con características idénticas y comparar correlaciones espacio-temporales en la migración celular entre las tres. El verdadero orden de largo alcance puede no estar presente en ningún sistema, sin embargo, el orden 2D puede tener un rango mayor que el orden 1D, en analogía con la inestabilidad de Ladau-Pierls. Adicionalmente, puede haber una gran diferencia entre la coordinación anti-ferromagnética y la vorticidad celular en 3D. Todo el espacio se puede colocar en mosaico con giros antiparalelos en una red cúbica porque todos los giros se pueden alinear a lo largo de un solo eje. Por el contrario, la dirección de "giro" en un vórtice giratorio en una red cúbica es normal a la cara del cubo en el que se asienta. Puede ser imposible revestir todo el espacio con estos giros, y puede producirse frustración geométrica 3D.

Problemas y enfoques alternativos

La adhesión insuficiente entre las estructuras celulares y el YSM puede provocar la delaminación en la interfaz. Esto puede mitigarse mediante la modificación química del material YSM; Carbopol® es un polímero a base de acrilato, y la unión covalente de proteínas es directa. Como alternativa, el colapso de varias estructuras delaminadas puede proporcionar información igualmente valiosa sobre el comportamiento celular colectivo en estructuras complejas.

Referencias

Se mencionan las siguientes referencias:

1. Dimitriou, C.J., R.H. Ewoldt y G.H. McKinley, Describiendo y prescribiendo la respuesta constitutiva de los fluidos de límite elástico usando el esfuerzo de corte oscilatorio de gran amplitud (LAOStress). *Journal of Rheology*, 2013. 57: p. 27.
2. Menut, P., S. Seiffert, J. Sprakel y D.A. Weitz, ¿Importa el tamaño? Elasticidad de suspensiones comprimidas de microgeles coloidales y granulares. *Soft matter*, 2012. 8 (1): p. 156-164.
3. Moller, P., A. Fall, V. Chikkadi, D. Derks y D. Bonn, Un intento de clasificar el comportamiento del fluido de estrés por fluencia. *Transacciones filosóficas de la Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2009. 367 (1909): p. 5139-5155.
4. Møller, P., A. Fall y D. Bonn, Origen de la viscosidad aparente en los fluidos bajo límite elástico por debajo de la fluencia. *EPL (Europhysics Letters)*, 2009. 87 (3): pág. 38004.
5. Mattsson, J., H.M. Wyss, A. Fernandez-Nieves, K. Miyazaki, Z. Hu, D.R. Reichman y D.A. Weitz, Los coloides suaves hacen cristales fuertes. *Nature*, 2009. 462 (7269): p. 83-86.
6. Coussot, P., L. Tocquer, C. Lanos y G. Ovarlez, Reología macroscópica versus reología local de los fluidos de estrés por fluencia. *Journal of non-newtonian fluid mechanics*, 2009. 158 (1): p. 85-90.
7. Steinberg, M.S., ¿La adhesión diferencial gobierna los procesos de autoensamblaje en la histogénesis? Configuraciones de equilibrio y la aparición de una jerarquía entre las poblaciones de células embrionarias. *Journal of Experimental Zoology*, 1970. 173 (4): p. 395-433.
8. Steinberg, M.S. y L.L. Wiseman, ¿Los reordenamientos del tejido morfogenético requieren movimientos celulares activos? La inhibición reversible de la clasificación celular y la diseminación de tejidos por la citocalasina B. *The Journal of cell biology*, 1972. 55 (3): p. 606-615.
9. Steinberg, M.S., Adhesión diferencial en la morfogénesis: una visión moderna. *Current opinion in genetics & development*, 2007. 17 (4): p. 281-286.
10. Schötz, E.M., R.D. Burdine, F. Jillicher, M.S. Steinberg, C.P. Heisenberg y R.A. Foty, Las diferencias cuantitativas en la tensión superficial del tejido influyen en el posicionamiento de la capa germinal del pez cebra. *HFSP journal*, 2008. 2 (1): p. 42-56.
11. Eastwood, M., D.A. McGrouther y R.A. Brown, Un monitor de fuerza de cultivo para medir las fuerzas de contracción generadas en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos: evidencia de señalización mecánica de la matriz celular. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1994. 1201 (2): p. 186-192.
12. Zaman, M.H., L.M. Trapani, A.L. Sieminski, D. MacKellar, H. Gong, R.D. Kamm, A. Wells, D.A. Lauffenburger y P. Matsudaira, La migración de células tumorales en matrices 3D se rige por la rigidez de la matriz junto con la adhesión y la proteólisis de la matriz celular. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. 103 (29): p.

10889-10894.

- 5 13. Provenzano, P.P., D.R. Inman, K.W. Eliceiri, S.M. Trier y P.J. Keely, La migración celular tridimensional mediada por la guía de contacto está regulada por la reorganización de la matriz dependiente de Rho/ROCK. *Biophysical journal*, 2008. 95 (11): p. 5374-5384.
14. Kraning-Rush, C.M., S.P. Carey, J.P. Califano, B.N. Smith y C.A. Reinhart-King, El papel del citoesqueleto en la generación de fuerza celular en entornos 2D y 3D. *Physical biology*, 2011. 8 (1): pág. 015009.
- 10 15. Lutolf, M., J. Lauer-Fields, H. Schmoekel, A. Met-ters, F. Weber, G. Fields y J. Hubbell, Hidrogeles sensibles a metaloproteinasas de matriz sintética para la conducción de la regeneración de tejidos: características de ingeniería de invasión celular. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100 (9): p. 5413-5418.
- 15 16. Raeber, G., M. Lutolf y J. Hubbell, Hidrogeles de PEG de ingeniería molecular: un nuevo sistema modelo para la migración celular mediada proteolíticamente. *Biophysical journal*, 2005. 89 (2): p. 1374-1388.
17. Beningo, K.A., C.-M. Lo y Y.-L. Wang, Sustratos de poli(acrilamida) flexibles para el análisis de interacciones mecánicas en las adherencias entre células y sustratos. *Methods in cell biology*, 2002. 69: p. 325-339.
- 20 18. Marshall, A.J., C.A. Irvin, T. Barker, E.H. Sage, K.D. Hauch, y B.D. Ratner, Biomateriales con un tamaño de poro bien controlado que promueve el crecimiento vascular. *Polymer Preprints*, American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry, 2004. 45 (2): p. 100-101.
- 25 19. Isenhardt, S., Y. Fukano, M. Usui, R. Underwood, C. Irvin, A. Marshall, K. Hauch, B. Ratner, P. Fleckman y J. Olerud, Un modelo de ratón para evaluar la interfaz entre la piel y un dispositivo percutáneo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007. 83 (4): p. 915-922.
- 30 20. Madden, L.R., D.J. Mortisen, E.M. Sussman, S.K. Dupras, J.A. Fugate, J.L. Cuy, K.D. Hauch, M.A. Laflamme, C.E. Murry y B.D. Ratner, Andamios proangiogénicos como plantillas funcionales para la ingeniería del tejido cardíaco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107 (34): p. 15211-15216.
21. Linnes, M.P., B.D. Ratner y C.M. Giachelli, Un andamio microporoso de precisión basado en fibrinógeno para la ingeniería de tejidos. *Biomaterials*, 2007. 28 (35): p. 5298-5306.
- 35 22. Ratner, B.D. y S. Atzet, Hidrogeles para la curación, en *Hydrogels2009*, Springer, pag. 43-51.
23. Barry, R.A., R.F. Shepherd, J.N. Hanson, R.G. Nuzzo, P. Wiltzius y J.A. Lewis, Montaje de escritura directa de andamios de hidrogel 3D para el crecimiento celular guiado. *Advanced Materials*, 2009. 21 (23): p. 2407-2410.
- 40 24. Shepherd, J.N.H., S.T. Parker, R.F. Shepherd, M.U. Gillette, J.A. Lewis y R.G. Nuzzo, Andamios de hidrogel microperiódico 3D para cultivos neuronales robustos. *Advanced functional materials*, 2011. 21 (1): pág. 47.
- 45 25. Sun, L., S.T. Parker, D. Sjoji, X. Wang, J.A. Lewis y D.L. Kaplan, Montaje de escritura directa de andamios de seda/hidroxiapatita 3D para cocultivos óseos. *Advanced healthcare materials*, 2012. 1 (6): p. 729-735.
26. Miller, J.S., K.R. Stevens, M.T. Yang, B.M. Baker, D.-H.T. Nguyen, D.M. Cohen, E. Toro, A.A. Chen, P.A. Galie y X. Yu, Fundición rápida de redes vasculares estampadas para tejidos tridimensionales de ingeniería perfusable. *Nature materials*, 2012.
- 50 27. Greiner, A.M., B. Richter y M. Bastmeyer, Andamios 3D de microingeniería para estudios de cultivo celular. *Macromolecular bioscience*, 2012. 12 (10): p. 1301-1314.
28. Xu, C., W. Chai, Y. Huang y R.R. Markwald, Impresión de inyección de tinta sin andamios de tubos celulares en zigzag tridimensionales. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012. 109 (12): p. 3152-3160.
- 55 29. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro y S.F. Badylak, Descelularización de tejidos y órganos. *Biomaterials*, 2006. 27 (19): p. 3675-3683.
- 60 30. Crapo, P.M., T.W. Gilbert y S.F. Badylak, Una visión general de los procesos de descelularización de tejidos y órganos completos. *Biomaterials*, 2011. 32 (12): p. 3233-3243.
31. Amensag, S. y P.S. McFetridge, Rodando el amnios humano para diseñar tejidos vasculares laminados. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2012. 18 (11): p. 903-912.
- 65 32. Amensag, S. y P.S. McFetridge, Ajuste de la mecánica del andamio mediante la laminación de membranas de la matriz extracelular nativa y los efectos sobre la remodelación celular temprana. *Journal of Biomedical Materials*

Research Part A, 2013.

- 5 33. Jin, C.Z., S.R. Park, B.H. Choi, K.-Y. Lee, C.K. Kang y B.-H. Min, Membrana amniótica humana como matriz de administración para la reparación del cartílago articular. *Tissue engineering*, 2007. 13 (4): p. 693-702.
34. Mligiliche, N., K. Endo, K. Okamoto, E. Fujimoto y C. Ide, Matriz extracelular de amnios humanos fabricados en tubos como conductos para la regeneración nerviosa periférica. *Journal of biomedical materials research*, 2002. 63 (5): p. 591-600.
- 10 35. Mohammad, J., J. Shenaq, E. Rabinovsky y S. Shenaq, Modulación de la regeneración nerviosa periférica: un enfoque de ingeniería de tejidos. El papel del conducto nervioso del tubo de amnios a través de un espacio nervioso de 1 centímetro. *Plastic and reconstructive surgery*, 2000. 105 (2): p. 660-666.
- 15 36. Ott, H.C., T.S. Matthiesen, S.-K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff y D.A. Taylor, Matriz descelularizada de perfusión: utilizando la plataforma de la naturaleza para diseñar un corazón bioartificial. *Nature medicine*, 2008. 14 (2): p. 213-221.
- 20 37. Petersen, T.H., E.A. Calle, L. Zhao, E.J. Lee, L. Gui, M.B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z.W. Zhuang y C. Breuer, Pulmones de ingeniería tisular para implantación *in vivo*. *Science*, 2010. 329 (5991): p. 538-541.
38. Guo, S., X. Ren, B. Wu y T. Jiang, Preparación del andamio acelular de la médula espinal y el estudio de la biocompatibilidad. *Spinal cord*, 2010. 48 (7): p. 576-581.
- 25 39. Uygun, B.E., A. Soto-Gutiérrez, H. Yagi, M.-L. Izamis, M.A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles y F. Berthiaume, Reingeniería de órganos a través del desarrollo de un injerto de hígado recelularizado trasplantable usando matriz de hígado descelularizada. *Nature medicine*, 2010. 16 (7): p. 814-820.
- 30 40. Baiguera, S., P. Jungebluth, A. Burns, C. Mavilia, J. Haag, P. De Coppi y P. Macchiarini, Tráqueas humanas diseñadas por ingeniería de tejidos para implantación *in vivo*. *Biomaterials*, 2010. 31 (34): p. 8931-8938.
41. Roberts, G.P. y H.A. Barnes, Nuevas mediciones de las curvas de flujo para dispersiones de Carbopol sin artefactos de deslizamiento. *Rheologica acta*, 2001. 40 (5): p. 499-503.
- 35 42. Piau, J., Geles de Carbopol: Gafas elastoviscoplasticas y resbaladizas hechas de esponjas hinchadas individuales: Propiedades meso y macroscópicas, ecuaciones constitutivas y leyes de escala. *Journal of non-newtonian fluid mechanics*, 2007. 144 (1): p. 1-29.
43. Barnes, H.A., *El límite elástico, una revisión o 'παντα ρει', ¿todo fluye?* *Journal of non-newtonian fluid mechanics*, 1999. 81 (1): p. 133-178.
- 40 44. Moller, P.C., J. Mewis y D. Bonn, Estrés de rendimiento y tixotropía: en la dificultad de medir los estreses de rendimiento en la práctica. *Soft matter*, 2006. 2 (4): p. 274-283.
- 45 45. Romeo, G., A. Fernandez-Nieves, H.M. Wyss, D. Acierno y D.A. Weitz, Transiciones a temperatura controlada entre cristal, Estados líquidos y gel en suspensiones densas de p-NIPA. *Advanced Materials*, 2010. 22 (31): p. 3441-3445.
- 50 46. Bindschadler, M. y J.L. McGrath, La migración de hojas por monocapas heridas como una propiedad emergente de la dinámica unicelular. *J Cell Sci*, 2007. 120 (5): p. 876-884.
47. Trepap, X., M.R. Wasserman, T.E. Angelini, E. Millet, D.A. Weitz, J.P. Butler y J.J. Fredberg, Fuerzas físicas durante la migración celular colectiva. *Nat Phys*, 2009. 5.
- 55 48. Poujade, M., E. Grasland-Mongrain, A. Hertzog, J. Jouanneau, P. Chavrier, B. Ladoux, A. Buguin y P. Silberzan, Migración colectiva de una monocapa epitelial en respuesta a una herida modelo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. 104 (41): p. 15988-15993.
- 60 49. Szabo, B., G.J. Szollosi, B. Gonci, Z. Juranyi, D. Selmeczi y T. Vicsek, Transición de fase en la migración colectiva de células de tejido: Experimento y modelo. *Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics)*, 2006. 74 (6): p. 061908-5.
- 65 50. Kurten, R.C., P. Chowdhury, R.C. Sanders, Jr., L.M. Pittman, L.W. Sessions, T.C. Chambers, C.S. Lyle, B.J. Schnackenberg y S.M. Jones, La coordinación de la motilidad inducida por el factor de crecimiento epidérmico promueve el cierre eficiente de la herida. *Soy J Physiol Cell Physiol*, 2005. 288 (1): pág. C109-121.
51. Haga, H., C. Irahara, R. Kobayashi, T. Nakagaki y K. Kawabata, Movimiento colectivo de células epiteliales en

un sustrato de gel de colágeno. *Biophysical Journal*, 2005. 88 (3): p. 2250-2256.

52. Farooqui, R. y G. Fenteany, Múltiples filas de células detrás del borde de la herida epitelial extienden lamellipodia críptica para impulsar colectivamente el movimiento de la lámina celular. *J Cell Sci*, 2005. 118 (1): p. 51-63.
53. Tambe, D.T., C.C. Hardin, T.E. Angelini, K. Randndran, C.Y. Park, X. Serra-Picamal, E.H. Zhou, M.H. Zaman, J.P. Butler y D.A. Weitz, Orientación celular colectiva mediante fuerzas intercelulares cooperativas. *Nature materials*, 2011. 10 (6): p. 469-475.
54. Angelini, T.E., E. Hannezo, X. Trepát, J.J. Fredberg y D.A. Weitz, Migración celular impulsada por patrones cooperativos de deformación del sustrato. *Physical Review Letters*, 2010. 104 (16): pág. 168104.
55. Angelini, T.E., E. Hannezo, X. Trepát, M. Marquez, J.J. Fredberg y D.A. Weitz, Dinámica cristalina de la migración celular colectiva. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. 108 (12): p. 4714-4719.
56. Suaris, M., J.A. Breaux, S.P. Zehnder y T.E. Angelini. Nucleación y crecimiento de grupos de células epiteliales en AIP Conference Proceedings. 2013.
57. Saunders, B.R. y Vincent, B. Partículas de microgel como coloides modelo: teoría, propiedades y aplicaciones. *Advances in Colloid and Interface Science* 80, 1-25 (1999).
58. O'Hern, C.S., Silbert, L.E., Liu, A.J. y Nagel, S.R. Sobrecarga temperatura cero y tensión aplicada cero: El epítome del desorden. *Physical Review E* 68, 011306 (2003).
59. Liu, A.J. y Nagel, S. R. Nonlinear dynamics: La sobrecarga ya no es genial. *Nature* 396, 21-22 (1998).
60. Cates, M., Wittmer, J., Bouchaud, J.-P. y Claudin, P. Sobrecarga, cadenas de fuerza y materia frágil. *Physical review letters* 81, 1841 (1998).
61. Liu, A.J. y Nagel, S.R. Sobrecarga y reología: dinámica restringida en escalas microscópicas y macroscópicas. (CRC Press, 2001).
62. Bi, D., Zhang, J., Chakraborty, B. y Behringer, R. Sobrecarga por cizalla. *Nature* 480, 355-358 (2011).
63. Corwin, E.I., Jaeger, H.M. y Nagel, S.R. Firma estructural de interferencia en medios granulares. *Nature* 435, 1075-1078 (2005).
64. Schweizer, K.S. y Yatsenko, G. Colisiones, enjaulamiento, termodinámica y sobrecarga en la teoría de salto de barrera de fluidos de esfera dura vítrea. *The Journal of Chemical Physics* 127, 164505 (2007).
65. Cho, E.C., Kim, J.-W., Fernández-Nieves, A. y Weitz, D.A. Andamios de hidrogel altamente sensibles formados por la organización tridimensional de nanopartículas de microgel. *Nano letters* 8, 168-172 (2008).
66. Fernández-Nieves, A., Wyss, H., Mattsson, J. y Weitz, D.A. Microgel suspensiones: fundamentos y aplicaciones. (John Wiley & Sons, 2010).
67. Debord, J.D., Eustis, S., Byul Debord, S., Lofye, M.T. y Lyon, L.A. Color - Cristales coloidales sintonizables de nanopartículas de hidrogel suave. *Advanced materials* 14, 658-662 (2002).

Habiendo así descrito varios aspectos de al menos una realización de esta invención, es de apreciar que los expertos en la materia encontrarán varias alteraciones, modificaciones y mejoras fácilmente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para crear una estructura tridimensional dentro de un primer material (120), comprendiendo el método:

5 causar un cambio de fase en una región (140) del primer material (120) aplicando energía enfocada a la región usando una fuente de energía enfocada (130); y
 10 desplazar el primer material (120) en la región (140) con un segundo material (160), en donde el primer material (120) es un material Herschel-Bulkley que tiene un límite elástico inferior a 100 Pascales, y
 en donde el límite elástico se determina cortando el material en un reómetro usando geometría placa-placa y
 mediante la ecuación de Herschel-Bulkley $\sigma = \sigma_y + ky^p$, donde σ_y es el límite elástico, σ es el esfuerzo de corte, k
 es el índice de viscosidad del material, y es la velocidad de corte y p es un número positivo, en donde cuando se
 usa el reómetro, el material se corta a varias velocidades de corte que se extienden desde 1000 s^{-1} a $0,001 \text{ s}^{-1}$ y
 para cada velocidad de corte, el material se corta durante 30 segundos, después de lo cual se recopilan y
 promedian los datos de esfuerzo de corte.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que: la fuente de energía enfocada (130) está configurada para causar un cambio de fase inversa en la región (140) del primer material (120); o en el que el primer material (120), que es un material de Herschel-Bulkley, comprende un gel granular blando, preferentemente en donde el gel granular blando está hecho de micropartículas poliméricas empaquetadas, tal como en donde las micropartículas poliméricas empaquetadas tienen un diámetro de entre 0,1 y 100 micrómetros, o en donde las micropartículas poliméricas empaquetadas tienen aproximadamente 5 micrómetros de diámetro, o en donde las micropartículas poliméricas empaquetadas están a una concentración en peso en el gel granular blando de menos del 2 %, opcionalmente en donde las micropartículas empaquetadas poliméricas están a una concentración en peso en el gel granular blando de entre el 0,5 % y el 1 %; o en donde las micropartículas empaquetadas poliméricamente están a una concentración en masa en el gel granular blando de entre el 0,2 % y el 0,7 %; o en donde el primer material comprende un hidrogel, tal como en donde el hidrogel comprende un polímero de carbómero, o en donde el hidrogel comprende polímeros reticulados de ácido acrílico, o en donde el hidrogel comprende un microgel polielectrolítico.

30 3. El método de la reivindicación 1, en el que el primer material (120) comprende un gel granular blando y el gel granular blando está hecho de micropartículas compactas poliméricas y en donde el primer material (120) comprende una dispersión de elastómero de silicona, preferentemente en donde la dispersión de elastómero de silicona comprende un elastómero de silicona disperso en PDMS.

35 4. El método de la reivindicación 1, en el que: el límite elástico del primer material (120) está entre 1 y 100 Pascales, preferentemente en el que el límite elástico del primer material (120) está entre 10 y 100 Pascales; o en el que un esfuerzo de corte del primer material (120) es independiente de la velocidad de corte a una velocidad de corte de 10^{-3} s^{-1} ; o en el que el esfuerzo de corte del primer material (120) a una velocidad de corte de 10^{-3} s^{-1} depende solo de un componente elástico del primer material (120); o en el que el límite elástico del primer material (120) está por debajo de una presión hidrostática del primer material (120); o en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 2,5 segundos, preferentemente en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1,5 segundos, tal como en donde el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1 segundo; o en el que el primer material (120) tiene un índice tixotrópico de entre 4 y 7, preferentemente en el que el primer material (120) tiene un índice tixotrópico entre 4 y 6, tal como en donde el primer material (120) tiene un índice tixotrópico entre 4 y 5, opcionalmente en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1,5 segundos, preferentemente en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1 segundo; o en el que el primer material (120) y el segundo material (160) son miscibles; o en el que el segundo material (160) comprende una solución precursora de materiales de matriz extracelular; o en el que el segundo material (160) comprende una o más células; o en el que el desplazamiento comprende:

50 inyectar, con un inyector, el segundo material (160) en el primer material (120); y
 con el paso del tiempo, desplazar relativamente el primer material (120) con respecto al inyector (150), preferentemente en donde el desplazamiento relativo del primer material (120) con respecto al inyector (150) comprende la rotación relativa del primer material (120) con respecto al inyector (150), tal como donde la rotación relativa del primer material (120) con respecto al inyector (150) comprende rotación alrededor de un eje del primer material (120), o en donde el desplazamiento relativo comprende desplazar relativamente el primer material (120) con respecto al inyector (150) a una velocidad de desplazamiento más rápida que un tiempo de ruptura característico de un chorro del segundo material (160).

60 5. El método de la reivindicación 1, en el que: el desplazamiento comprende, con el paso del tiempo, desplazar relativamente un punto de enfoque de la fuente de energía enfocada (130) con respecto al primer material (120), preferentemente en el que:
 el desplazamiento comprende además inyectar, con un inyector (150), el segundo material (160) en el primer material (120) y mover el inyector (150) con el tiempo; y
 el desplazamiento relativo comprende el movimiento de sincronización del inyector (150) con el desplazamiento relativo del punto focal de la fuente de energía enfocada (130); o que comprende además liberar el primer material (120) de la contención; o que comprende además:

5 lavar el primer material (120) para liberar el segundo material (160) del primer material (120), preferentemente en donde el lavado comprende inyectar una o más sales y/o solventes orgánicos en el primer material (120); o en donde el desplazamiento comprende desplazar el primer material (120) con el segundo material (160) durante un tiempo indefinido; o en donde el desplazamiento comprende el desplazamiento continuo del primer material (120) con el segundo material (160) durante más de un día.

6. Un cartucho para impresión tridimensional, comprendiendo el cartucho:

10 una carcasa configurada para inserción en un dispositivo de impresión tridimensional;
 un hueco en la carcasa;
 un primer material (120) dentro del hueco, comprendiendo el primer material (120) un material Herschel-Bulkley que tiene un límite elástico inferior a 100 Pascales; y
 una abertura en la carcasa configurada para que un inyector (150) pase a través de la carcasa hacia el hueco y desplace el primer material (120) con un segundo material (160),
 15 en donde el primer material (120) es permeable por la energía enfocada aplicada a una región (140) del primer material (120) usando una fuente de energía enfocada (130), y
 en donde el límite elástico se determina cortando el material en un reómetro usando geometría placa-placa y mediante la ecuación de Herschel-Bulkley $\sigma = \sigma_y + k\dot{\gamma}^p$, donde σ_y es el límite elástico, σ es el esfuerzo de corte, k es el índice de viscosidad del material, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte y p es un número positivo, en donde cuando se
 20 usa el reómetro, el material se corta a varias velocidades de corte que se extienden desde 1000 s^{-1} a $0,001 \text{ s}^{-1}$ y para cada velocidad de corte, el material se corta durante 30 segundos, después de lo cual se recopilan y promedian los datos de esfuerzo de corte.

25 7. El cartucho de la reivindicación 6, en el que: la fuente de energía enfocada está configurada para causar un cambio de fase inversa en la región del primer material (120); o en el que el primer material (120) que es un material de Herschel-Bulkley comprende un gel granular blando, preferentemente en donde el gel granular blando está hecho de micropartículas poliméricas empaquetadas, opcionalmente en donde las micropartículas con relleno polimérico tienen entre 0,1 y 100 micrómetros de diámetro, o en donde las micropartículas con relleno polimérico están a una
 30 concentración en peso en el gel granular blando de menos del 2 %, tal como en donde las micropartículas empaquetadas poliméricas están a una concentración en peso en el gel granular blando de entre el 0,5 % y el 1 %, o en donde las micropartículas empaquetadas poliméricas están a una concentración en masa en el gel granular blando de entre el 0,2 % y el 0,7%, o en donde el primer material (120) comprende un hidrogel, tal como en donde el hidrogel comprende un polímero de carbón, o en donde el hidrogel comprende polímeros reticulados de ácido acrílico, o
 35 en donde el hidrogel comprende un microgel polielectrolítico, o en donde el primer material (120) comprende una dispersión de elastómero de silicona, tal como en donde la dispersión de elastómero de silicona comprende un elastómero de silicona disperso en PDMS.

40 8. El cartucho de la reivindicación 6, en el que: el límite elástico del primer material (120) está entre 1 y 100 Pascales, tal como donde el límite elástico del primer material (120) está entre 10 y 100 Pascales; o en el que un esfuerzo de corte del primer material (120) es independiente de la velocidad de corte a una velocidad de corte de 10^{-3} s^{-1} ; o en el que el esfuerzo de corte del primer material (120) a una velocidad de corte de 10^{-3} s^{-1} depende solo de un componente elástico del primer material (120); o en el que el límite elástico del primer material (120) está por debajo de una presión hidrostática del primer material (120); o en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25
 45 segundos y 2,5 segundos, preferentemente en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1,5 segundos, tal como en donde el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1 segundo; o en el que el primer material (120) tiene un índice tixotrópico de entre 4 y 7; preferentemente en el que el primer material (120) tiene un índice tixotrópico de entre 4 y 6, tal como en donde el primer material (120) tiene un índice tixotrópico entre 4 y 5, por ejemplo en donde el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de
 50 entre 0,25 segundos y 1,5 segundos, opcionalmente en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1 segundo; o en el que el primer material (120) y el segundo material (160) son miscibles; o en el que el segundo material (160) comprende una solución precursora de materiales de matriz extracelular; o en el que el segundo material (160) comprende una o más células; o que comprende además:
 una plataforma configurada para causar un desplazamiento relativo entre el primer material (120) y el inyector (150),
 55 preferentemente en el que el desplazamiento relativo entre el primer material (120) y el inyector (150) comprende una rotación relativa entre el primer material (120) y el inyector (150), tal como donde la rotación relativa entre el primer material (120) y el inyector (150) comprende la rotación alrededor de un eje del primer material (120), opcionalmente en el que la plataforma está configurada para provocar el desplazamiento relativo entre el primer material (120) y el
 60 inyector (150) a una velocidad de desplazamiento más rápida que un tiempo de ruptura característico de un chorro del segundo material (160).

9. El cartucho de la reivindicación 6, que comprende, además:
 un actuador (290) configurado para causar desplazamiento relativo entre un punto de enfoque de la fuente de energía enfocada y el primer material (220), preferentemente en donde la plataforma y/o el actuador (290) están configurados
 65 de tal manera que el movimiento de la plataforma está sincronizado con el movimiento del actuador (290); o en el que el primer material (220) es liberable de la contención; o que comprende además:

un segundo inyector para lavar el primer material (120) para liberar el segundo material (160) del primer material (120), preferentemente en donde el segundo inyector está configurado para inyectar una o más sales y/o disolventes orgánicos en el primer material (120); o en el que el inyector está configurado para desplazar el primer material (120) con el segundo material (160) durante un tiempo indefinido; o en donde el inyector está configurado para desplazar continuamente el primer material (120) con el segundo material (160) durante un tiempo superior a un día.

10. Un aparato (100) para crear una estructura tridimensional, comprendiendo el aparato:

un contenedor (110) que contiene un primer material (120);

una fuente de energía enfocada (130) configurada para causar un cambio de fase en una región (140) del primer material (120) aplicando energía enfocada a la región (140); y

un inyector (150) configurado para desplazar el primer material (120) en la región (140) con un segundo material (160),

en el que el primer material (120) es un material Herschel-Bulkley que tiene un límite elástico inferior a 100 Pascales, y

en el que el límite elástico se determina cortando el material en un reómetro usando geometría placa-placa y mediante la ecuación de Herschel-Bulkley $\sigma = \sigma_y + k\dot{\gamma}^p$, donde σ_y es el límite elástico, σ es el esfuerzo de corte, k es el índice de viscosidad del material, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte y p es un número positivo, en donde cuando se usa el reómetro, el material se corta a varias velocidades de corte que se extienden desde 1000 s^{-1} a $0,001 \text{ s}^{-1}$ y para cada velocidad de corte, el material se corta durante 30 segundos, después de lo cual se recopilan y promedian los datos de esfuerzo de corte.

11. El aparato (100) de la reivindicación 10, en el que: la fuente de energía enfocada (130) está configurada para causar un cambio de fase inversa en la región (140) del primer material (120); o en el que el primer material (120) que es un material de Herschel-Bulkley comprende un gel granular blando, preferentemente en donde el gel granular blando está hecho de micropartículas poliméricas empaquetadas, tal como en donde las micropartículas poliméricas empaquetadas tienen un diámetro de entre 0,1 y 100 micrómetros, o en donde las micropartículas poliméricas empaquetadas tienen aproximadamente 5 micrómetros de diámetro, o en donde las micropartículas poliméricas empaquetadas están a una concentración en peso en el gel granular blando de menos del 2 %, preferentemente en donde las micropartículas empaquetadas poliméricas están a una concentración en peso en el gel granular blando de entre el 0,5 % y el 1 %, o en donde las micropartículas empaquetadas poliméricas están a una concentración en masa en el gel granular blando de entre el 0,2 % y el 0,7 %, o en donde el primer material (120) comprende un hidrogel, opcionalmente en donde el hidrogel comprende un polímero de carbón, o en donde el hidrogel comprende polímeros reticulados de ácido acrílico, o en donde el hidrogel comprende un microgel polielectrolítico, o en donde el primer material (120) comprende una dispersión de elastómero de silicona, tal como en donde la dispersión de elastómero de silicona comprende un elastómero de silicona disperso en PDMS.

12. El aparato (100) de la reivindicación 10, en el que: el límite elástico del primer material (120) está entre 1 y 100 Pascales; tal como donde el límite elástico del primer material (120) está entre 10 y 100 Pascales; o en el que un esfuerzo de corte del primer material (120) es independiente de la velocidad de corte a una velocidad de corte de 10^{-3} s^{-1} ; o en el que el esfuerzo de corte del primer material (120) a una velocidad de corte de 10^{-3} s^{-1} depende solo de un componente elástico del primer material (120); o en el que el límite elástico del primer material (120) está por debajo de una presión hidrostática del primer material (120); o en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 2,5 segundos, tal como donde el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1,5 segundos, preferentemente en el que el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1 segundo; o en el que el primer material (120) tiene un índice tixotrópico entre 4 y 7, tal como en donde el primer material (120) tiene un índice tixotrópico de entre 4 y 6, o en donde el primer material (120) tiene un índice tixotrópico de entre 4 y 5, preferentemente en donde el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1,5 segundos, opcionalmente en donde el primer material (120) tiene un tiempo tixotrópico de entre 0,25 segundos y 1 segundo; o en donde el primer material (120) y el segundo material (160) son miscibles; o en donde el segundo material (160) comprende una solución precursora de materiales de matriz extracelular; o en donde el segundo material (160) comprende una o más células.

13. El aparato (100) de la reivindicación 10, que comprende además: una plataforma configurada para causar un desplazamiento relativo entre el primer material (220) y el inyector (250), preferentemente en donde el desplazamiento relativo entre el primer material (220) y el inyector (250) comprende una rotación relativa entre el primer material (220) y el inyector (250), tal como donde la rotación relativa entre el primer material (220) y el inyector (250) comprende la rotación alrededor de un eje del primer material (220), preferentemente en donde la plataforma está configurada para provocar el desplazamiento relativo entre el primer material (220) y el inyector (250) a una velocidad de desplazamiento más rápida que un tiempo de ruptura característico de un chorro del segundo material (260).

14. El aparato (100) de la reivindicación 10, que comprende además: un actuador (290) configurado para causar un desplazamiento relativo entre un punto de enfoque de la fuente de energía enfocada y el primer material (220), preferentemente en donde la plataforma y/o el actuador (290) están configurados de tal manera que el movimiento de la plataforma está sincronizado con el movimiento del actuador (290).

15. El aparato (100) de la reivindicación 10, en el que:
el primer material (120) es liberable de la contención; o que comprende además:
un segundo inyector para lavar el primer material (120) para liberar el segundo material (160) del primer material (120),
tal como en donde el segundo inyector está configurado para inyectar una o más sales y/o disolventes orgánicos en
5 el primer material (120); o en donde el aparato (100) está configurado para operar el inyector para desplazar el primer
material (120) con el segundo material (160) durante un tiempo indefinido; o en donde el aparato (100) está configurado
para operar el inyector (150) para desplazar continuamente el primer material (120) con el segundo material (160)
durante un tiempo superior a un día.

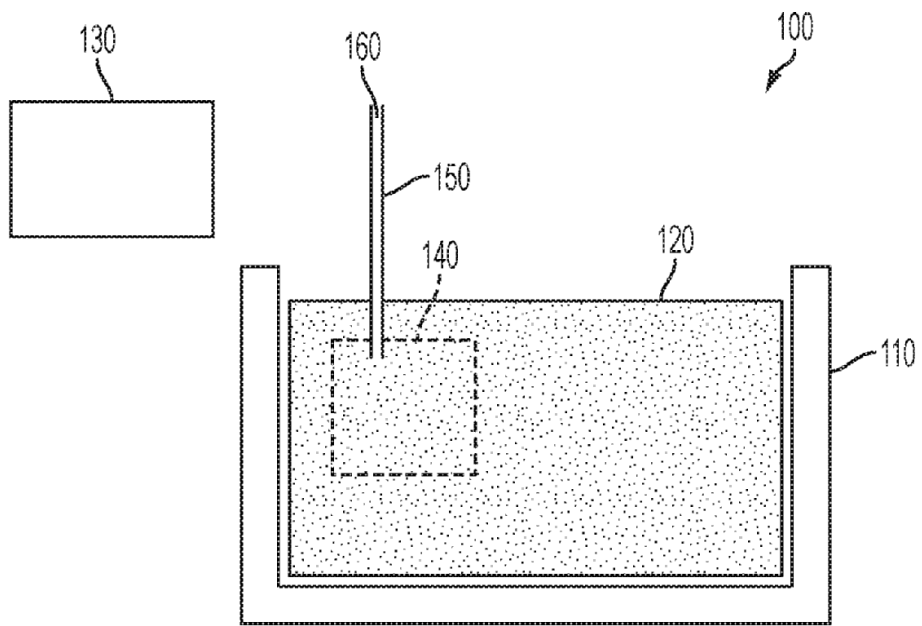


FIG. 1

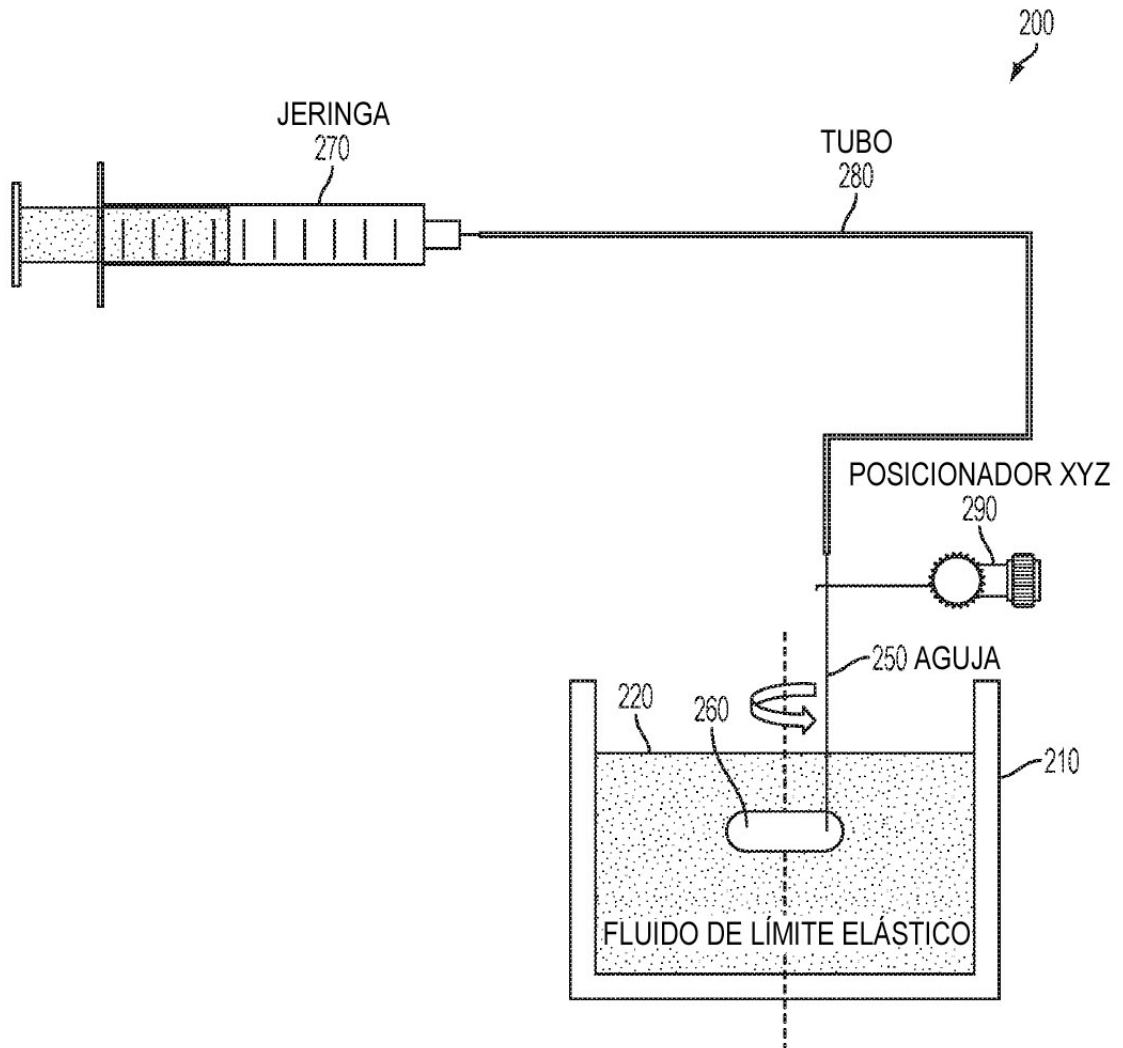


FIG. 2

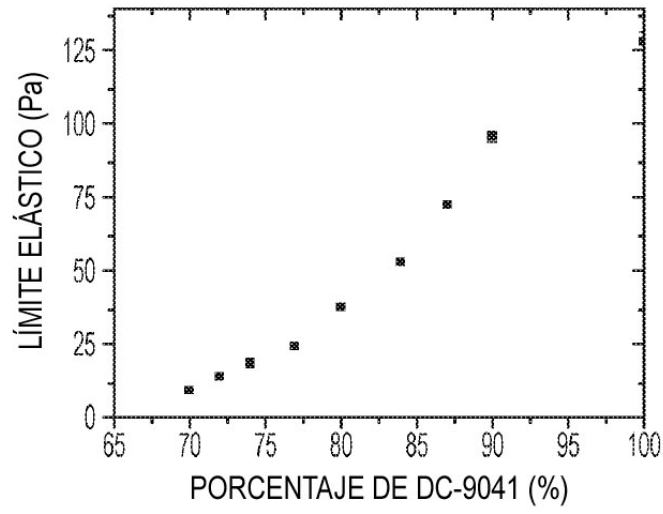


FIG. 3

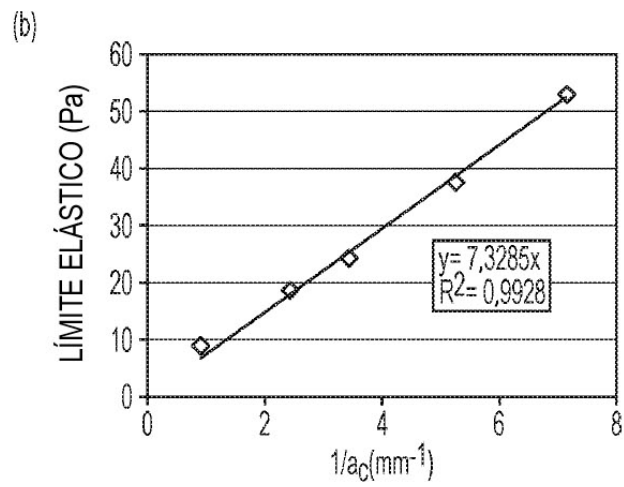
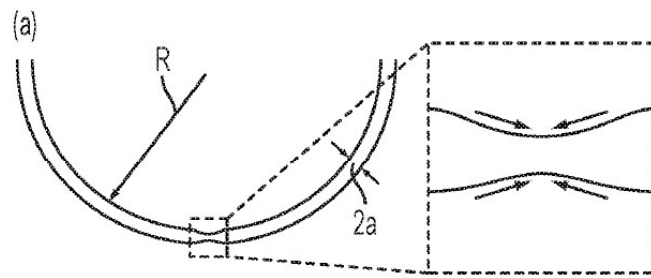


FIG. 4

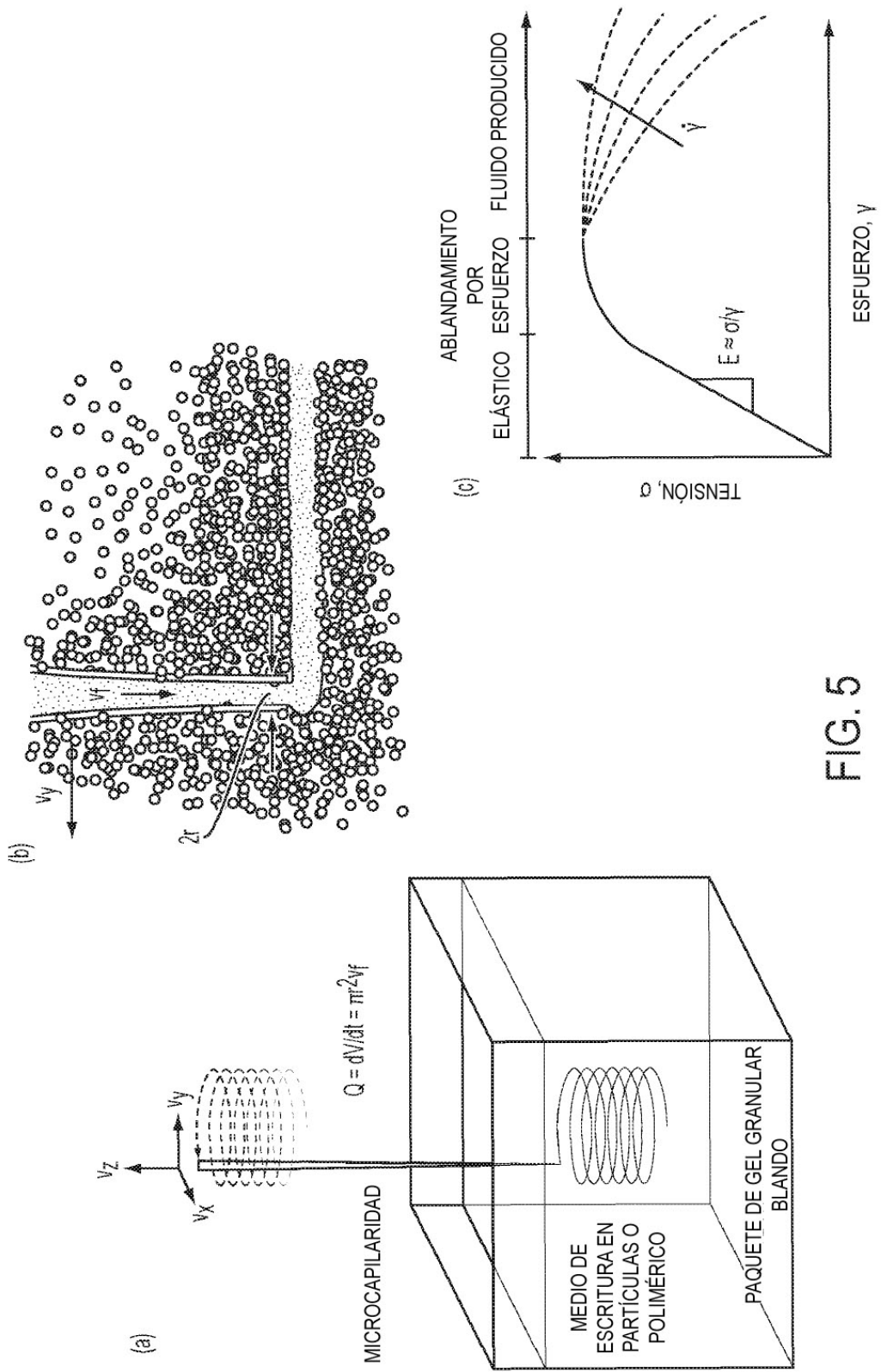


FIG. 5

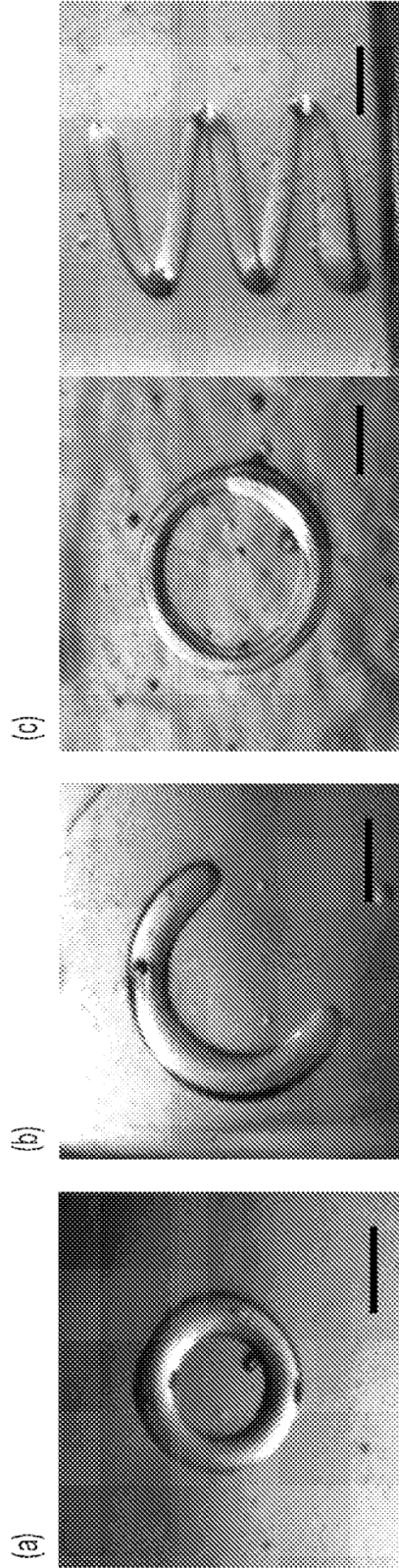


FIG. 6

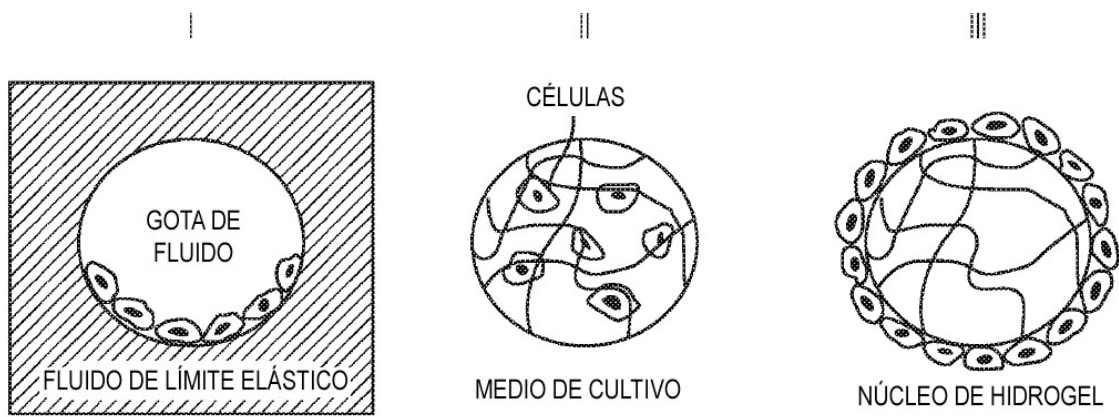


FIG. 7

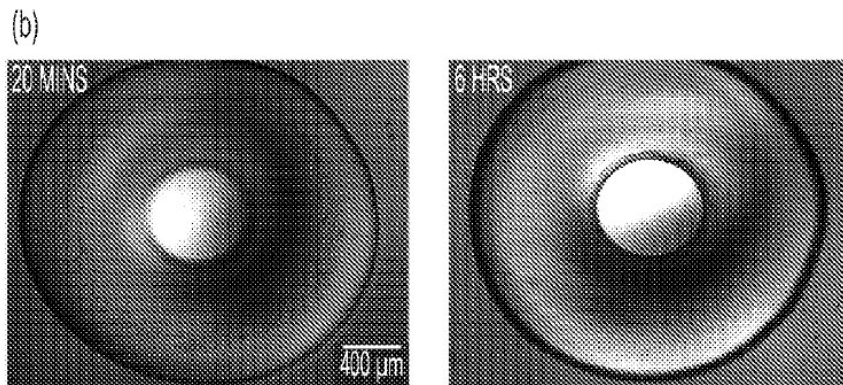
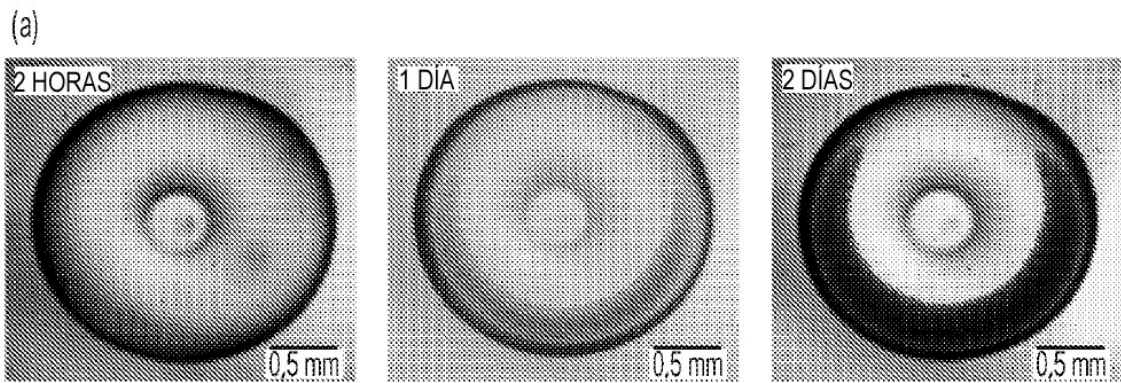


FIG. 8

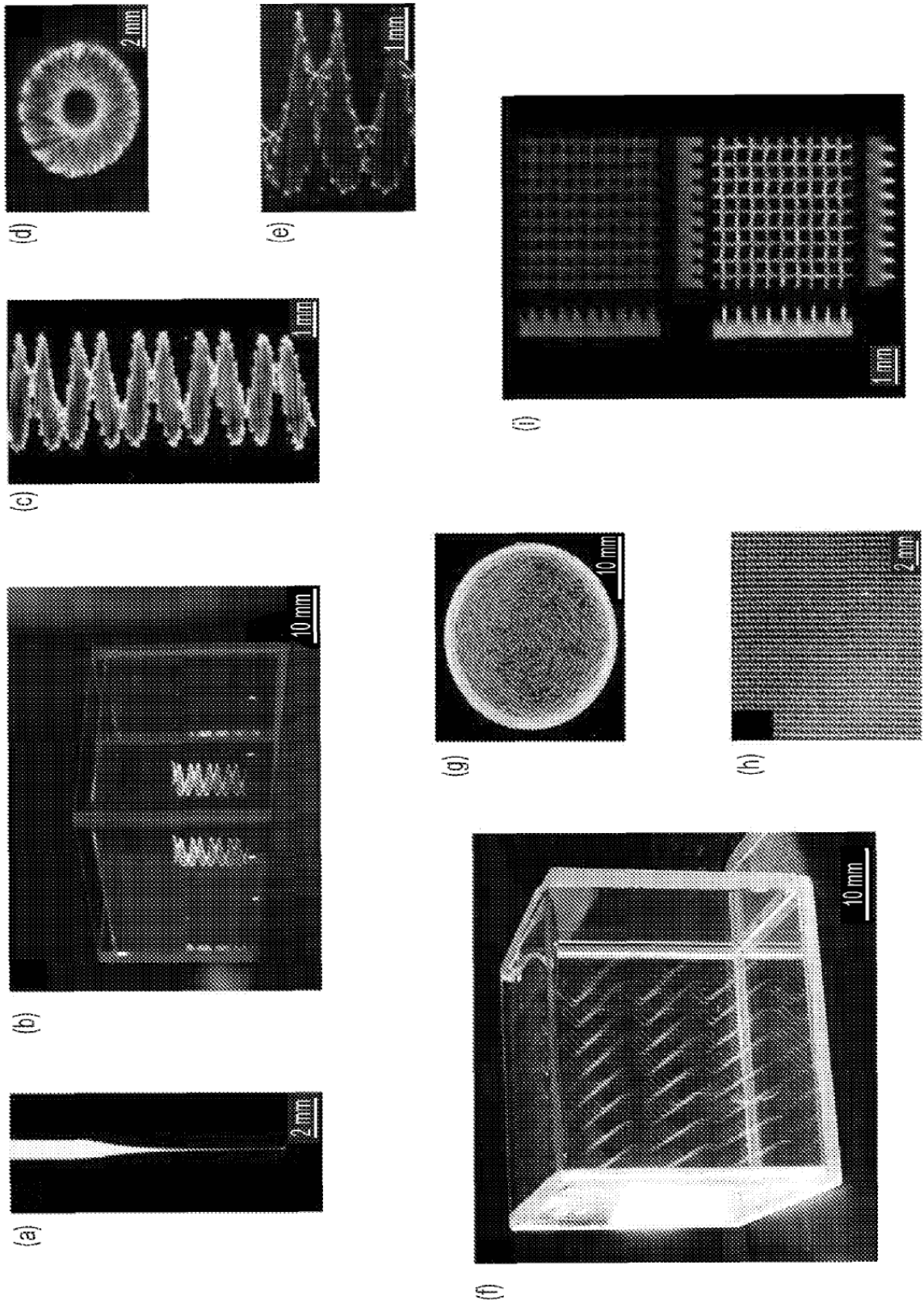


FIG. 9

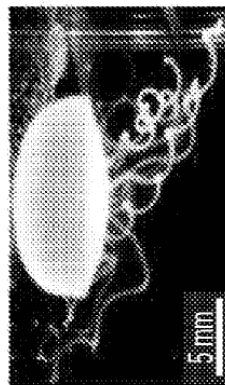
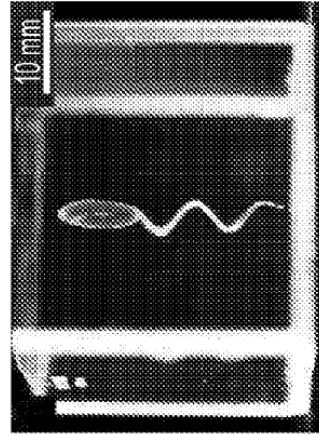
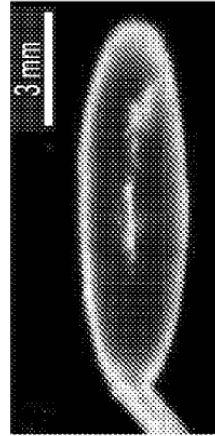
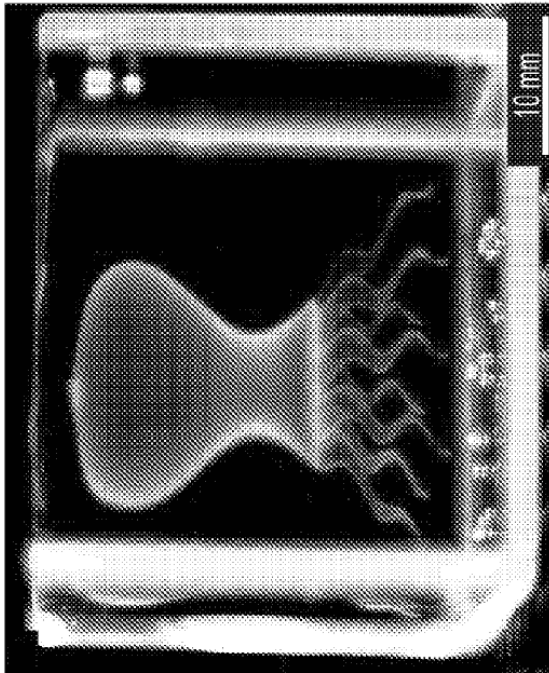
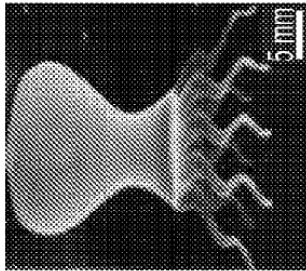
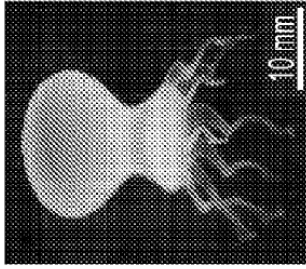
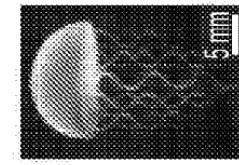


FIG. 10

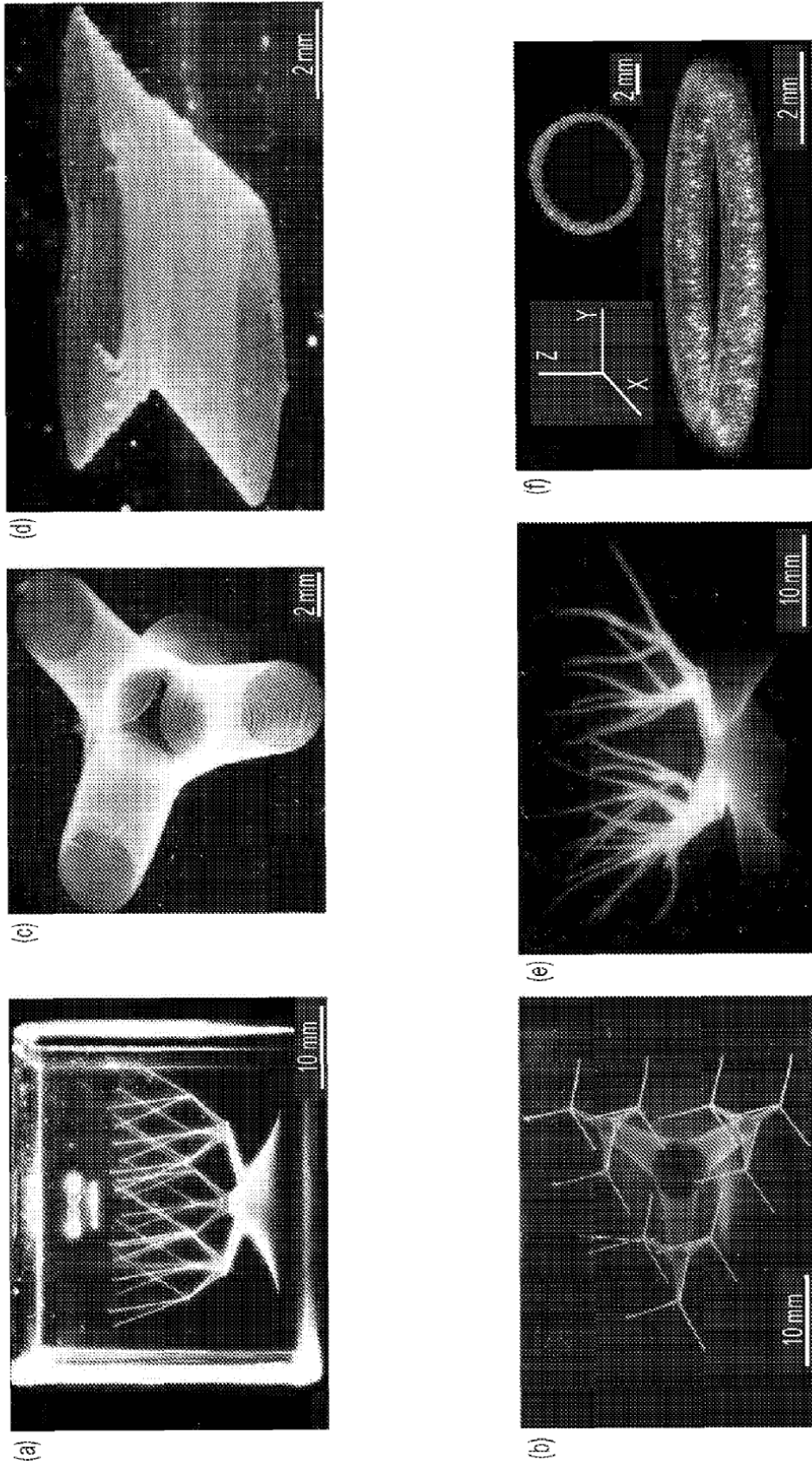


FIG. 11

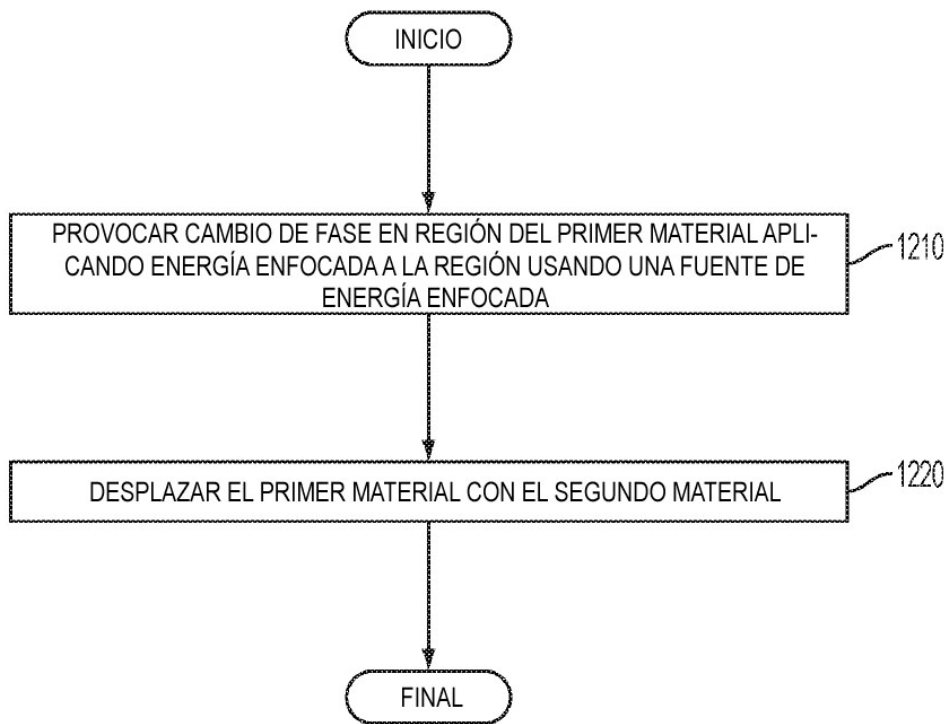


FIG. 12A

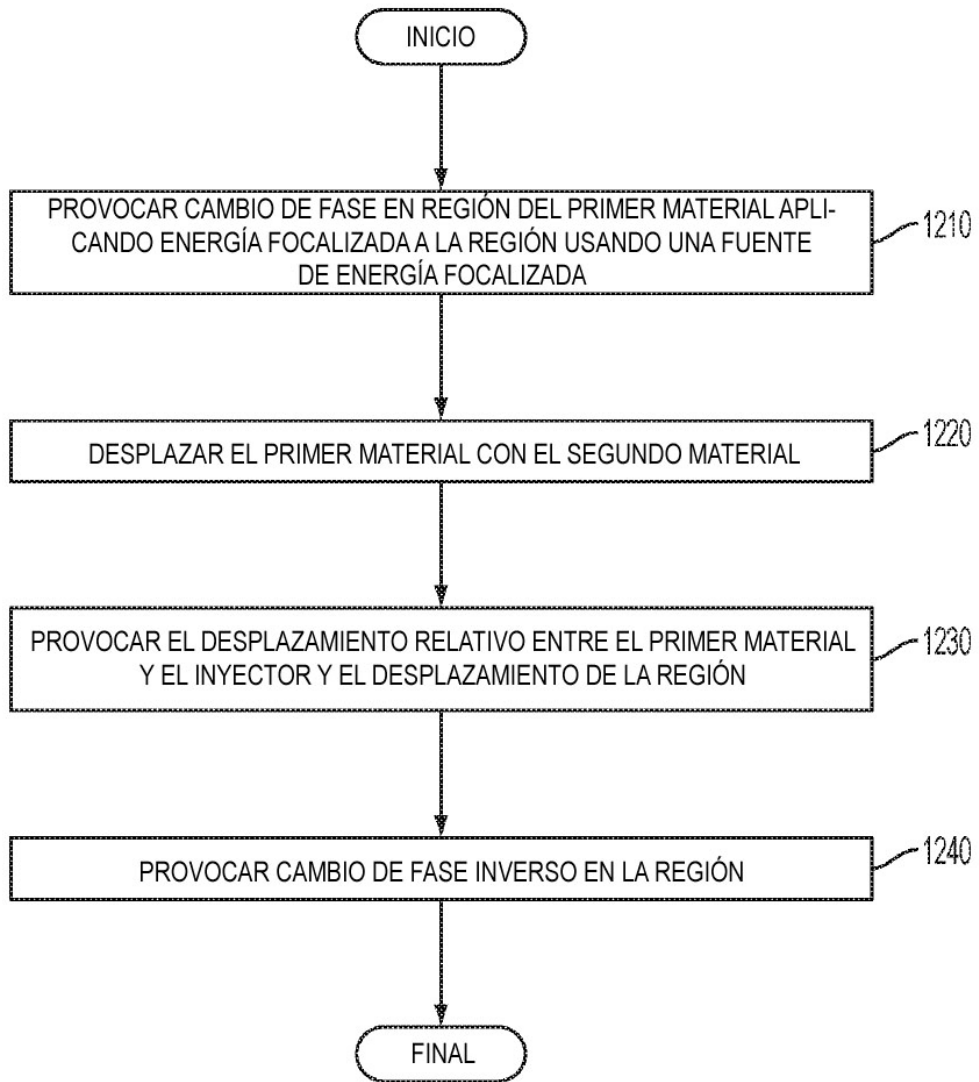


FIG. 12B

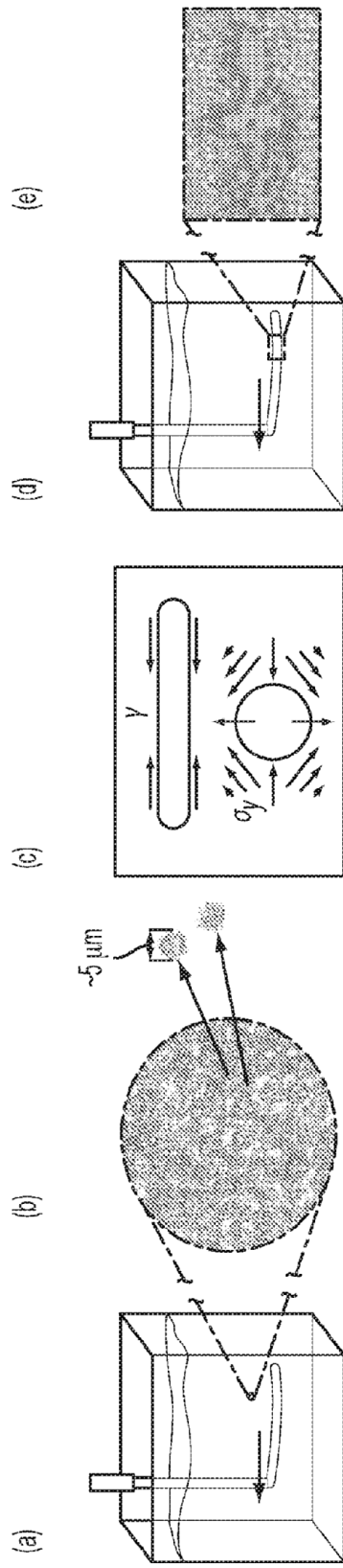


FIG. 13

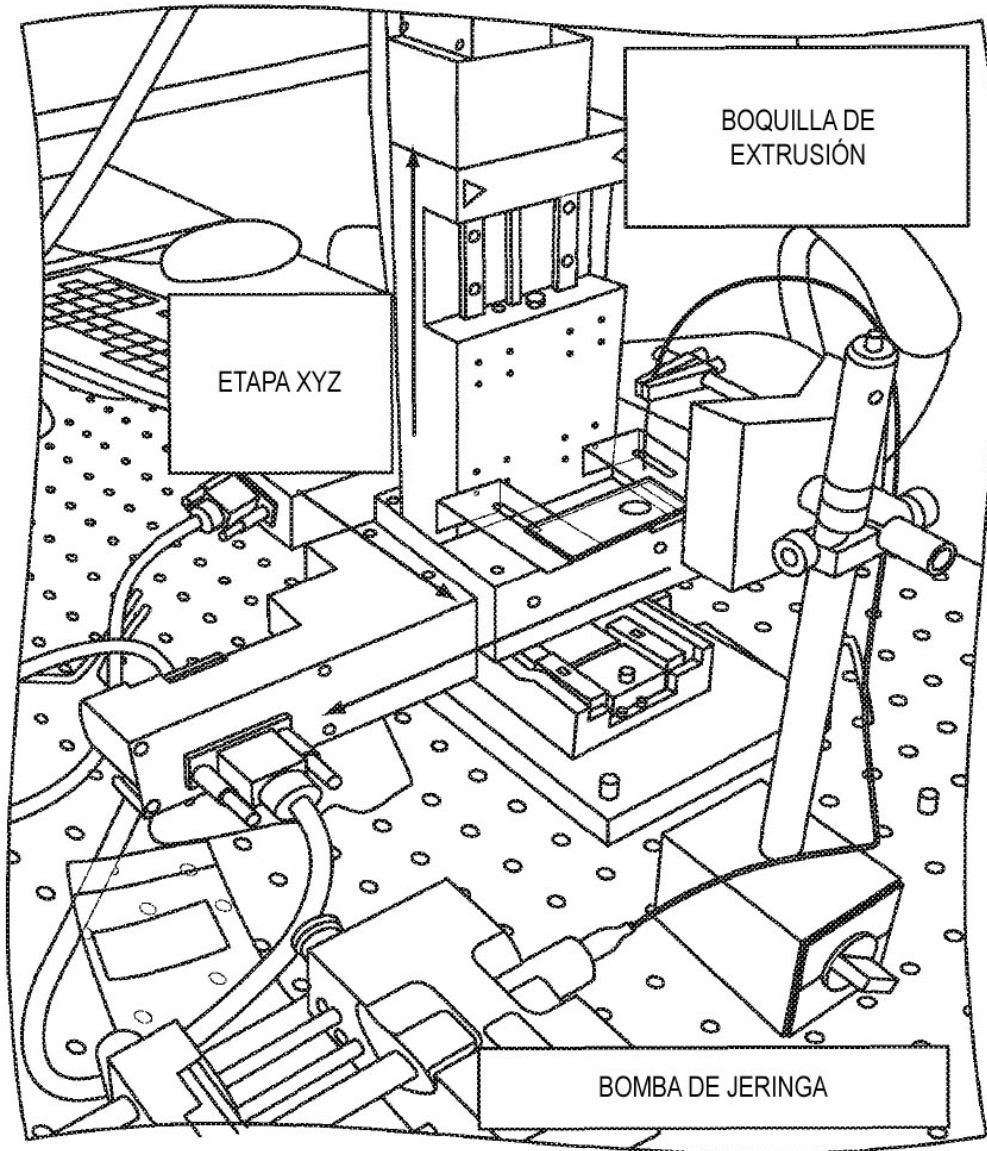


FIG. 14

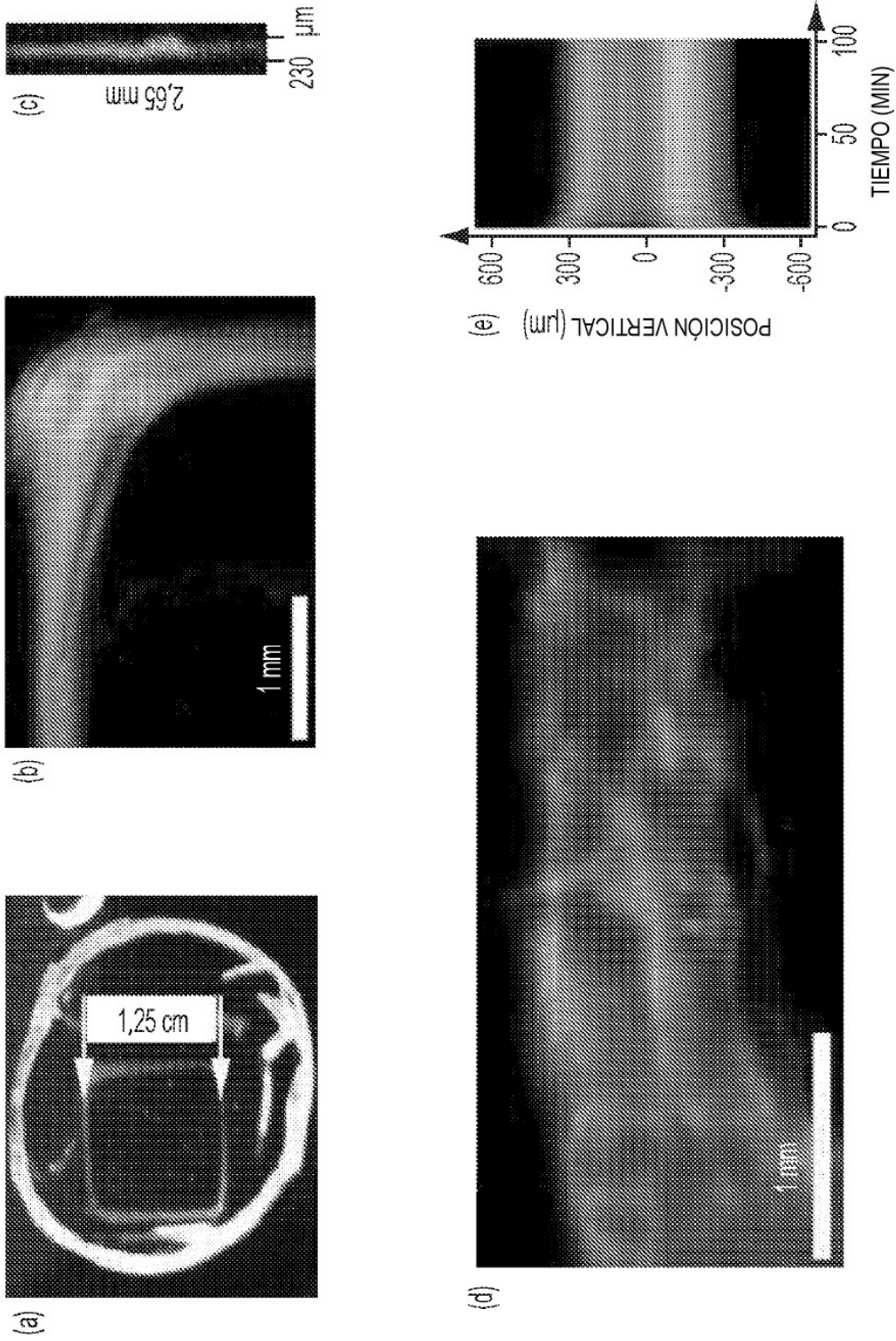
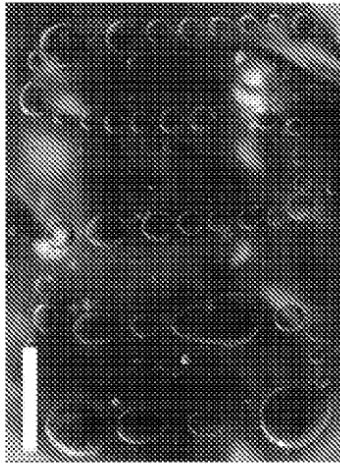
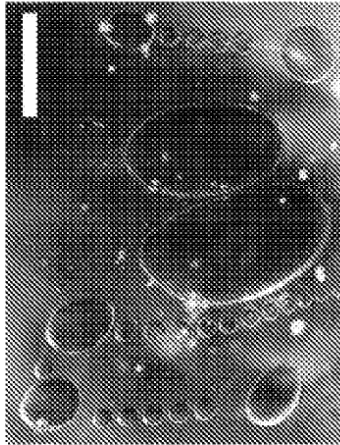


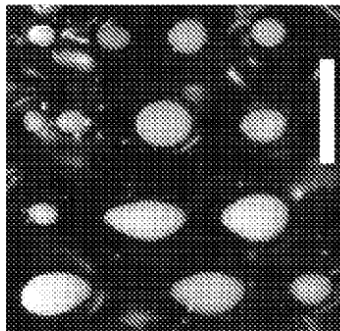
FIG. 15



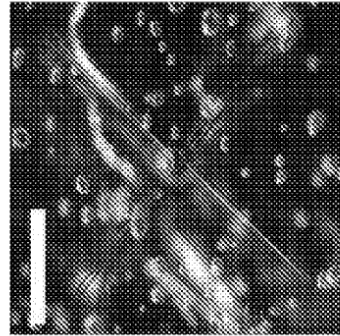
(a)



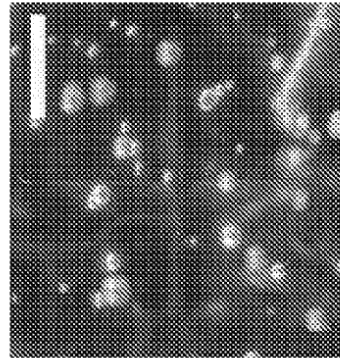
(b)



(c)



(d)



(e)

FIG. 16

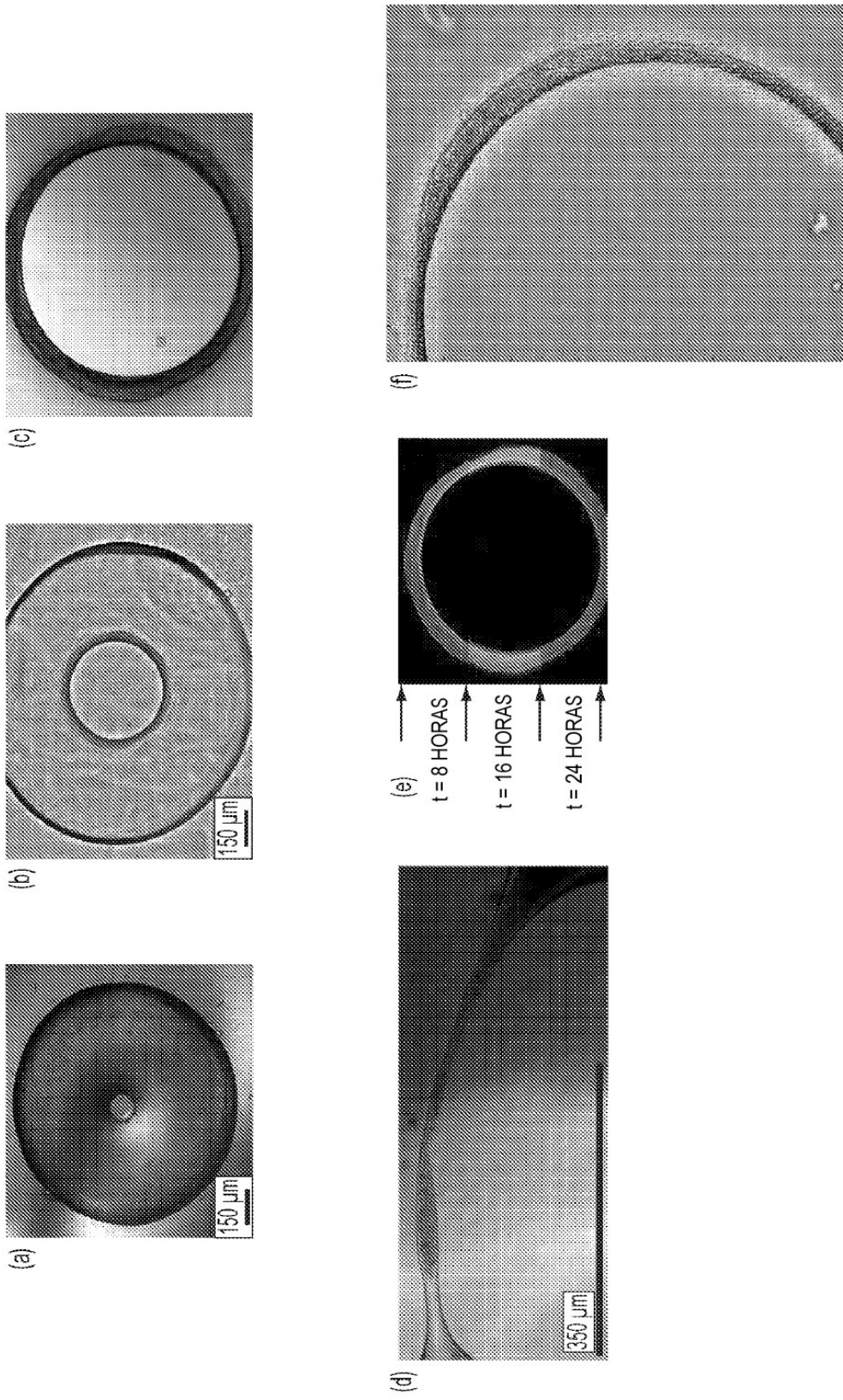


FIG. 17

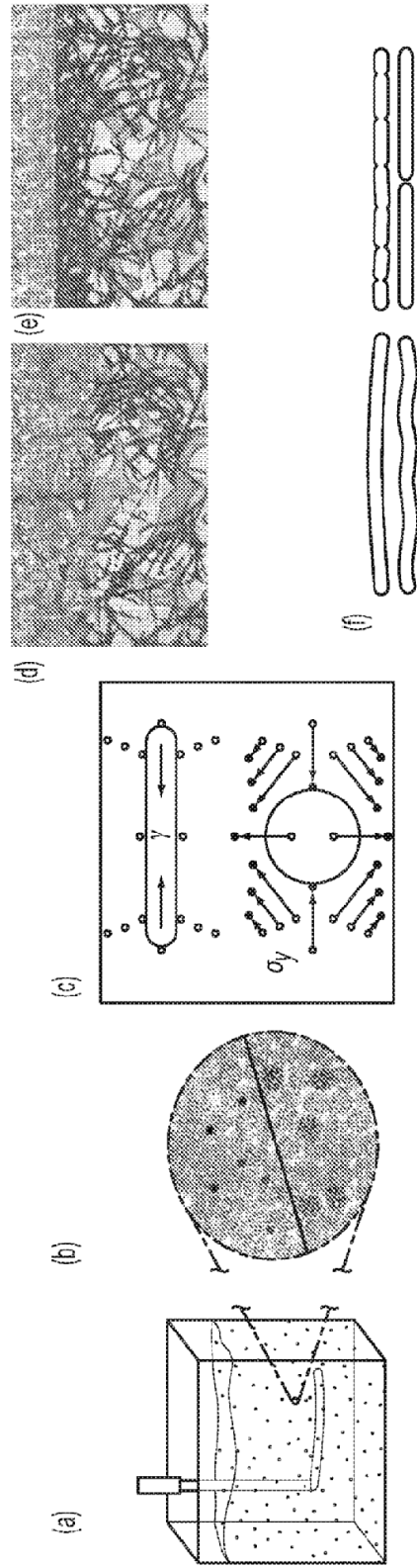


FIG. 18

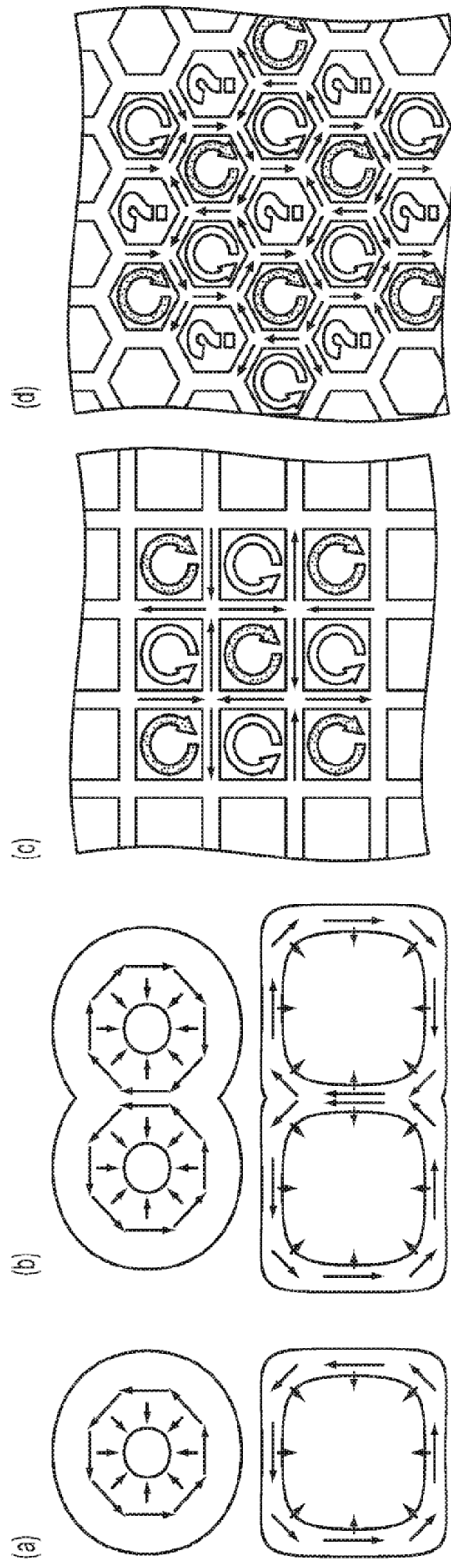


FIG. 19

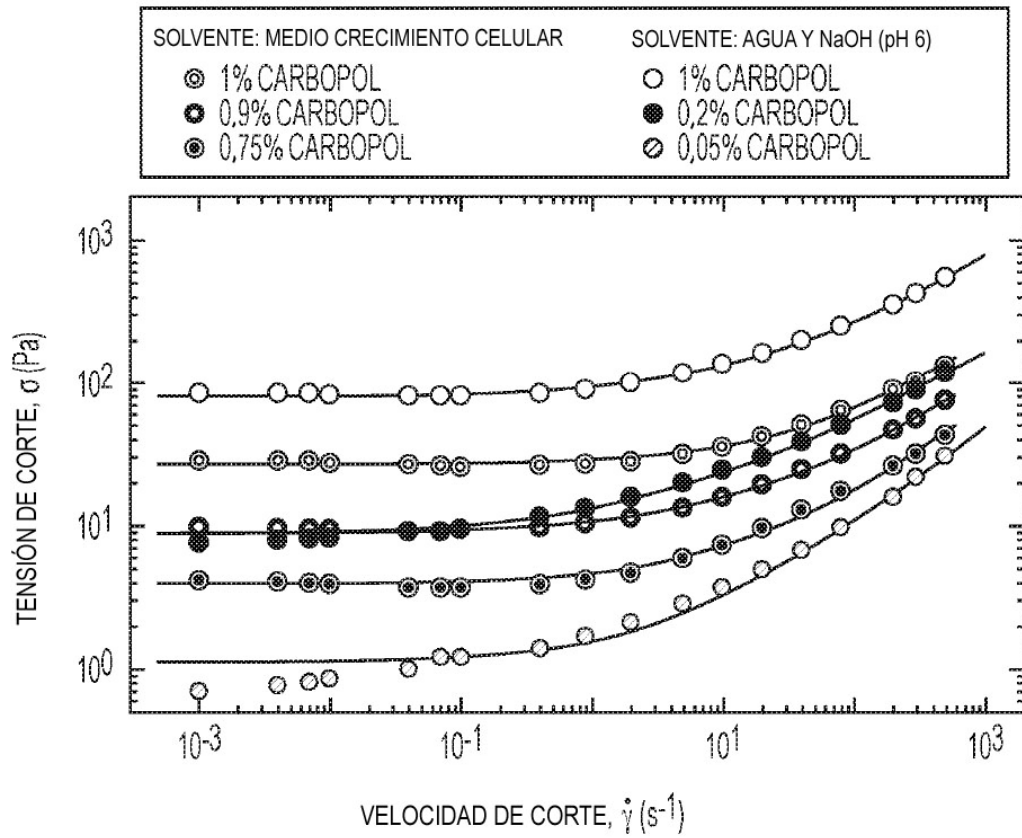


FIG. 20

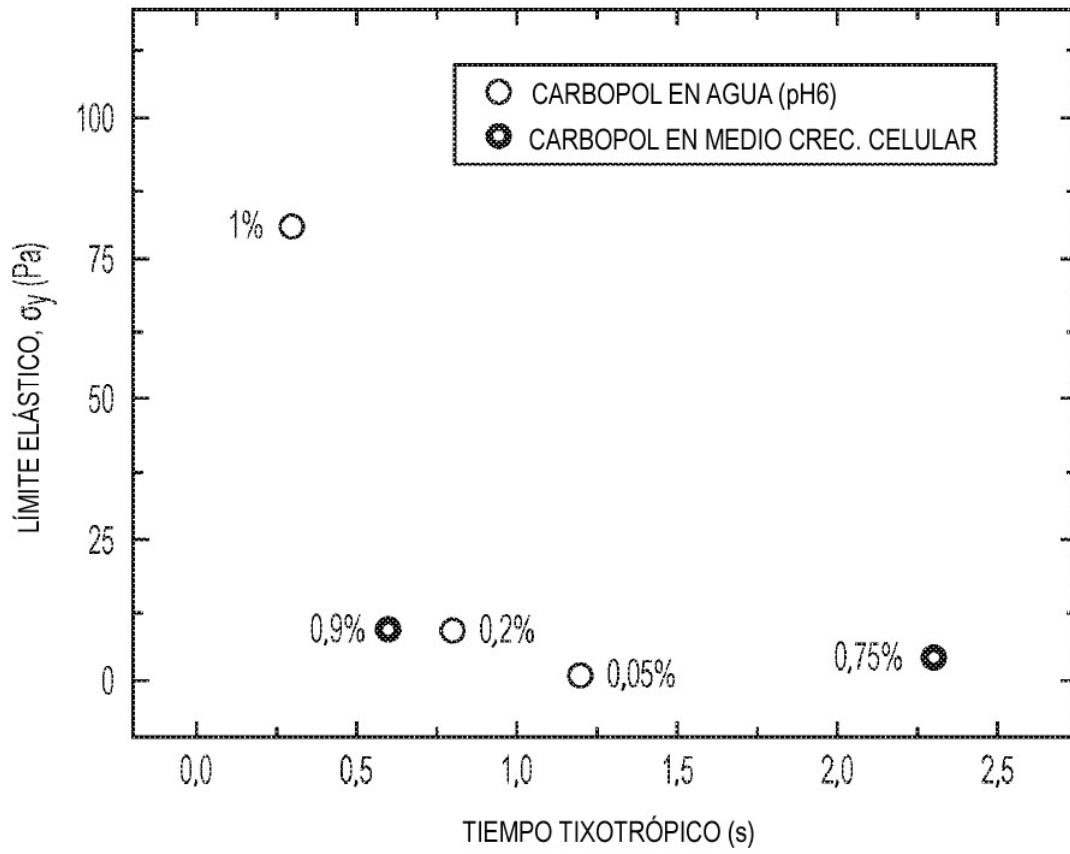


FIG. 21

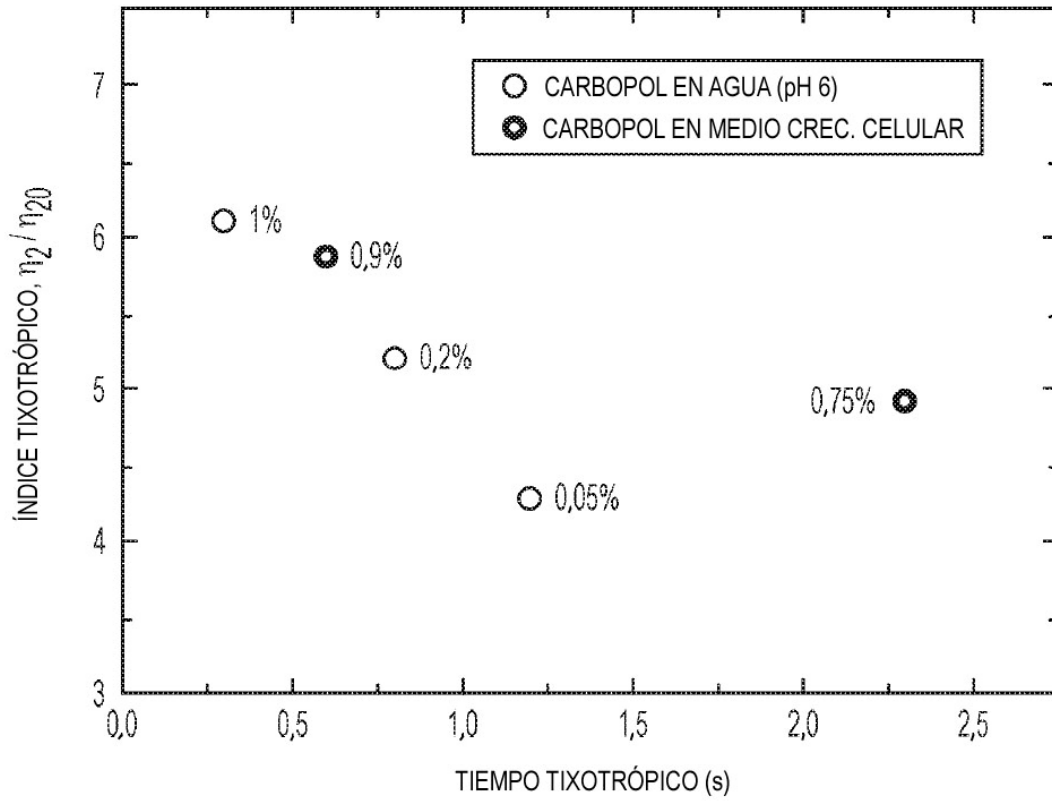


FIG. 22