

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 871 978**

(51) Int. Cl.:

**B41J 2/21** (2006.01)  
**B29C 64/112** (2007.01)  
**C12M 3/00** (2006.01)  
**C12M 3/06** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2018 PCT/GB2018/051908**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019 WO19008373**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2018 E 18742570 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021 EP 3648978**

---

### (54) Título: **Aparato y método de impresión**

(30) Prioridad:

**05.07.2017 GB 201710834**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2021**

(73) Titular/es:

**UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE (100.0%)  
Kings Gate  
Newcastle Upon Tyne and Wear NE1 7RU, GB**

(72) Inventor/es:

**BENNING, MATTHEW JAMES y  
DALGARNO, KENNETH WILLIAM**

(74) Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 871 978 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

## Aparato y método de impresión

- 5 La presente invención se refiere a un aparato y método de impresión. En particular, pero no exclusivamente, las realizaciones de la presente invención se refieren a un aparato y método de impresión para hacer incidir líquidos desde una primera y segunda fuentes de líquido. El aparato y el método pueden ser particularmente adecuados para la bioimpresión.
- 10 Los recientes avances en la fabricación aditiva (impresión tridimensional) han llevado a la impresión de materiales biocompatibles. Dicha bioimpresión 3D se puede utilizar para crear cocultivos 3D complejos, que posteriormente se pueden utilizar como tejidos y órganos adecuados para trasplantes, por ejemplo.
- 15 Sin embargo, las tecnologías de bioimpresión 3D actuales están limitadas por los líquidos de impresión que tienen una viscosidad relativamente alta, lo que puede dificultar su procesamiento. El aparato de impresión puede bloquearse por líquidos de alta viscosidad y la presión en el aparato y las tensiones de cizallamiento pueden dañar las células en el líquido.
- 20 Murphy & Atala, bioimpresión 3D de tejidos y órganos, *Nature Biotechnology* 32 (8), 773-785 (2014) describen varios enfoques de bioimpresión 3D que incluyen bioimpresoras de chorro de tinta, bioimpresoras de microextrusión y bioimpresoras asistidas por láser. Sin embargo, cada uno de estos enfoques puede estar limitado por la reología del material, la resolución, la velocidad de impresión y la compatibilidad con materiales biológicamente relevantes. El documento WO-A-2016/091336 divulga el preámbulo de la reivindicación 1.
- 25 Un enfoque que se ha utilizado es mezclar precursores de gel en un cartucho de mezcla antes de la deposición. Los precursores de gel tienen una viscosidad relativamente más baja y cuando se mezclan reaccionan para formar un gel de viscosidad relativamente más alta que se puede depositar sobre un sustrato. Sin embargo, este método todavía tiene el riesgo de que el gel se bloquee en el cartucho.
- 30 Por lo tanto, sería útil proporcionar un aparato que sea adecuado para depositar líquidos de alta viscosidad en un sistema de impresión 3D con un mayor rendimiento (velocidad de impresión), mejor fiabilidad y mayor resolución.
- 35 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato de impresión 3D para incidir líquidos de al menos dos fuentes de líquido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 y el uso de este aparato de impresión de acuerdo con las reivindicaciones 8 y 9.
- 40 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de bioimpresión 3D de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 14 y un gel de acuerdo con la reivindicación 15.
- 45 Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan un aparato de impresión que es más adecuado para imprimir materiales biológicos que los dispositivos previamente conocidos.
- 50 Ciertas realizaciones de la presente invención permiten un proceso de impresión más eficiente que los dispositivos conocidos anteriormente.
- 55 Ciertas realizaciones de la presente invención permiten consistencia en la impresión con mayor repetibilidad.
- 60 Las realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:
- 65 La figura 1a ilustra un primer ejemplo de un aparato de impresión;
- La figura 1b ilustra el aparato de impresión de la figura 1a en uso;
- La figura 2 ilustra un ejemplo de un accionador de chorro utilizado en el aparato de impresión de la figura 1a;
- La figura 3a ilustra un sistema de control de bucle abierto para su uso con un aparato de impresión
- La figura 3b ilustra un sistema de control de bucle cerrado para su uso con un aparato de impresión;
- La figura 4 ilustra un segundo ejemplo de un aparato de impresión;
- La figura 5 ilustra otra vista del elemento de ajuste del ejemplo mostrado en la figura 4;

- Las figuras 6a-6c ilustran una vista en planta del elemento de ajuste del ejemplo mostrado en la Figura 4;
- 5 La figura 7 ilustra el aparato de impresión de la figura 4 montado dentro de un cabezal de inyección;
- Las figuras 8a y 8b ilustran vistas lateral y superior respectivamente del aparato de impresión montado de acuerdo con la Figura 7;
- 10 La figura 9 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- La figura 10 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- La figura 11 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- 15 La figura 12 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- La figura 13 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste.
- 20 La figura 14 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- La figura 15 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- La figura 16 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- 25 La figura 17 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- La figura 18 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste;
- La figura 19 ilustra una matriz de inyección a gran escala;
- 30 La figura 20 ilustra el número de células, la viabilidad y la funcionalidad de los geles CAF cargados con dos concentraciones diferentes de células estromales mesenquimales.
- 35 La figura 21 ilustra la deposición de calcio y la morfología celular de los geles de CAF después de la incubación durante 7 y 14 días en medio osteogénico; y
- La Figura 22 ilustra la expresión de genes y proteínas osteogénicas entre los dos geles por comparación del cambio de multiplicidad entre los geles después de la incubación durante 14 días en medio osteogénico.
- 40 En los dibujos, los números de referencia similares se refieren a partes similares.
- Las Figuras 1a, 1b y 2 ilustran un primer ejemplo de un aparato 100 de impresión para incidir líquidos de al menos dos fuentes de líquido. El aparato 100 de impresión incluye un primer accionador 102 de chorro configurado para dispensar un primer líquido desde una primera fuente de líquido; un segundo accionador 104 de chorro configurado para dispensar un segundo líquido desde una segunda fuente de líquido de manera que el primer líquido incida sobre el segundo líquido dispensado desde el segundo accionador de chorro.
- 45 En este ejemplo, el primer y segundo accionador 102, 104 de chorro están montados dentro de un cabezal 106 de chorro. En uso, los primeros extremos 102<sub>1</sub> y 104<sub>1</sub> del primer y segundo accionadores 102, 104 de chorro, reciben el primer y segundo líquido de la primera y segunda fuentes de líquido (no mostrada) respectivamente. En un ejemplo, la fuente de líquido puede ser un recipiente hiperbárico o un recipiente con un cabezal de presión. Los segundos extremos 102<sub>2</sub> y 104<sub>2</sub> del primer y segundo accionadores 102, 104 de chorro están configurados para dispensar dichos primer y segundo líquidos, respectivamente. Por ejemplo, los segundos extremos de cada uno de los accionadores de chorro primero y segundo pueden incluir un orificio de salida.
- 50 En este ejemplo, el primer y segundo accionador 102, 104 de chorro están montados dentro de un cabezal 106 de chorro. En uso, los primeros extremos 102<sub>1</sub> y 104<sub>1</sub> del primer y segundo accionadores 102, 104 de chorro, reciben el primer y segundo líquido de la primera y segunda fuentes de líquido (no mostrada) respectivamente. En un ejemplo, la fuente de líquido puede ser un recipiente hiperbárico o un recipiente con un cabezal de presión. Los segundos extremos 102<sub>2</sub> y 104<sub>2</sub> del primer y segundo accionadores 102, 104 de chorro están configurados para dispensar dichos primer y segundo líquidos, respectivamente. Por ejemplo, los segundos extremos de cada uno de los accionadores de chorro primero y segundo pueden incluir un orificio de salida.
- 55 La figura 1b ilustra el aparato 100 de impresión en uso. El primer y segundo líquidos se dispensan desde el primer y segundo accionadores 102, 104 de chorro en trayectorias predeterminadas, de manera que el primer y segundo líquidos inciden. Como tal, el primer y el segundo líquido se fusionan o se combinan para formar una sola gota.
- 60 El aparato 100 de impresión incluye accionadores de chorro primero y segundo que forman un par operativo de accionadores de chorro. El aparato 100 de impresión incluye un solo par de accionadores de chorro, sin embargo, puede haber cualquier número de pares de accionadores de chorro montados dentro de un cabezal de chorro, por ejemplo, puede haber dos, tres o más pares de accionadores de chorro direccionables individualmente.
- 65 La figura 2 ilustra un ejemplo de un primer accionador 200 de chorro. En este ejemplo, el accionador de chorro es un accionador de chorro de microválvula y es operado electromagnéticamente. En este ejemplo, el accionador de chorro

de microválvula es un accionador de chorro disponible comercialmente de "Lee Products Limited (Reino Unido)". También se pueden usar otros accionadores de chorro adecuados. Por ejemplo, el accionador de chorro puede ser una microválvula o una entrada o similar. El accionador de chorro puede ser operado por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, el accionador puede ser operado por electromagnetismo, energía térmica, materiales piezoelectricos, neumáticos o hidráulicos.

Preferiblemente, el accionador de chorro es adecuado para la entrega de líquidos "drop-on-demand". En otras palabras, el accionador de chorro es preferiblemente adecuado para dispensar una sola gota de líquido a la vez cuando sea necesario. Sin embargo, se apreciará que también se puede aplicar un método de chorro de tinta continuo.

En este ejemplo, el segundo accionador 104 de chorro es del mismo tipo que el primer accionador 102 de chorro. En otros ejemplos, el primer y el segundo accionador de chorro pueden ser de diferentes tipos.

El aparato de impresión descrito anteriormente puede usarse en un proceso de inyección para deposición sobre un sustrato. En algunos ejemplos, el proceso de inyección puede controlarse mediante software.

En tales ejemplos, el software puede compilar imágenes o codificar en una trayectoria de impresión de trama. La trayectoria de impresión del aparato de impresión, es decir, el número de gotas y su colocación sobre el sustrato, puede producirse considerando la velocidad de impresión y la densidad de las gotas por área dada.

Las Figuras 3a y 3b ilustran sistemas de control de ejemplo para controlar el proceso de inyección para deposición sobre un sustrato 148. En estos ejemplos, el control 140 de software de un ordenador controla la posición del aparato de impresión en los ejes X, Y y Z en relación con el sustrato. Cuando se necesita una gota, el control 140 de software puede activar un disparador para el aparato de impresión. Por ejemplo, el disparador puede ser emitido por una lógica transistor-transistor (TTL). El sistema de control puede ser de bucle abierto o de bucle cerrado.

La figura 3a ilustra un sistema de control de bucle abierto para usar con un aparato 100 de impresión. En este ejemplo, el aparato de impresión tiene cuatro pares de accionadores de chorro montados dentro de un cabezal de chorro. El disparador TTL emitido por el control 140 de software del ordenador se envía a un controlador 142 a través de una interfaz 144 de ordenador. El controlador 142 distribuye el disparador a un controlador individual (no mostrado) para cada accionador de chorro a través de la línea 146 de control de sincronización. El controlador de cada accionador de chorro agrega el retardo de tiempo apropiado antes de abrir la microválvula. Preferiblemente, cada válvula está integrada con su propio controlador dedicado, de modo que los tiempos de deposición de las gotas se pueden adaptar a la dinámica específica de cada válvula para garantizar una incidencia óptima. Una señal de retroalimentación para el accionamiento del eje y la posición se alimenta a través de la línea 150 al controlador 142.

La figura 3b ilustra un sistema de control adicional para su uso con el aparato 100 de impresión. El sistema de control mostrado en la figura 3b incluye características correspondientes al sistema de control de la figura 3a que, por brevedad, no se discutirán de nuevo en detalle. Este sistema de control se diferencia del mostrado en la Figura 3a en que es de bucle cerrado. En el sistema que se muestra en la Figura 3b, el procesamiento de imágenes retroalimenta la eficiencia de la incidencia usando una cámara 160 de imagen de chorro y una cámara 162 fiducial a lo largo de una línea 164 de retroalimentación de imagen y ajusta automáticamente los tiempos de chorro de deposición de gotas para optimizar la incidencia de la primera y segunda gotitas de líquido.

Las Figuras 4-8b ilustran un segundo ejemplo de un aparato 100 de impresión para hacer incidir líquidos de al menos dos fuentes de líquido. El aparato 100 de impresión incluye cuatro pares de accionadores de chorro. Cada par de accionadores de chorro incluye un primer accionador 102 de chorro configurado para dispensar un primer líquido desde una primera fuente de líquido y un segundo accionador 104 de chorro configurado para dispensar un segundo líquido desde una segunda fuente de líquido. El aparato 100 también incluye un elemento 202 de ajuste para cada par de accionadores de chorro configurados para ajustar una trayectoria de al menos el primer líquido dispensado desde el primer accionador de chorro. De esta manera, la trayectoria del primer líquido puede ajustarse de modo que el primer líquido incida sobre el segundo líquido dispensado desde el segundo accionador de chorro.

La figura 4 ilustra cuatro pares operativos de accionadores de chorro (cada uno de los cuales incluye un primer accionador 102 de chorro y un segundo accionador 104 de chorro). En este ejemplo, el primer accionador 102 de chorro de cada par operativo incluye un elemento 202 de ajuste.

El elemento 202 de ajuste está configurado para ajustar la posición del primer accionador 102 de chorro con respecto al segundo accionador 104 de chorro. El ajuste de la posición del primer accionador de chorro ajusta así la trayectoria del primer líquido dispensado desde el primer accionador de chorro.

El elemento 202 de ajuste incluye un elemento de accionamiento para ajustar la posición del primer accionador de chorro. En este ejemplo, el elemento de accionamiento incluye un elemento 206 de accionamiento rosado, que interactúa con un collar 204 de montaje. En este ejemplo, la pinza 204 de montaje es una pinza y el elemento 206 de accionamiento rosado es un tornillo sin fin.

Como se muestra en las figuras 5 y 6a-c, el primer accionador 102 de chorro está montado excéntricamente en la pinza 204. Es decir, el primer accionador 102 de chorro está montado excéntricamente en la pinza 204 con respecto a un eje central de la pinza 204. El elemento 206 de accionamiento está configurado para girar la pinza 204 para ajustar linealmente la posición del primer accionador 102 de chorro con respecto al segundo accionador 104 de chorro.

- 5 La superficie exterior del tornillo 206 sin fin está acoplada de forma roscada con espuelas en la superficie exterior de la pinza 204 (las espuelas no se muestran). En este ejemplo, el tornillo 206 sin fin incluye un extremo 226 ranurado para ayudar en la aplicación de un par al tornillo 206 sin fin y, por lo tanto, para ayudar en la rotación del tornillo 206 sin fin. En funcionamiento, el tornillo sin fin gira (como se indica por la flecha A en la Figuras 5) haciendo que la pinza 204 gire alrededor de su eje central (como lo indica la flecha B en la Figura 5).
- 10 El control del tornillo 206 sin fin puede ser a través de un controlador, o en otros ejemplos el tornillo sin fin puede activarse manualmente usando un destornillador, por ejemplo. El tornillo 206 sin fin puede controlarse usando sistemas de control como se muestra en las Figuras 3a y 3b. Los sistemas de control que se muestran en las Figuras 3a y 3b pueden controlar así la liberación del primer y segundo líquidos de los respectivos primer y segundo accionadores de chorro. Los sistemas de control que se muestran en las Figuras 3a y 3b pueden también (o alternativamente) controlar la posición de al menos los primeros accionadores de chorro, para optimizar así la incidencia del primer y segundo líquidos.
- 15 20 Las Figuras 6a-6c ilustran las posiciones relativas de la pinza 204 y el primer accionador 102 de chorro después de que la pinza 204 se gira en un ángulo de 0, 90 y 180 grados, respectivamente. La rotación de la pinza 204 actúa para rotar el eje central del primer accionador 102 de chorro alrededor del eje central de la pinza, como se muestra en las Figuras 6a-6c. Al hacerlo, la rotación de la pinza 204 actúa para desplazar el eje central del primer accionador 102 de chorro con respecto al eje central del segundo accionador 104 de chorro correspondiente.
- 25 30 En este ejemplo, el elemento 202 de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de translación del primer accionador 102 de chorro con respecto al segundo accionador de chorro. Es decir, el primer accionador 102 de chorro se traslada, de modo que la posición del segundo extremo 102<sub>2</sub> del primer accionador 102 de chorro se altera con respecto a la posición del segundo extremo 104<sub>2</sub> del segundo accionador 104 de chorro. La posición del primer accionador 102 de chorro puede ajustarse para ayudar a asegurar que las gotas de líquido dispensadas desde el primer accionador de chorro incidan con las gotas de líquido dispensadas desde el segundo accionador 104 de chorro. En este ejemplo, el ángulo desde el cual se dispensan las gotas de líquido desde el primer accionador de chorro permanece sin cambios a medida que se ajusta la posición del primer accionador de chorro. En otras palabras, la orientación angular del primer accionador de chorro permanece fija.
- 35 40 La excentricidad (X) de los ejes centrales del primer accionador 102 de chorro y la pinza 204 está preferiblemente entre 25 µm y 1 mm. Más preferiblemente, la excentricidad es de alrededor de 150 µm. Con una excentricidad de 150 µm, el ajuste total (no lineal) que se puede lograr es de 300 µm.
- 45 50 En uso, la posición del primer accionador de chorro puede ajustarse mediante la rotación del tornillo 206 sin fin, que provoca la rotación de la pinza 204. La rotación de la pinza 204 permite un ajuste fino de la posición del primer accionador de chorro con respecto al segundo accionador de chorro. De esta manera, la posición del primer accionador de chorro puede optimizarse para adaptarse a las propiedades del primer y/o segundo líquido para ayudar a asegurar que las trayectorias de los líquidos se encuentran y los líquidos inciden.
- 55 60 Las Figuras 7, 8a y 8b ilustran los cuatro pares operativos de accionadores de chorro y elementos de ajuste correspondientes, montados dentro del cabezal 208 de chorro. En este ejemplo, el cabezal 208 de chorro incluye una porción 214 de cuerpo, una placa 210 superior y una placa 212 lateral.
- 65 70 Como se muestra en las Figuras 8a y 8b en este ejemplo, la placa 210 superior está fijada a la porción 214 de cuerpo mediante tornillos 216, aunque se puede utilizar cualquier otro medio de fijación adecuado, por ejemplo, un adhesivo adecuado. La placa 210 superior incluye orificios 220 circulares para recibir el primer extremo de los primeros accionadores de chorro. El diámetro de los orificios es mayor que el de los primeros accionadores 102 de chorro para dejar espacio para que los primeros accionadores 102 de chorro giren alrededor del eje central de la pinza 204.
- 75 80 La placa 212 lateral está montada en un lado del cabezal 208 de inyección y permite el acceso al extremo 226 ranurado (o cabezal) del tornillo 206 sin fin desde fuera del cabezal 208 de inyección. De manera similar a la placa 210 superior, la placa 212 lateral se fija a la porción del cuerpo mediante tornillos 216, aunque alternativamente se pueden utilizar otros medios de fijación adecuados.
- 85 90 Se apreciará que la sincronización de las gotas de líquido dispensadas desde el primer y segundo accionadores de chorro también pueden controlarse para ayudar a asegurar que la primera y la segunda gotas de líquido incidan. Por ejemplo, cuando el primer y el segundo líquidos tienen sustancialmente las mismas propiedades reológicas, la primera y la segunda gotitas de líquido se pueden dispensar de manera sustancialmente simultánea. En otros ejemplos, en los que el primer y el segundo líquidos tienen propiedades diferentes, puede haber un desfase de tiempo entre la dispensación de los dos líquidos. Como se discutió anteriormente, un controlador, que puede ser parte del sistema de

control de las Figuras 3a-3b puede controlar la sincronización de las gotas dispensadas desde el primer y segundo accionadores de chorro. Un solo controlador puede controlar las válvulas de todos los accionadores de chorro o cada accionador de chorro puede tener un controlador separado asociado con éste.

- 5 En este ejemplo, el primer líquido comprende un primer precursor de gel y el segundo líquido comprende un segundo precursor de gel. Por ejemplo, el primer precursor de gel puede ser un alginato de sodio de viscosidad relativamente baja y el segundo precursor de gel puede ser un cloruro de calcio. Estos precursores de gel particulares se combinan para formar un hidrogel de alginato de polisacárido. En otro ejemplo, el primer líquido puede ser una solución de fibrinógeno de baja viscosidad y el segundo líquido puede ser una solución de trombina de baja viscosidad. Estos líquidos se pueden combinar para formar un gel de fibrina proteica.

10 La figura 9 ilustra otro ejemplo de un elemento 302 de ajuste. En este ejemplo, el elemento de accionamiento para ajustar la posición del primer accionador 102 de chorro es un tornillo 306 prisionero.

- 15 15 El tornillo 306 prisionero está acoplado roscadamente con un canal 230 situado dentro de la porción 214 de cuerpo del cabezal de inyección. En funcionamiento, a medida que se gira el tornillo prisionero, el primer accionador 102 de chorro se desplaza linealmente una distancia relativa al paso del tornillo 306 prisionero multiplicado por su rotación. Es decir, el tornillo 306 prisionero se usa para aplicar una fuerza para mover el primer accionador 102 de chorro lateralmente en el cabezal de chorro, en la dirección de las flechas C.

- 20 20 En este ejemplo, el elemento 302 de ajuste comprende además un elemento 308 de empuje dispuesto para oponerse a la fuerza del elemento de accionamiento (tornillo prisionero) sobre el primer accionador de chorro. En este ejemplo, el elemento 308 de empuje es un resorte, aunque se puede usar cualquier elemento de empuje adecuado.

- 25 25 El resorte 308 está alojado dentro de un rebajo en la porción 214 de cuerpo del cabezal de inyección. El resorte 308 proporciona una fuerza contraria a la fuerza aplicada al primer accionador 102 de chorro por el tornillo 306 prisionero, que permite el ajuste mientras sostiene el primer accionador 102 de chorro de forma segura en una orientación sustancialmente fija.

- 30 30 Como con el primer ejemplo de un elemento 202 de ajuste, en este ejemplo el elemento 302 de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de traslación del primer accionador 102 de chorro con respecto al segundo accionador de chorro como se indica por las flechas C.

- 35 35 De la misma manera que en el ejemplo anterior, el elemento 302 de ajuste puede incluir además un controlador (no mostrado) para controlar el elemento de accionamiento (tornillo prisionero).

40 40 La figura 10 ilustra un ejemplo adicional de un elemento 402 de ajuste. De manera similar al ejemplo anterior de la figura 9, el elemento accionador para ajustar la posición del primer accionador 102 de chorro es un tornillo 306 prisionero y el elemento 402 de ajuste incluye además un elemento 308 de empuje dispuesto para oponerse a la fuerza del tornillo 306 prisionero sobre el primer accionador 102 de chorro.

45 Sin embargo, en este ejemplo, el elemento de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de rotación del primer accionador 102 de chorro.

- 50 50 45 El elemento 402 de ajuste incluye además un elemento 310 de empuje adicional dispuesto para aplicar una fuerza al primer accionador 102 de chorro para controlar el movimiento de rotación del primer accionador de chorro al accionar el elemento de accionamiento.

- 55 55 En este ejemplo, el tornillo 306 prisionero ajusta la posición del primer accionador de chorro y un elemento 310 de empuje adicional asegura que permanece en contacto con un fulcro 420. En este ejemplo, el fulcro 420 es una extensión del borde del rebaje dentro del cual se aloja el elemento 308 de empuje. En otros ejemplos, el fulcro puede ser un elemento separado acoplado a la carcasa. En este ejemplo, el elemento 310 de empuje adicional es un resorte, aunque se puede usar cualquier elemento de empuje adecuado.

- 60 60 55 A medida que el primer accionador 102 de chorro es desplazado por el tornillo prisionero, el segundo extremo 102<sub>2</sub> del primer accionador 102 de chorro se mueve en un arco alrededor del fulcro 420. El uso de un fulcro 420 para soportar el primer accionador 102 de chorro puede permitir un ajuste más fino y más estable.

- 65 65 60 La figura 11 ilustra otro ejemplo de un elemento 502 de ajuste. En la mayoría de los aspectos, el elemento 502 de ajuste tiene características correspondientes al elemento 402 de ajuste de la figura 10. Por razones de brevedad, las características comunes no se discutirán nuevamente en detalle.

- 70 70 65 Sin embargo, a diferencia del ejemplo anterior, el elemento de accionamiento para ajustar la posición del primer accionador 102 de chorro es el diafragma 406. El diafragma puede ser un diafragma neumático o hidráulico. El grado de ajuste es una interacción de la rigidez del resorte, el área de la superficie del accionador y la presión neumática o hidráulica aplicada.

- 5 La figura 12 ilustra otro ejemplo de un elemento 602 de ajuste. En la mayoría de los aspectos, el elemento 602 de ajuste tiene características correspondientes al elemento 402 y 502 de ajuste y de las figuras 10 y 11 respectivamente. Sin embargo, en este ejemplo, el accionador para ajustar la posición del primer accionador 102 de chorros es un accionador 506 piezoeléctrico.
- 10 El accionador 506 piezoeléctrico puede presentarse en varias formas, incluida una pila de disco piezoeléctrico (como en el ejemplo mostrado en la figura 12) donde el grado de ajuste es relativo a la diferencia de potencial a través de la pila piezoeléctrica. Alternativamente, el accionador piezoeléctrico puede ser un motor paso a paso piezoeléctrico, en el que las matrices de haces piezoeléctricos se doblan bajo los voltajes aplicados y actúan para mover un accionador de varilla a través de la peristalsis. En otro ejemplo, el accionador piezoeléctrico puede ser un anillo piezoeléctrico deformable, que puede deformarse con respecto a un voltaje aplicado.
- 15 La figura 13 ilustra otro ejemplo de un elemento 702 de ajuste. Como en el ejemplo anterior, en la mayoría de los aspectos el elemento 702 de ajuste tiene características correspondientes al elemento 402, 502 y 602 de ajuste de las figuras 10-12. Sin embargo, en este ejemplo, el accionador para ajustar la posición del primer accionador 102 de chorros es un electroimán 606.
- 20 El electroimán 606 incluye devanados en espiral 608 y un núcleo de hierro 610. El electroimán 606 interactúa con un imán 612 permanente montado en el primer accionador de chorros. El electroimán 606 y el imán 612 permanente están montados en posiciones opuestas. El grado de ajuste del primer accionador de chorros está controlado por el voltaje aplicado a los devanados del electroimán, la rigidez del resorte 308 y el desplazamiento del imán permanente del núcleo de hierro del electroimán.
- 25 La figura 14 ilustra otro ejemplo de un elemento 802 de ajuste. En este ejemplo, el elemento 802 de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de traslación del primer accionador 102 de chorros con respecto al segundo accionador de chorros.
- 30 El elemento 802 de ajuste incluye un elemento de accionamiento para ajustar la posición del primer accionador 102 de chorros. En este ejemplo, el elemento de accionamiento es un tornillo 708 de ajuste unido a un cojinete constreñido 710. El tornillo 708 de ajuste está acoplado a rosca con un canal 718 del alojamiento 716 del accionador, que está montado en el primer accionador 102 de chorros.
- 35 El primer accionador 102 de chorros está montado en un carro 712 de cojinete lineal, que se puede deslizar a lo largo del raíl 714. El raíl 714 está unido al cuerpo 214 del cabezal de chorros (este accesorio no se muestra).
- 40 En funcionamiento, como el tornillo 708 de ajuste está limitado lateralmente por el cojinete 710, cuando se gira el tornillo de ajuste, la carcasa del accionador 716 se empuja hacia el cojinete constreñido 710 o se aleja del mismo. Como tal, el primer accionador 102 de chorros se mueve lateralmente en la dirección de cualquiera de las flechas E. El grado de ajuste es relativo al paso del tornillo multiplicado por su fracción de rotación.
- 45 Como se discutió con respecto a los ejemplos anteriores (por ejemplo, el elemento 302 de ajuste), el control del tornillo 708 de ajuste puede ser a través de un controlador, o en otros ejemplos el elemento de ajuste puede activarse manualmente usando un destornillador, por ejemplo.
- 50 La figura 15 ilustra otro ejemplo de un elemento 902 de ajuste. En este ejemplo, el elemento 902 de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de rotación del primer accionador 102 de chorros.
- 55 En este ejemplo, el elemento de accionamiento para ajustar la posición del primer accionador de chorros es el cardán 808. El primer accionador 102 de chorros está montado en el cardán 808.
- 60 La alineación se logra girando el cardán alrededor del centro de rotación 810, lo que da como resultado el movimiento del segundo extremo 102<sub>2</sub> del primer accionador 102 de chorros en un arco con respecto al centro de rotación 810 del cardán. El grado de ajuste es producto del desplazamiento angular del cardán y la distancia desde el eje de rotación hasta el segundo extremo 102<sub>2</sub> del accionador 102 de chorros.
- 65 La rotación del cardán se puede controlar mediante un controlador o, alternativamente, se puede controlar manualmente.
- 66 La figura 16 ilustra otro ejemplo de un elemento 1002 de ajuste. En este ejemplo, el elemento 1002 de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de rotación del primer accionador 102 de chorros.
- 67 En este ejemplo, una pluralidad de los primeros accionadores 102 de chorros están montados en un bastidor 1010, que en este ejemplo es un cabrestante.

En este ejemplo, el elemento de accionamiento para ajustar la posición del primer accionador de chorro es un motor paso a paso o un servomotor, que hace girar el cabrestante alrededor de su eje central 1012. El grado de ajuste es relativo al desplazamiento angular del cabrestante, y la distancia entre el eje de rotación y el segundo extremo 102<sub>2</sub> del accionador 102 de chorro.

5 En este ejemplo, cada uno de la pluralidad de accionadores 102 de chorro montados en el bastidor 1010 puede  
contener diferentes líquidos. Esto puede ser particularmente útil cuando puede cambiar el material que se va a formar.  
Por ejemplo, se puede construir una estructura de gel de fibrina con fibrinógeno que tenga diferentes tipos de células.  
10 En lugar de tener múltiples pares de accionadores de chorro, se puede usar la disposición de cabrestante y cada uno  
de los accionadores de chorro montados en el cabrestante puede contener o estar acoplado a diferentes fuentes de  
líquido que tienen diferentes tipos de celdas. A continuación, se puede girar el cabrestante para seleccionar el  
accionador de chorro deseado.

15 La rotación del cabrestante se puede controlar mediante un controlador o, alternativamente, se puede controlar manualmente.

La figura 17 ilustra otro ejemplo de un elemento de ajuste 1102. En este ejemplo, el elemento de ajuste 1102 está configurado para efectuar el movimiento de traslación del primer accionador 102 de chorro con respecto al segundo accionador de chorro.

20 En este ejemplo, el primer accionador de chorro está montado en la montura 1100 de cabezal. Una cara 1104 de la montura 1100 de cabezal está acoplada de forma deslizante con una cara 1106 correspondiente de la porción 214 de cuerpo del cabezal de inyección.

25 La alineación se logra mediante el desplazamiento de la montura 1100 del cabezal en una primera dirección (indicada por las flechas F). Las caras 1104, 1106 acopladas de forma deslizante están orientadas con relación a dicha primera dirección de tal manera que cuando la cara 1104 se desliza a lo largo de la cara 1106, la montura 1100 del cabezal también se desplaza en una segunda dirección (indicada por las flechas G). Por lo tanto, el desplazamiento de la montura 1100 del cabezal en una primera dirección también da como resultado el desplazamiento del primer accionador 102 de chorro en una segunda dirección (indicada por las flechas G). En este ejemplo, la primera y la  
30 segunda direcciones son sustancialmente perpendiculares.

35 En este ejemplo, el primer accionador 102 de chorro también puede ser ajustable dentro de la montura 1100 del cabezal. Como tal, el primer accionador 102 de chorro puede moverse dentro de la montura 1100 del cabezal para compensar cualquier movimiento de la montura 1100 del cabezal en la primera dirección F. De esta manera, el primer accionador 102 de chorro puede mantenerse a un nivel consistente con el segundo accionador 104 de chorro.

En este ejemplo, el elemento de accionamiento para ajustar la posición del primer accionador de chorro es un tornillo prisionero o un tornillo de avance (no mostrado).

40 El movimiento de la montura 1100 del cabezal puede ser controlado por un controlador o alternativamente puede

45 La figura 18 ilustra un ejemplo adicional de un elemento 1202 de ajuste. El elemento 1202 de ajuste está configurado para aplicar una fuerza al primer líquido después de que se dispensa desde el primer accionador 102 de chorro para ajustar la trayectoria del primer líquido. Este elemento 1202 de ajuste se puede utilizar como alternativa o en combinación con cualquiera de los elementos de ajuste descritos anteriormente.

50 En este ejemplo, el elemento 1202 de ajuste incluye placas 1206 de flexión cargadas eléctricamente para aplicar una fuerza electrostática al primer líquido. En este ejemplo, las placas 1206 de flexión son electrodos de placas paralelas, que pueden estar hechas de cualquier material conductor adecuado (por ejemplo, acero inoxidable, cobre, aluminio, latón, carburo) y se cargan mediante una fuente 1210 de voltaje CC.

55 Las placas deflectoras cargadas se colocan adyacentes al segundo extremo 102<sub>2</sub> del primer accionador 102 de chorro. Se aplica una diferencia de potencial apropiada a través de las placas mediante la batería 1210 u otra fuente de energía adecuada. Cuando la(s) gotita(s) entran en el campo eléctrico creado por la diferencia de potencial entre las placas 1206, una fuerza de Lorentz está presente en la gotita y por lo tanto cambia la trayectoria de esa gotita.

60 La figura 18 ilustra la trayectoria de una gota 1204 sin la aplicación de un campo eléctrico. La trayectoria de las gotas 1208 se ha desplazado en la dirección de las flechas  $H$  mediante la aplicación de un campo eléctrico.

El grado de ajuste está relacionado con la fuerza del campo eléctrico, que viene dictada por la diferencia de potencial aplicada a través de los electrodos de placa. Para aumentar la influencia en la trayectoria de las gotas o para cambiar la dirección de la desviación, se aumenta la diferencia de potencial o se invierte la polaridad, respectivamente.

- 5 Cada uno de los ejemplos descritos en el presente documento se usa en un método de impresión 3D y puede ser particularmente adecuado para la bioimpresión 3D. En uso, los accionadores de chorro primero y segundo están provistos de un primer y un segundo líquido respectivamente. Los líquidos pueden alimentarse a los accionadores de chorro desde las respectivas fuentes de líquido o las fuentes de líquido pueden ser depósitos dentro de cada primer y segundo accionador de chorro respectivo.
- 10 El primer accionador de chorro está alineado con el segundo accionador de chorro a través del elemento de ajuste de modo que las gotitas de líquido dispensadas desde cada accionador de chorro tienen trayectorias que se cruzan. De esta manera, las gotitas de líquido pueden incidir cuando se dispensan.
- 15 El sistema de control controla la liberación del primer y segundo líquidos de los accionadores de chorro primero y segundo para liberar los líquidos en forma de gotitas (drop-on-demand). El controlador mide el tiempo de liberación de las gotitas de modo que la primera y la segunda gotitas de líquido inciden y se combinan en el aire. La gota combinada cae y, por lo tanto, se deposita sobre el sustrato para formar parte de una estructura impresa en 3D.
- 20 Son posibles diversas modificaciones de las disposiciones detalladas descritas anteriormente.
- 25 Cada uno de los aparatos de ejemplo descritos en este documento puede ser adecuado para bioimpresión tridimensional.
- 30 El sistema de control descrito en relación con las Figuras 3a-3b puede ser adecuado para controlar cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.
- 35 Los ejemplos anteriores describen la alineación de dos accionadores de chorro, de manera que las gotas producidas inciden para formar una sola gota. Tal aparato no se limita a la interacción de solo dos gotitas y posiblemente se podría aplicar a cualquier pluralidad de accionadores de chorro (por ejemplo, alineación de tres o más accionadores de chorro).
- 40 Aunque en los ejemplos descritos anteriormente, el primer y segundo líquidos incluyen precursores de gel, también se pueden usar otros líquidos.
- 45 Por ejemplo, al menos uno del primer y segundo líquidos pueden incluir un precursor de polímero reactivo. Los precursores poliméricos reactivos pueden combinarse y reaccionar al incidir para formar un polímero que se puede depositar sobre el sustrato.
- 50 Generalmente, los líquidos que incluyen precursores de gel pueden incluir materiales biológicos, por ejemplo, células, y pueden usarse para bioimpresión. Los materiales biológicos (células o biomoléculas) pueden premezclarse dentro de un precursor de gel (por ejemplo, alginato de sodio o fibrinógeno) y luego la incidencia impresa sobre un sustrato para formar estructuras 3D, que luego se maduran in vivo o in vitro en tejidos funcionales.
- 55 Se apreciará que otros elementos de accionamiento diferentes a los descritos en los ejemplos específicos anteriores también pueden ser adecuados para ajustar la posición de al menos uno de los accionadores de chorro. Por ejemplo, el movimiento lineal, giratorio o pivotante del elemento de accionamiento puede aplicar una fuerza adecuada a al menos uno de los accionadores de chorro para ajustar de ese modo la posición del accionador de chorro.
- 60 Se apreciará que el cabezal de inyección descrito anteriormente en relación con las Figuras 8a y 8b se pueden modificar de forma adecuada para acomodar una matriz de accionadores de chorro y cualquiera de los elementos de ajuste descritos en este documento.
- 65 Con los ejemplos descritos anteriormente, la configuración de la impresora permite una variabilidad más fácil en la viscosidad de los líquidos usados en la impresora. La impresora se puede ajustar para adaptarse a las variaciones de viscosidad. Por ejemplo, se puede ajustar la posición de al menos uno de los accionadores de chorro, se puede ajustar la trayectoria de las gotas a medida que salen de los chorros o se pueden controlar los tiempos de deposición de las gotas en cada accionador de chorro para asegurar que las trayectorias de las gotas se encuentran (se cruzan) y las gotas inciden. Puede utilizarse cualquier combinación de estos métodos de ajuste.
- 70 Cada uno de estos métodos de ajuste permite un ajuste fino de las trayectorias de las gotitas de líquido que salen de los accionadores de chorro. El ajuste está en la escala de micrones y puede permitir ajustes de alrededor de 0 a 150  $\mu\text{m}$ .
- 75 Por lo tanto, la configuración de la impresora puede proporcionar una impresión de materiales más consistente, ya que la incidencia de los líquidos se puede controlar con precisión.

La energía impartida a una gota por un accionador de chorro se conserva a través del proceso de incidencia, lo que significa que, si una gota incide sobre una gota de mayor velocidad o masa, la gota combinada resultante procederá con un sesgo hacia la dirección de la gota de mayor energía. Puede ser necesario tener masas o velocidades desiguales de las gotitas para asegurar que la gotita combinada permanezca en la trayectoria deseada dependiendo del material que se procesa.

Alternativamente o además, se pueden usar otros mecanismos para asegurar que la gota combinada permanezca en el camino deseado. Por ejemplo, el sistema de control puede incluir un control de optimización de retroalimentación y velocidad (presión). Alternativamente o además, los accionadores de chorro pueden inclinarse (por ejemplo, accionando elementos de las figuras 10-13, 15 o 16). Esto ayuda a ajustar la dirección inicial de movimiento de la gota para tener en cuenta cualquier efecto de sesgo sobre la incidencia. Alternativamente o además, se puede usar un chorro neumático, que puede aplicar un chorro de aire altamente controlado para cambiar la trayectoria de la gota. Alternativamente o además, se puede usar un campo eléctrico (de una manera similar al ejemplo de la figura 18) para mantener la gota combinada en la trayectoria prevista.

Los ejemplos descritos anteriormente también proporcionan una fiabilidad mejorada. Al usar precursores de menor viscosidad que reaccionan al incidir, es menos probable que los líquidos se gelifiquen en los accionadores de chorro y, por lo tanto, se puede reducir o prevenir significativamente la obstrucción de los accionadores de chorro. Al usar líquidos de menor viscosidad en los accionadores de chorro, los líquidos se pueden depositar más rápido que los líquidos de mayor viscosidad y, por lo tanto, la velocidad del proceso de impresión se puede aumentar significativamente.

Los ejemplos descritos anteriormente se pueden ampliar para requisitos de impresión a mayor escala aumentando el número de pares de accionadores de chorro dentro del cabezal de impresión para formar una matriz de chorros que inciden. Cada par de accionadores de chorro puede depositar los mismos líquidos, lo que permite una impresión más rápida de un solo material. En otros ejemplos, al menos uno de los pares de accionadores de chorro puede depositar líquidos diferentes en comparación con los otros accionadores de chorro. Esto puede permitir la impresión simultánea de diferentes materiales, aumentando así la eficiencia de impresión. En algunos ejemplos, el proceso de impresión puede ser decenas de veces más rápido o más que los métodos conocidos anteriormente.

Aunque se esperaría que los cabezales de inyección diseñados para I + D utilicen mecanismos de alineación para optimizar los materiales no caracterizados, las matrices de inyección compactas grandes pueden no necesitar la instalación para la alineación posterior a la fabricación, ya que los cabezales de inyección podrían alinearse durante el proceso de fabricación. Estos cabezales podrían diseñarse para materiales específicos y estar pensados para un alto rendimiento. La figura 19 ilustra una matriz 1300 de chorro compacta grande, que incluye válvulas 1302 de control. La vista ampliada, M, muestra una vista detallada de la micromatriz de chorro 1304.

Cada par de accionadores de chorro en la matriz puede tener al menos un accionador de chorro cuya posición es ajustable independientemente. De esta manera, las incidencias de los líquidos de cada par de accionadores de chorro en la matriz se pueden ajustar por separado.

El aparato de impresión de la invención tiene utilidad en la bioimpresión. A este respecto, ambos accionadores de chorro están configurados para dispensar un líquido que comprende células viables. Por lo tanto, el aparato de impresión de la invención puede usarse para producir materiales biológicos (tales como geles que comprenden células biológicas).

De manera adecuada, el primero, segundo o ambos accionadores de chorro pueden configurarse para dispensar un precursor de gel (por ejemplo, alginato de sodio o fibrinógeno) que comprende células o biomoléculas, que pueden imprimirse sobre un sustrato para formar estructuras 3D, que son luego maduradas *in vivo* o *in vitro* en tejidos funcionales.

Ventajosamente, la presente invención proporciona el uso del aparato de impresión de la presente invención para bioimpresión. Por ejemplo, el aparato de bioimpresión se puede usar para imprimir estructuras 3D (por ejemplo, geles) que tienen una concentración más alta de células viables lograda usando sistemas de bioimpresión basados en jeringas. Por lo tanto, el aparato de impresión de la invención puede proporcionar una mayor flexibilidad de densidad celular para aplicaciones de bioimpresión.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso del aparato de impresión para producir un gel que comprende células viables, opcionalmente a una concentración de 10 millones a 90 millones de células por ml de precursor líquido.

La presente invención también proporciona un método para preparar un gel que comprende células viables, comprendiendo dicho método imprimir en 3D el gel utilizando el aparato de la invención en el que el primer o el segundo accionador de chorro está configurado para dispensar un líquido que comprende células viables y el primer y segundo líquido se combinan para formar un gel.

- La presente invención comprende además un método para preparar un gel que comprende células viables, comprendiendo dicho método un método de impresión 3D de la invención, en el que el primer y/o segundo líquido comprende células viables y los líquidos se combinan para formar un gel.
- 5 De forma adecuada, en cada uno de los métodos y usos anteriores, se pueden formar estructuras 3D (por ejemplo, geles) que comprenden células o biomoléculas a una concentración de: al menos 5 millones de células por ml; o al menos 10 millones de células por ml; o al menos 15 millones de células por ml; o al menos 20 millones de células por ml; o al menos 25 millones de células por ml o al menos 30 millones de células por ml; o al menos 40 millones de células por ml; o al menos 150 millones de células por ml; o al menos 60 millones de células por ml; o al menos 70 millones de células por ml o al menos 80 millones de células por ml.
- 10 De forma adecuada, en cada uno de los métodos y usos anteriores, se pueden formar estructuras 3D (por ejemplo, geles) que comprenden células o biomoléculas a una concentración de entre: 5 a 90 millones de células por ml; o de 10 a 90 millones de células por ml; o de 15 a 80 millones de células por ml; o de 20 a 60 millones de células por ml; o de 25 a 50 millones de células por ml; o de 30 a 40 millones de células por ml. De manera adecuada, tales geles pueden formarse con la necesidad de una etapa de reticulación previa o posterior a la deposición.
- 15 De forma adecuada, el aparato de impresión de la invención permite producir geles de tales concentraciones de células viables dentro de geles viscosos tales como CAF (colágeno-alginato-fibrina).
- 20 La presente invención proporciona además células que comprenden gel (por ejemplo, células viables) en cualquiera de las concentraciones divulgadas en el presente documento. Tales geles se pueden producir usando el aparato de la invención o por los métodos de la invención.
- 25 De forma adecuada, los geles pueden comprender células estromales mesenquimales y el gel puede ser colágeno-alginato-fibrina. De forma adecuada, el gel puede comprender colágeno, alginatos, fibrina o combinaciones de los mismos.
- 30 De forma adecuada, el tipo de gel se selecciona de acuerdo con el uso del gel y variará de acuerdo con las células que se impriman. Por ejemplo, cuando las células son células estromales mesenquimales, el gel puede ser colágeno-alginato-fibrina.
- 35 Se ha descubierto sorprendentemente que concentraciones más altas de células (por ejemplo, 40 millones por ml) que pueden bioimprimirse de acuerdo con la invención pueden tener efectos ventajosos en los procesos de cultivo y diferenciación celular. Por ejemplo, una mayor concentración de células puede dar como resultado una mayor velocidad de maduración de las células deseables durante un proceso de diferenciación celular y puede aumentar la velocidad a la que se pueden fabricar los micro-tejidos deseables.
- 40 A continuación, se ilustra un ejemplo de tales propiedades deseables. Sin embargo, puede verse que esto es ilustrativo de la aplicación general de las ventajas de usar el aparato de impresión de la invención para generar tejidos.
- 45 La figura 20 muestra el número de células, la viabilidad y la funcionalidad de dos geles llenos de células depositados usando el aparato de impresión de la invención. La Figura 20A son imágenes de estereomicroscopio que muestran la morfología de los geles CAF cargados con  $4 \times 10^6$  células/ml (arriba) y  $40 \times 10^6$  células/ml (abajo) inmediatamente después de la impresión. La barra de escala representa 200 mm. b Pila de volumen de microscopía confocal que muestra la distribución celular en geles CAF con diferente número de células. La barra de escala representa 200  $\mu$ m. El gel superior se creó con una concentración de 4 millones de células por ml de precursor líquido, el gel inferior se creó con una concentración de 40 millones de células por ml. Aquí los geles son colágeno-alginato-fibrina (CAF), y las células son células estromales mesenquimales, con los geles llenos de células cultivados durante un período de dos semanas en medio osteogénico para inducir la diferenciación de las células hacia osteoblastos y la formación neotejido óseo. La Figura 20b confirma las densidades celulares mediante la pila de volumen de microscopía confocal que muestra la distribución celular en geles CAF con diferente número de células. La barra de escala representa 200  $\mu$ m.
- 50 La Figura 21 muestra la deposición de calcio y la morfología celular después de la incubación durante 7 y 14 días en medio osteogénico mediante microscopía electrónica de barrido. Las Figuras 21 a y b muestran la deposición de calcio en hidrogeles de baja y alta densidad celular, respectivamente. Es posible verificar una deposición más rápida y aumentada en hidrogeles de  $40 \times 10^6$  células/ml. c y d demuestran cómo cambia la morfología de MSC durante la diferenciación para muestras de baja y alta densidad celular, respectivamente. Las células cuboidales ya son observables el día 7 en hidrogeles de  $40 \times 10^6$  células/ml. Lo mismo solo ocurre después de 14 días de diferenciación en muestras de baja densidad celular. Las barras de escala representan 10  $\mu$ m (a y b) y 20  $\mu$ m (c y d). Por consiguiente, la Figura 21 ilustra una mayor deposición de calcio y la aparición más temprana de células de osteoblastos cuboidales con la mayor densidad celular.
- 55 La Figura 23 muestra la expresión de genes y proteínas osteogénicas en términos de cambio de multiplicidad del gen osteogénico seleccionado y marcadores de proteínas, comparando los 40 millones de células por ml de gel en el día
- 60
- 65

14 con los 4 millones de células por ml de gel en el día 14, respectivamente. El día 14, los geles cargados con  $40 \times 10^6$  células/ml presentan una expresión génica que refleja la formación de osteoblastos maduros, contrariamente a los geles cargados con  $4 \times 10^6$  células/ml que muestran una expresión génica relacionada con los osteoblastos pretemprana. Por lo tanto, estos datos de la matriz de PCR, que comparan la expresión de marcadores genómicos y proteómicos óseos dentro de ambos tejidos, muestra que el microtejido de alta densidad celular tiene una expresión mucho mayor de osteopontina (SPP1) y proteínas morfogénicas óseas 2 y 6 (BMP-2 y BMP-6). Esto indica que el micro-tejido producido con la densidad celular más alta es más maduro. Tomados en conjunto, estos resultados indican, utilizando hueso como sistema modelo, que la alta densidad celular que se puede conseguir con el aparato de impresión de la invención tiene un claro impacto en la velocidad con la que se pueden fabricar los microtejidos maduros.

## REIVINDICACIONES

1. Un aparato (100) de impresión 3D para incidir líquidos de al menos dos fuentes de líquido, comprendiendo el aparato:
  - 5 un primer accionador (102) de chorro configurado para dispensar un primer líquido que comprende células viables desde una primera fuente de líquido;
  - 10 un segundo accionador (104) de chorro configurado para dispensar un segundo líquido que comprende células viables desde una segunda fuente de líquido; y caracterizado porque el aparato de impresión 3D comprende además un elemento (202) de ajuste configurado para ajustar una trayectoria de al menos el primer líquido dispensado desde el primer accionador de chorro de manera que el primer líquido incida sobre el segundo líquido dispensado desde el segundo accionador de chorro,
  - 15 y porque el elemento de ajuste está configurado para ajustar la posición del primer accionador de chorro con respecto al segundo accionador de chorro para ajustar la trayectoria del primer líquido dispensado desde el primer accionador de chorro.
- 20 2. Un aparato de impresión 3D de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el elemento de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de traslación del primer accionador de chorro con respecto al segundo accionador de chorro.
- 25 3. Un aparato de impresión 3D de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el elemento de ajuste está configurado para efectuar el movimiento de rotación del primer accionador de chorro.
- 30 4. Un aparato de impresión 3D de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el elemento de ajuste comprende un elemento accionador para ajustar la posición del primer accionador de chorro y, opcionalmente, en el que el elemento de ajuste comprende además un controlador para controlar el elemento accionador.
- 35 5. Un aparato de impresión 3D de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el elemento de ajuste comprende además un elemento de empuje dispuesto para oponerse a la fuerza del elemento de accionamiento sobre el primer accionador de chorro y, opcionalmente, en el que el elemento de ajuste comprende además un elemento de empuje adicional dispuesto para aplicar una fuerza al primer accionador de chorro para controlar el movimiento de rotación del primer accionador de chorro al accionar el elemento de accionamiento.
- 40 6. Un aparato de impresión 3D de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el primer accionador de chorro está montado excéntricamente en una pinza, y en el que el elemento de accionamiento está configurado para girar la pinza para ajustar linealmente la posición del primer accionador de chorro con respecto al segundo accionador de chorro.
- 45 7. Un aparato de impresión 3D de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el elemento de ajuste está configurado para aplicar una fuerza al primer líquido después de que se dispensa desde el primer accionador de chorro para ajustar la trayectoria del primer líquido, y/u opcionalmente en el que el elemento de ajuste comprende placas deflectoras cargadas eléctricamente para aplicar una fuerza electrostática al primer líquido, y/u opcionalmente en el que las placas deflectoras cargadas están colocadas adyacentes a una boquilla de salida del primer accionador de chorro y/u opcionalmente en el que el primer y segundo accionadores de chorro son configurados como accionadores drop-on-demand y/o que, opcionalmente, comprenden además un controlador de chorro para controlar la liberación del primer y segundo líquidos desde los respectivos primer y segundo accionadores de chorro.
- 50 8. Uso del aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para bioimpresión tridimensional.
- 55 9. Uso del aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para producir un gel que comprende células viables, opcionalmente a una concentración de 10 millones a 90 millones de células por ml de fuente líquida.
- 60 10. Un método de bioimpresión 3D que comprende:
  - proporcionar un primer accionador de chorro configurado para dispensar un primer líquido que comprende células viables desde una primera fuente de líquido;
  - 65 proporcionar un segundo accionador de chorro configurado para dispensar un segundo líquido que comprende células viables desde una segunda fuente de líquido; ajustar una trayectoria de al menos el primer líquido dispensado desde el primer accionador de chorro de manera que el primer líquido incida y se combine con el segundo líquido dispensado desde el segundo accionador de chorro; y depositar el primer y segundo líquido combinado sobre un sustrato

en el que el elemento de ajuste está configurado para ajustar la posición del primer accionador de chorro con respecto al segundo accionador de chorro para ajustar la trayectoria del primer líquido dispensado desde el primer accionador de chorro.

- 5 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el primer líquido comprende un primer precursor de gel y el segundo líquido comprende un segundo precursor de gel, y opcionalmente en el que al menos uno del primer y segundo precursores de gel comprenden materiales biológicos, y opcionalmente en el que el primer líquido comprende un primer precursor de polímero reactivo y el segundo líquido comprende un segundo precursor de polímero reactivo.
- 10 12. Un método para preparar un gel que comprende células viables, comprendiendo dicho método imprimir en 3D el gel usando el aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el primer o segundo accionador de chorro está configurado para dispensar un líquido que comprende células viables y el primer y segundo líquido se combinan para formar un gel.
- 15 13. Un método para preparar un gel que comprende células viables, comprendiendo dicho método las etapas del método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que el primer y/o el segundo líquido comprenden células viables y los líquidos se combinan para formar un gel.
- 20 14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el gel comprende células a una concentración de entre 10 millones y 90 millones de células por mL.
- 25 15. Un gel que comprende células a una concentración de entre 10 millones y 90 millones de células por mL producidas usando el aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o por el método de la reivindicación 14.

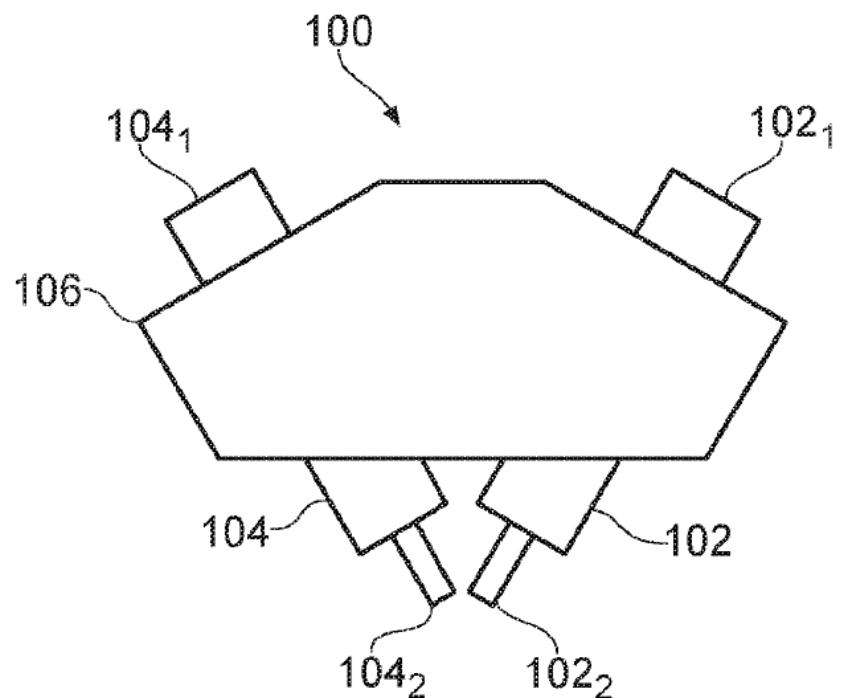


FIG. 1a

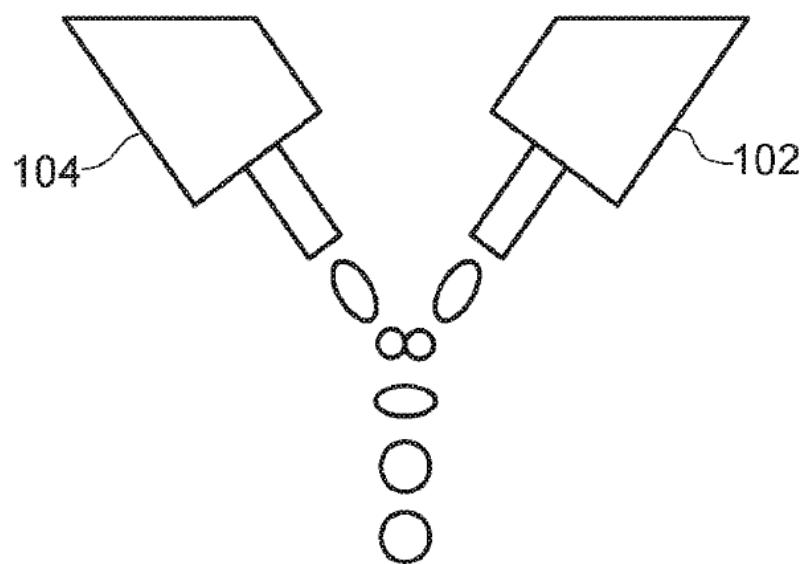


FIG. 1b

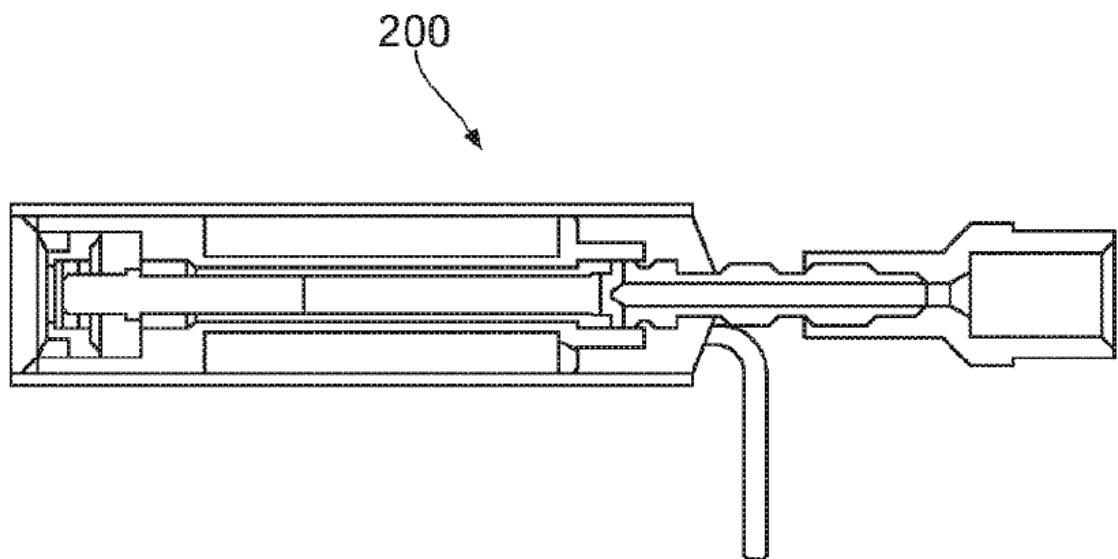


FIG. 2

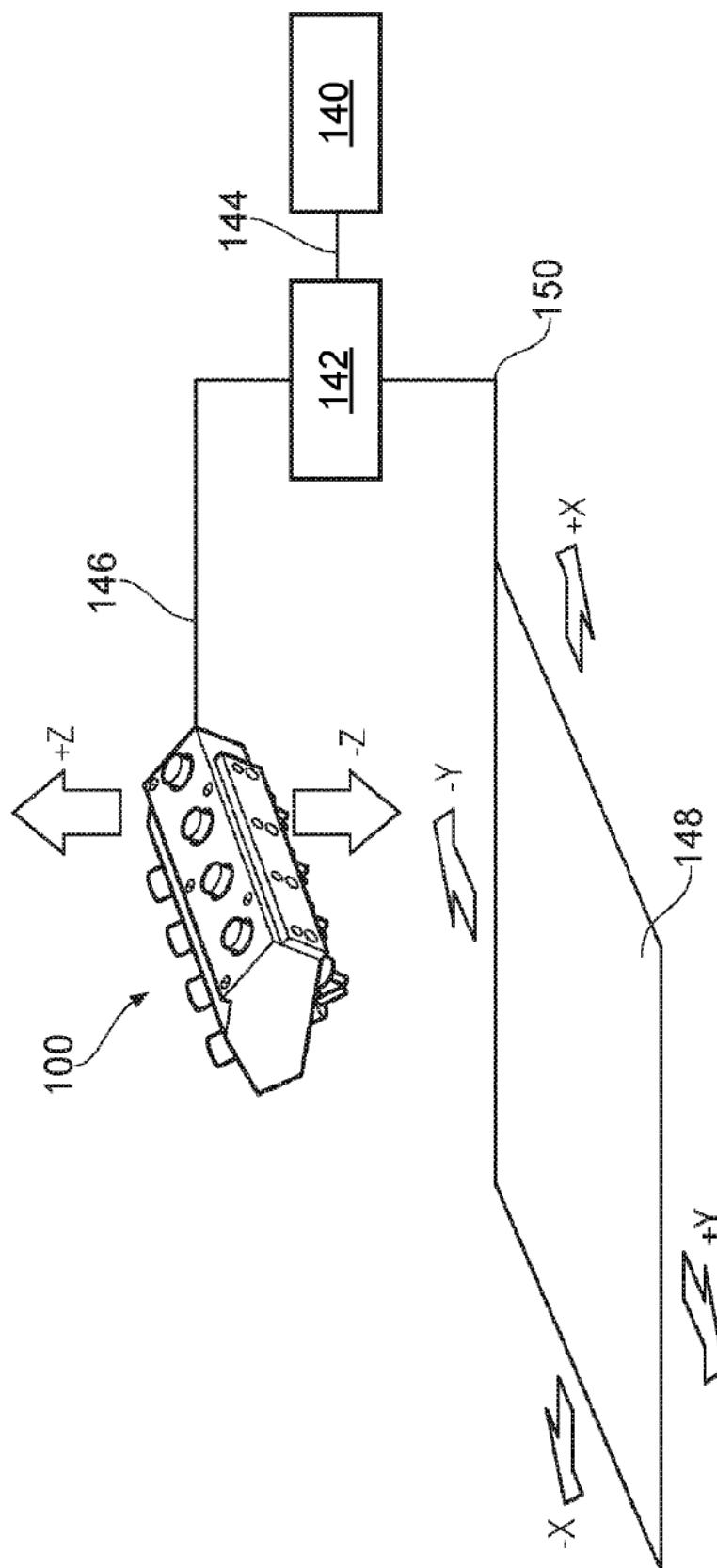


FIG. 3a

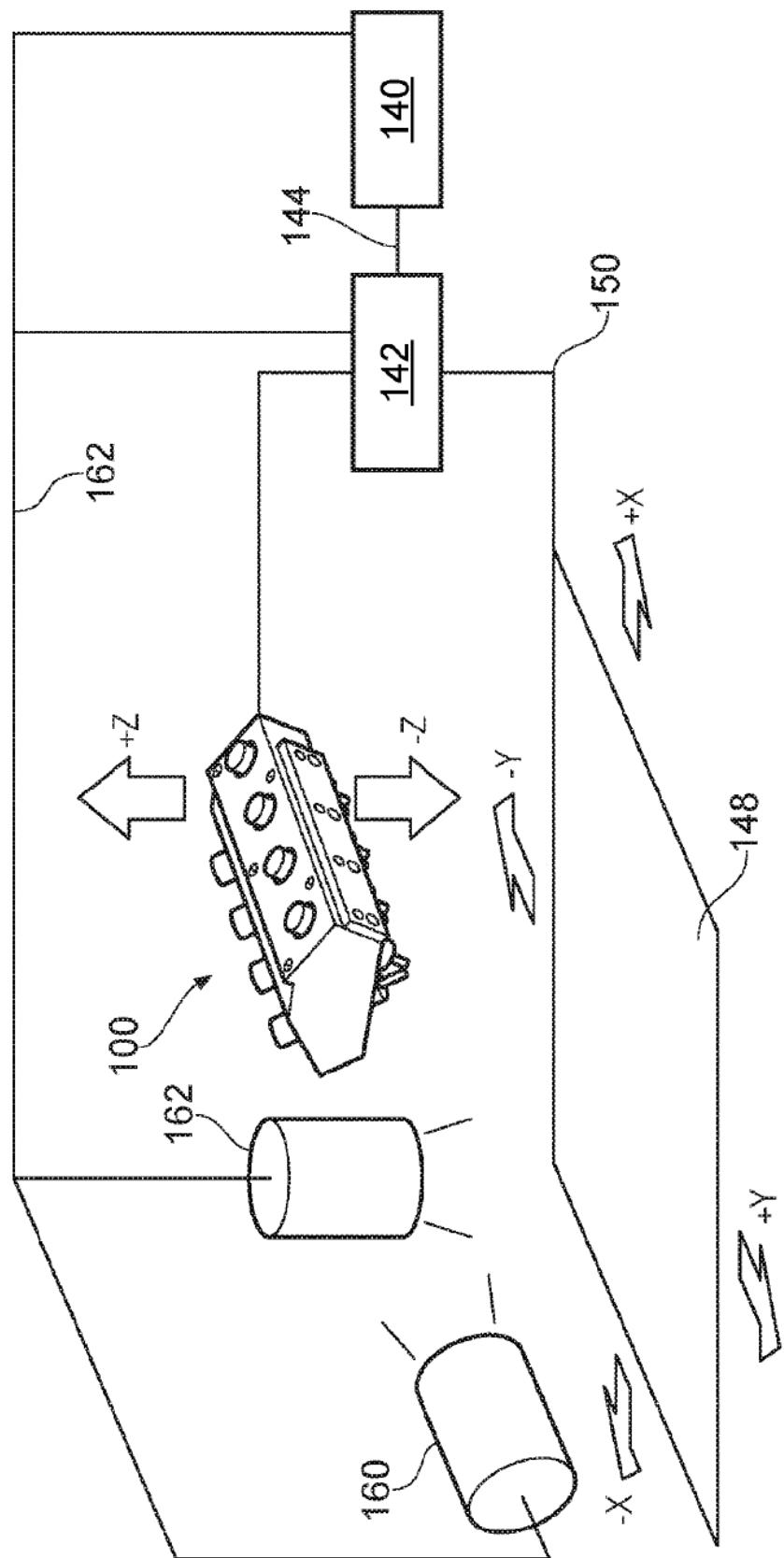


FIG. 3b

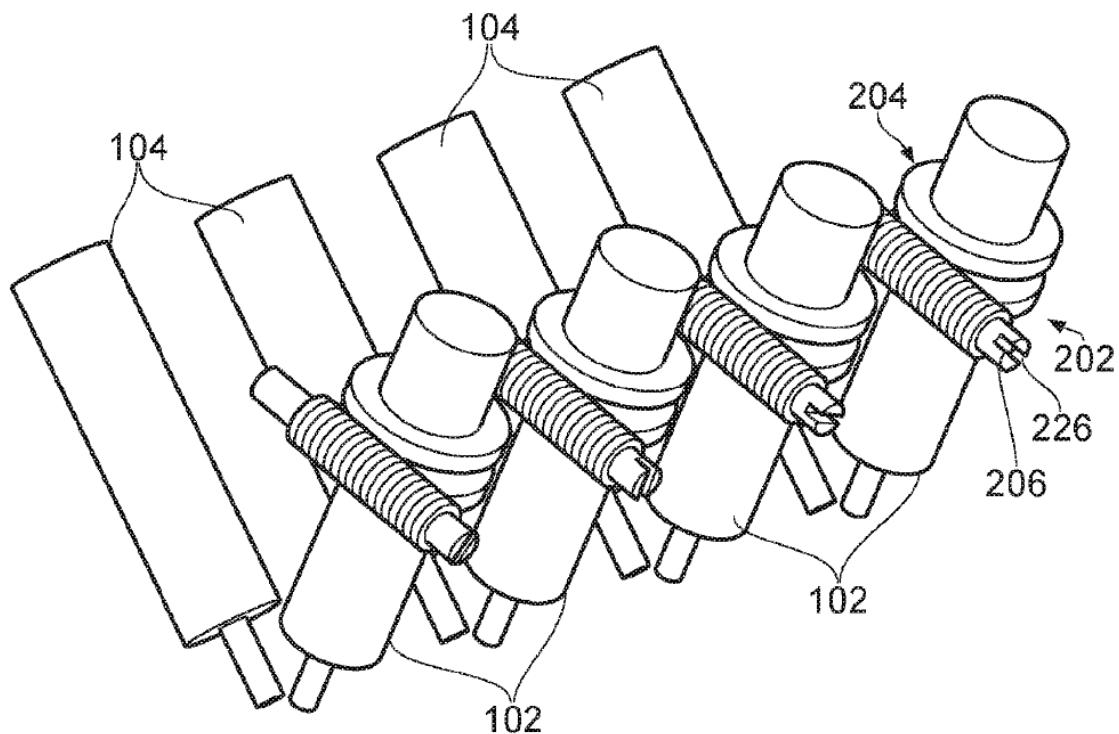


FIG. 4

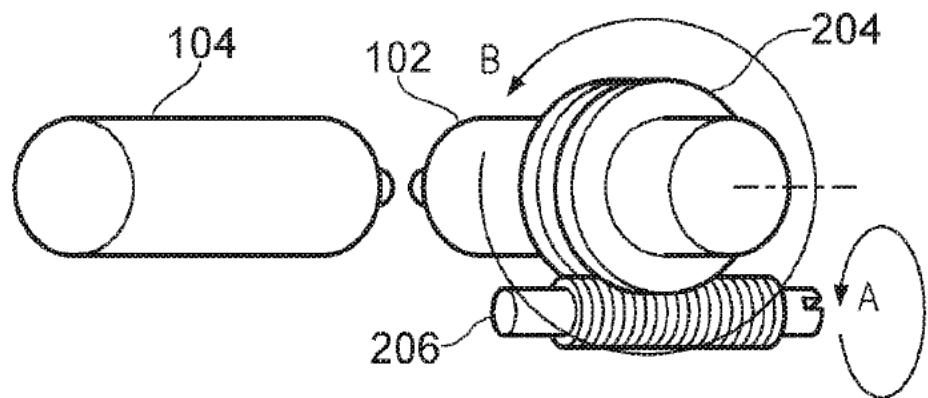


FIG. 5

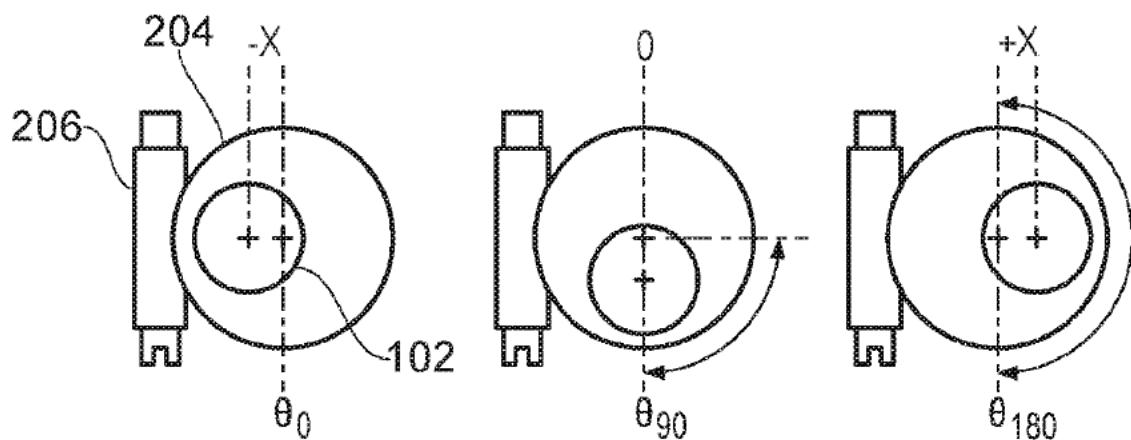


FIG. 6a

FIG. 6b

FIG. 6c

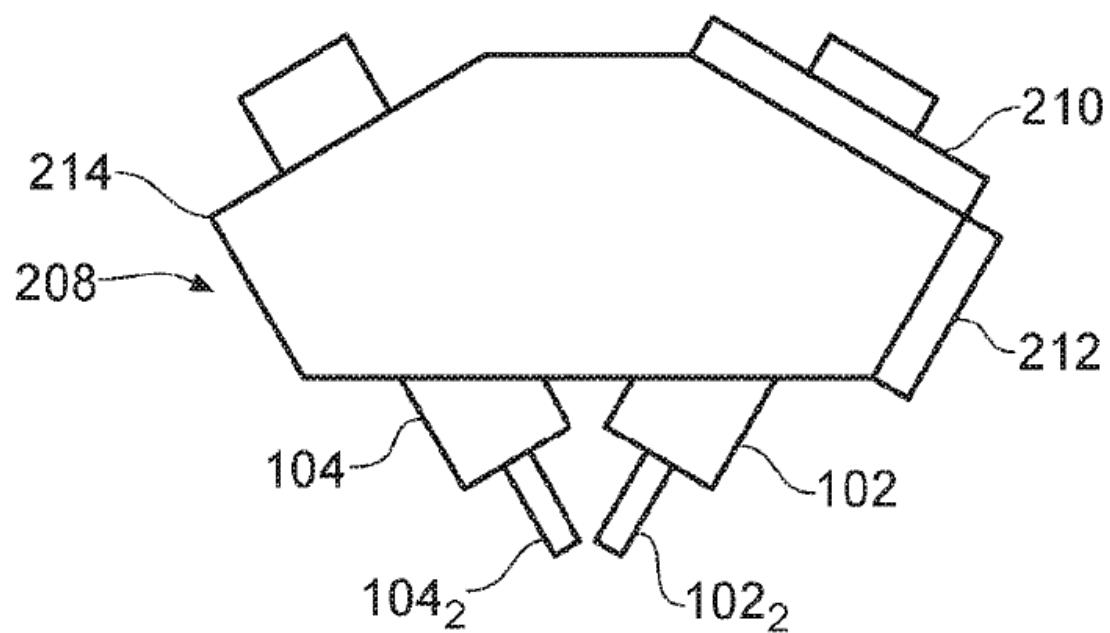
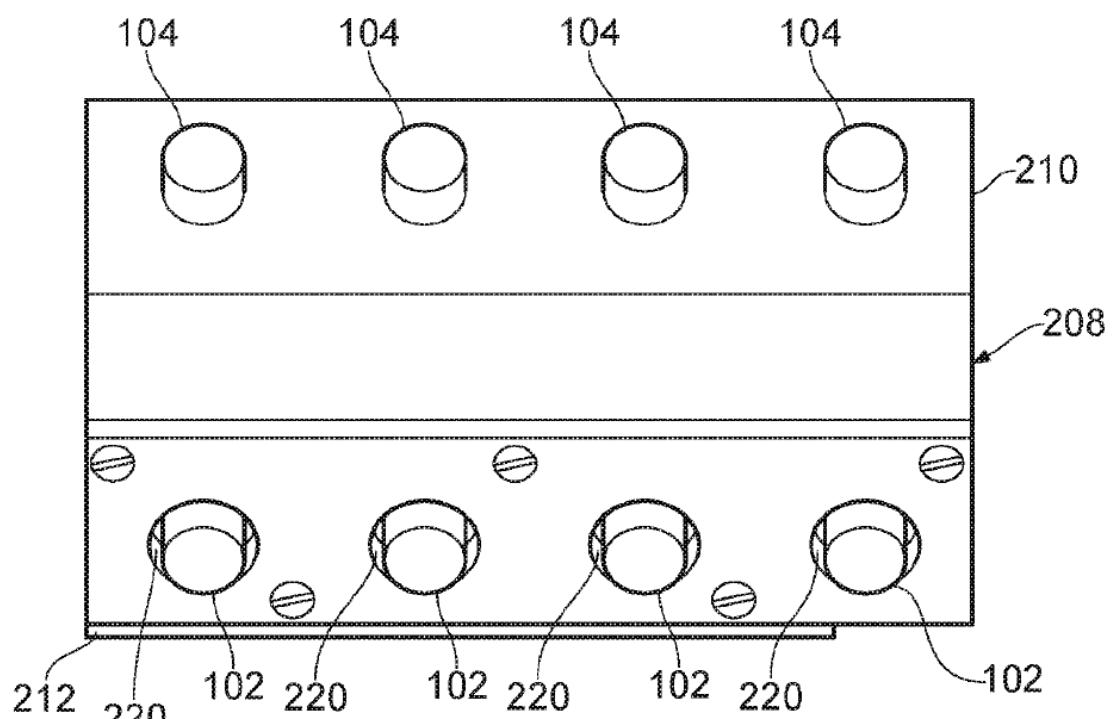
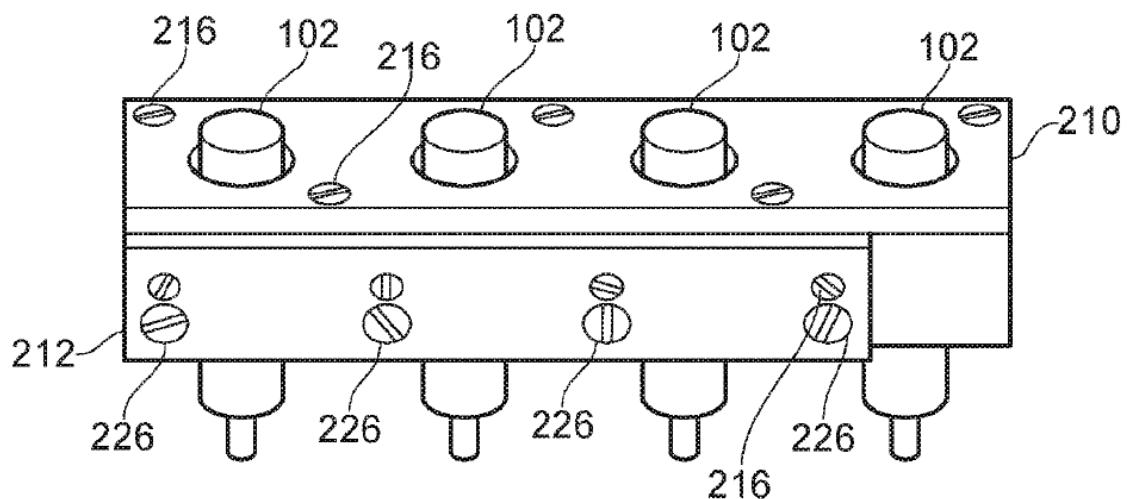


FIG. 7



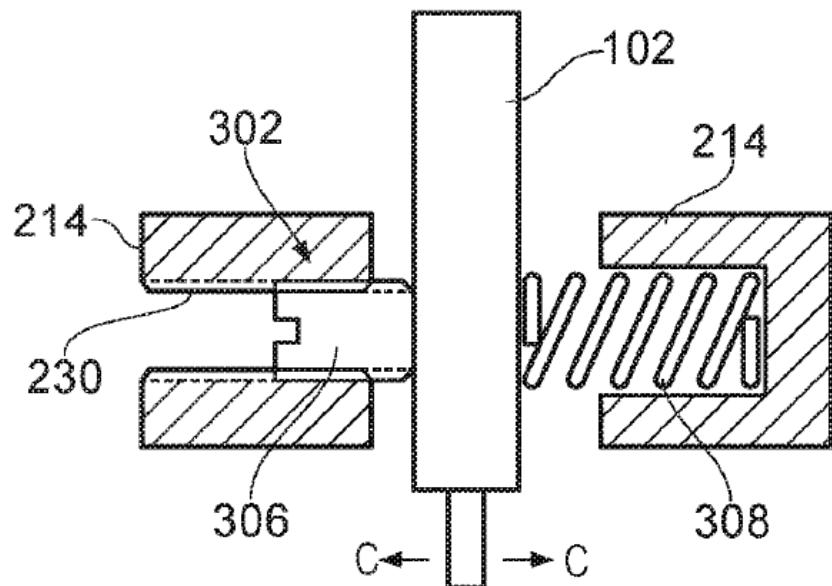


FIG. 9

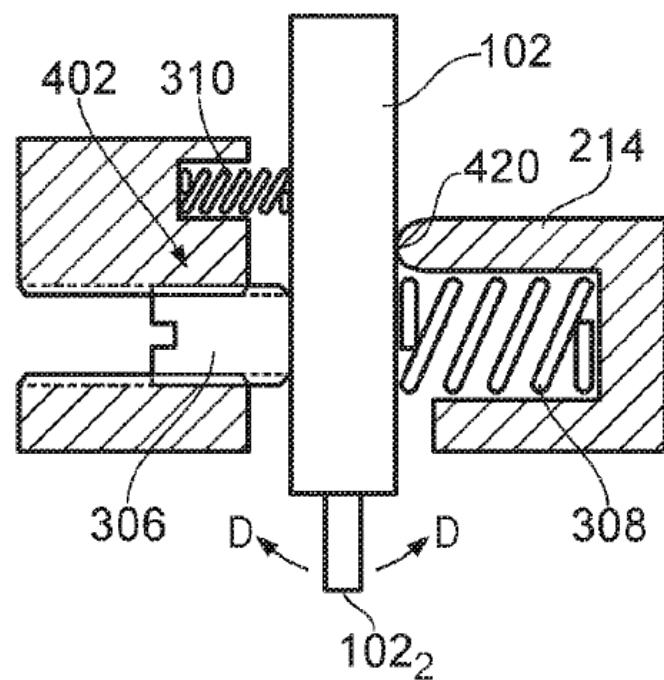


FIG. 10

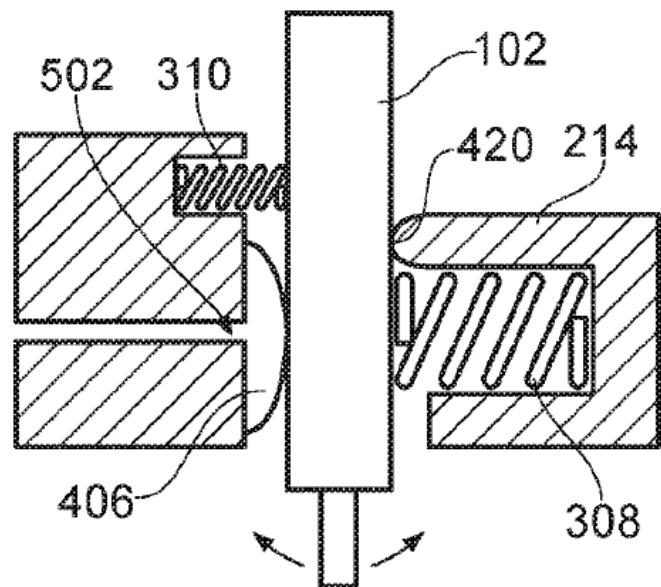


FIG. 11

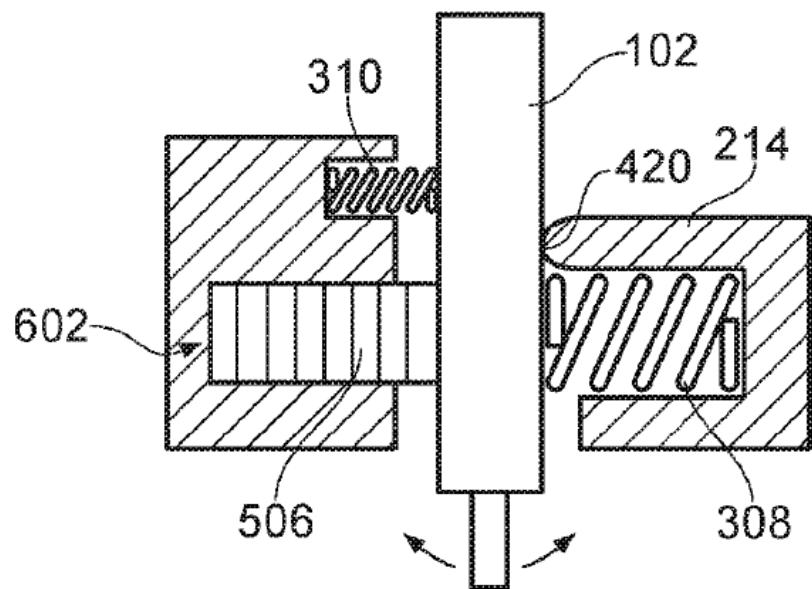


FIG. 12

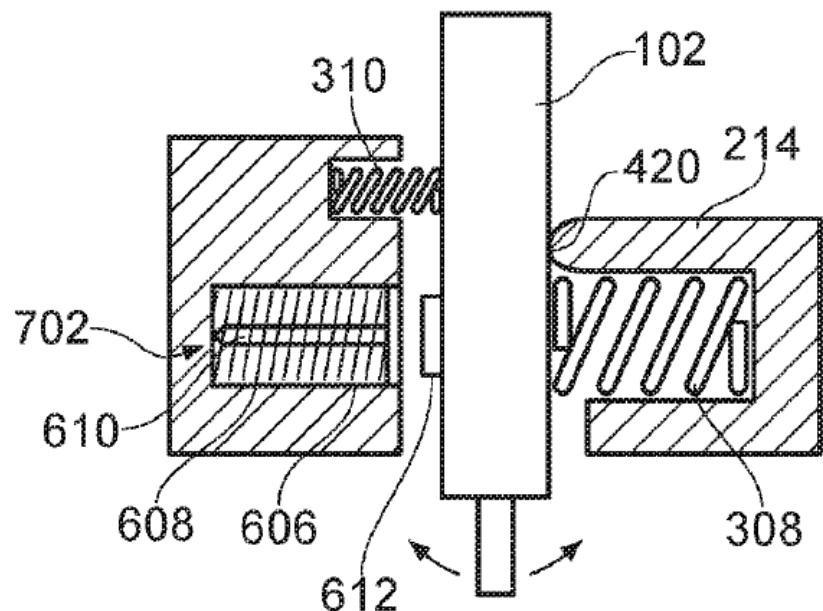


FIG. 13

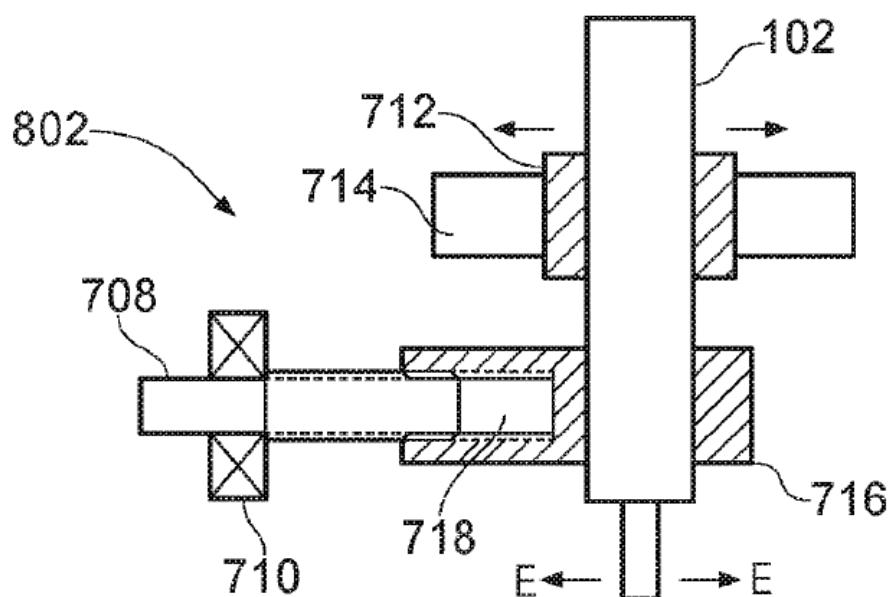


FIG. 14

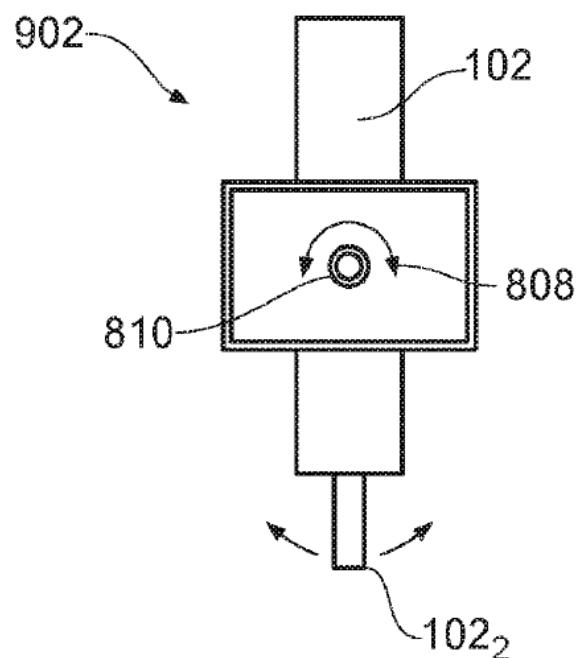


FIG. 15

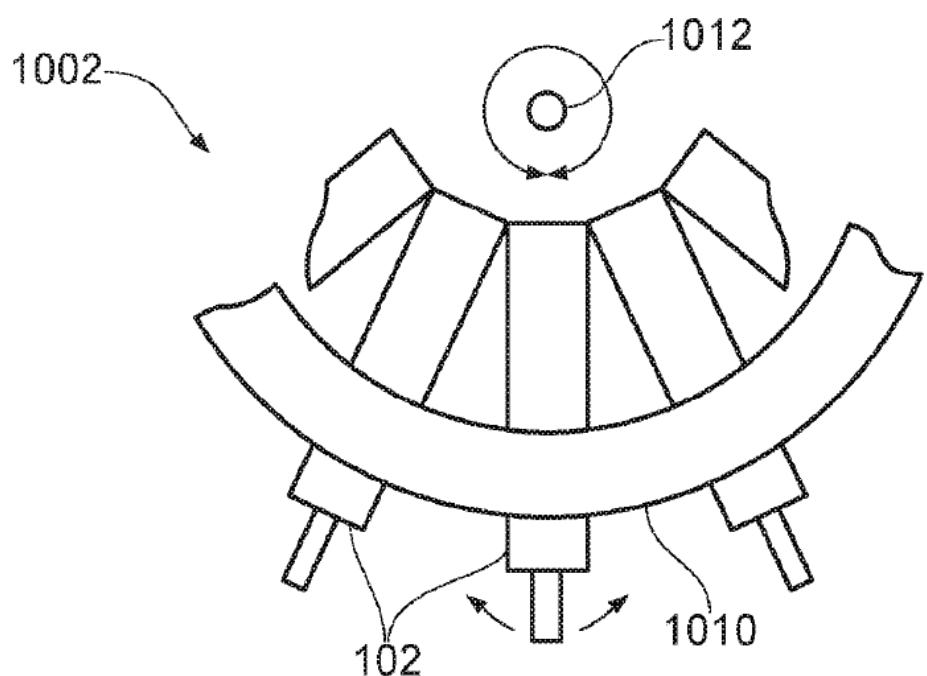


FIG. 16

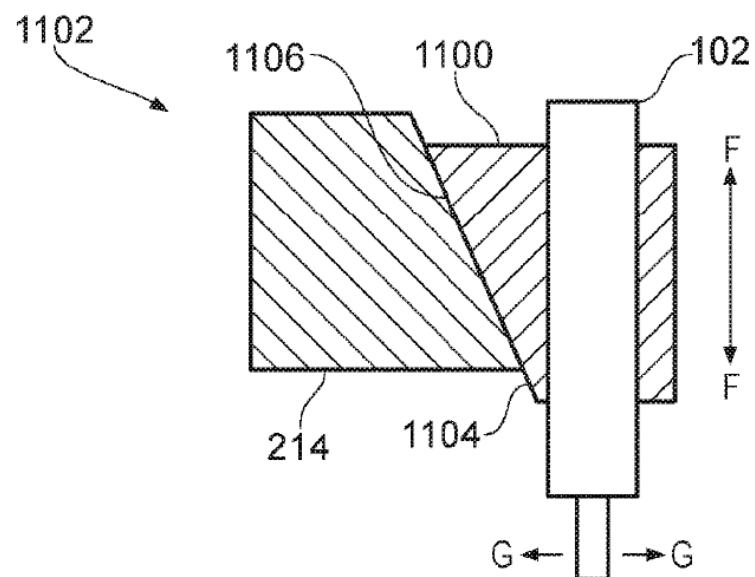


FIG. 17

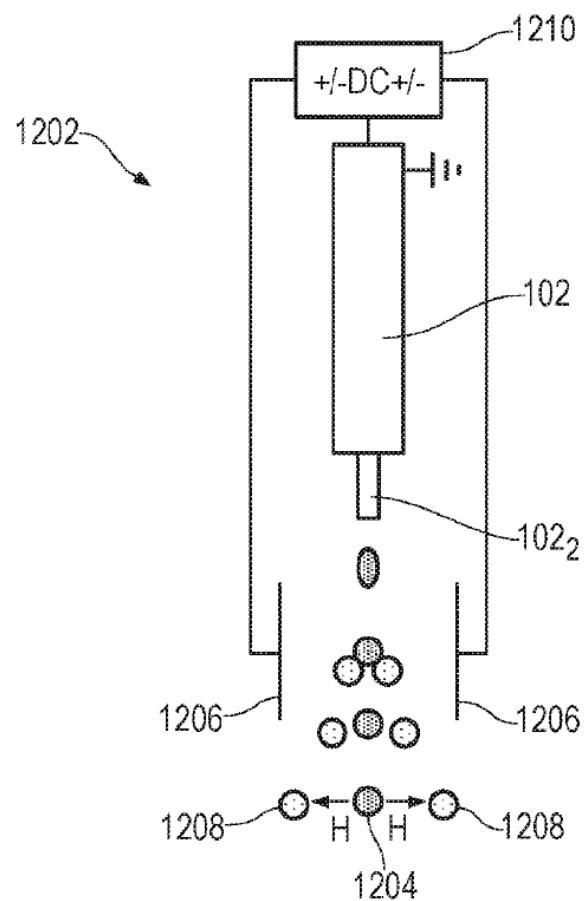


FIG. 18

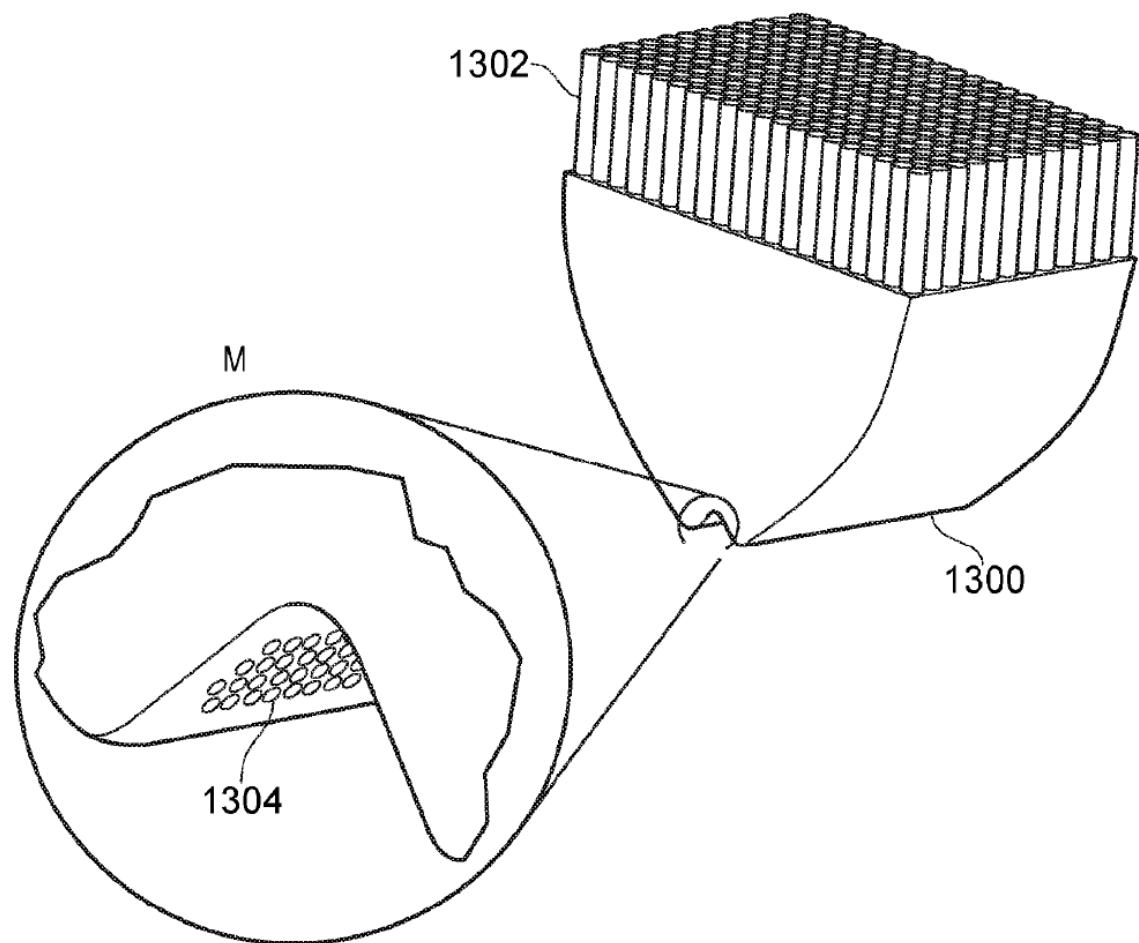


FIG. 19

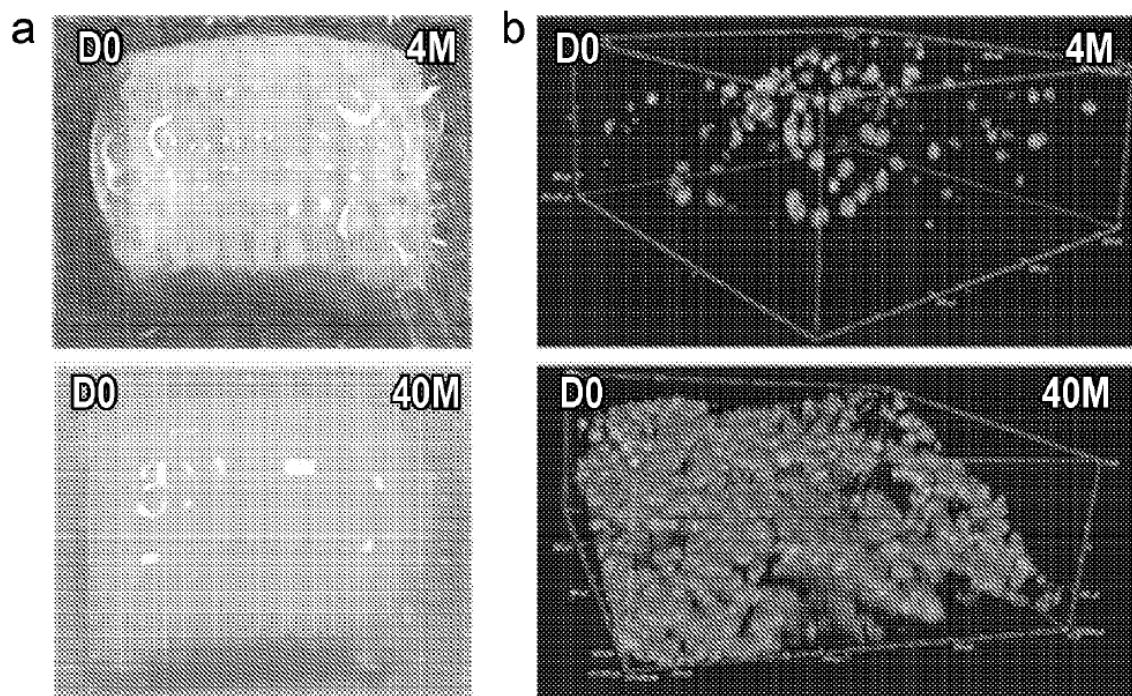


FIG. 20

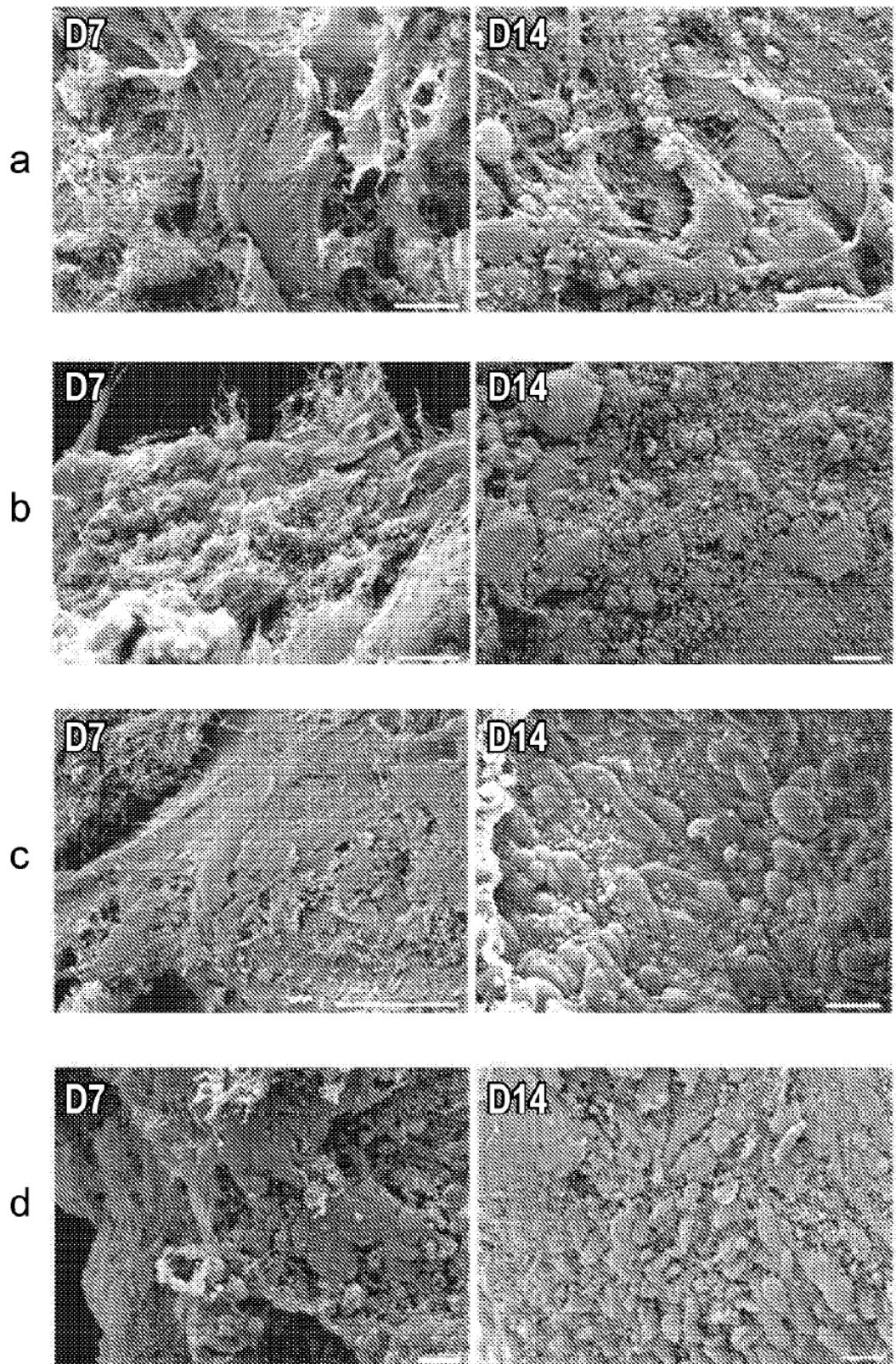


FIG. 21

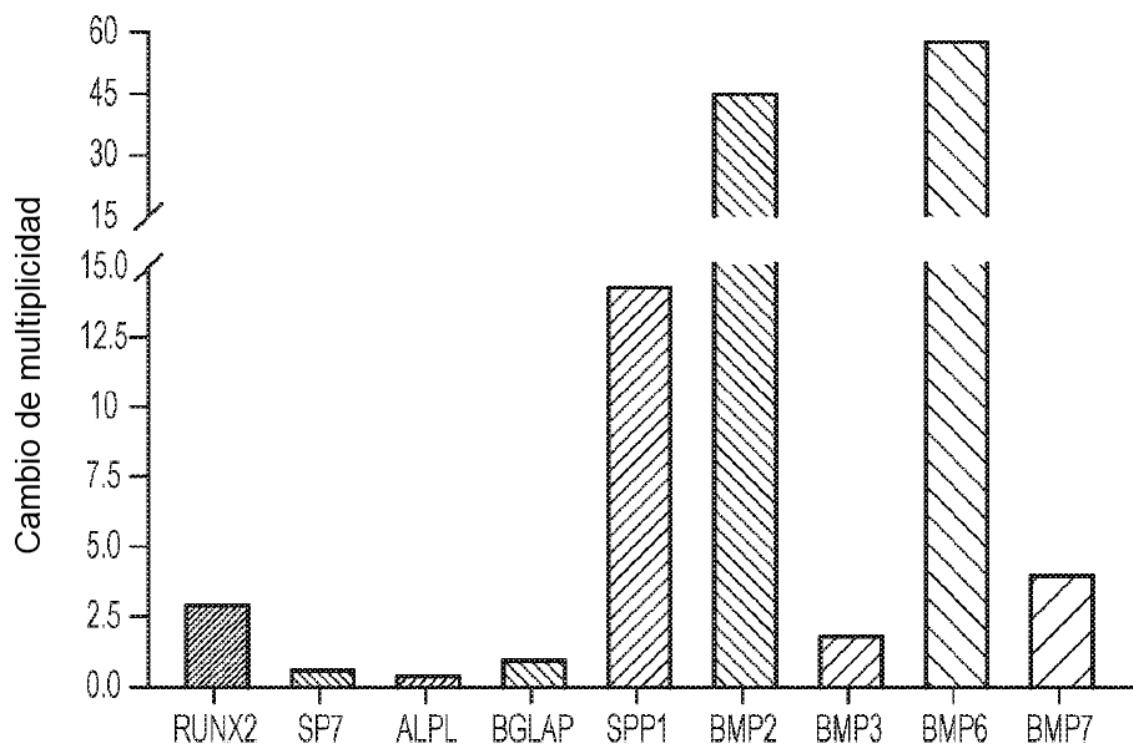


FIG. 22