

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 141**

51 Int. Cl.:

B29C 64/112	(2007.01) C12N 5/071	(2010.01)
B29C 64/245	(2007.01) C12N 5/00	(2006.01)
B29C 64/343	(2007.01)	
B33Y 10/00	(2015.01)	
B33Y 30/00	(2015.01)	
B33Y 40/00	(2010.01)	
B33Y 80/00	(2015.01)	
A61L 27/50	(2006.01)	
A61L 27/38	(2006.01)	
A61L 27/54	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2020** **PCT/EP2020/071804**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2021** **WO21023708**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2020** **E 20747426 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024** **EP 4007689**

54 Título: **Método y unidad de control para la impresión 3D de tejidos y órganos vascularizados**

30 Prioridad:

02.08.2019 EP 19189755

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2024

73 Titular/es:

TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN (100.0%)
Strasse des 17. Juni 135
10623 Berlin, DE

72 Inventor/es:

SCHÄFER, KONSTANZE y
SALOMON, ANDREAS

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 989 141 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y unidad de control para la impresión 3D de tejidos y órganos vascularizados

- 5 La invención se refiere a un método de impresión 3D para la producción de tejidos y órganos que comprenden estructuras vasculares según el término general de la reivindicación 1 y una unidad de control según el término general de la reivindicación 10.

Introducción:

- 10 El documento WO 2018/035282 A1, correspondiente al término genérico de las reivindicaciones 1 y 10, es un ejemplo del estado de la técnica y divulga métodos, sistemas y bibliotecas para su uso en la impresión por chorro de tinta de bioestructuras que tienen patrones predeterminados bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D) de células, matriz extracelular, componentes orgánicos e inorgánicos y combinaciones de los mismos. En particular, la divulgación se refiere a métodos, sistemas y bibliotecas para su uso en la impresión directa por chorro de tinta de bioestructuras mediante gota a demanda, que comprenden una estructura tridimensional predeterminada con células viables en patrones 2D y 3D aleatorios en estado no líquido, por lo que las células pueden ser de distintos tipos.

- 20 Debido a sus características específicas y a las ventajas y desventajas asociadas, los sistemas de impresión 3D convencionales no tienen las propiedades necesarias para poder producir tejidos y órganos viables de mayor tamaño.

- 25 Con el fin de producir un tejido u órgano viable más grande utilizando la impresión 3D, en particular debe garantizarse la nutrición de las células impresas. Como las células sólo pueden nutrirse por difusión a una distancia de unos 500 µm, es necesario un sistema de vasos sanguíneos también impreso. Entre las arterias y las venas se encuentra el sistema capilar, cuyos capilares individuales tienen un diámetro muy pequeño, de sólo unos 10 µm, y también están formados por capas unicelulares.

- 30 Las técnicas de impresión 3D conocidas hasta la fecha son procesos en los que los diferentes tipos de células pueden imprimirse simultáneamente en un solo paso al mismo tiempo, pero que no alcanzan la alta resolución de impresión necesaria (por ejemplo, el modelado por deposición fundida o las tecnologías de gotas), o procesos que alcanzan la alta resolución de impresión necesaria, pero en los que es imposible la impresión selectiva de diferentes tipos de células en un solo paso de trabajo (por ejemplo, las tecnologías de impresión estereolitográfica).

- 35 Además, existen sistemas de impresión 3D específicos, como la transferencia directa inducida por láser, en la que un rayo láser, se pueden extraer células individuales de una matriz y transferirlas a una matriz colectora. Se puede conseguir una alta resolución de impresión e imprimir diferentes tipos de células en un solo paso. Sin embargo, la velocidad de impresión alcanzable es tan baja que esta técnica sólo es útil para estructuras extremadamente pequeñas.

- 40 Otro sistema de impresión específico es el perfeccionamiento de la impresión estereolitográfica 3D, en la que también se pueden imprimir diferentes tipos de células. En particular, sin embargo, el tejido a imprimir debe ser entre tanques de reacción con diferentes tipos de células. Este paso también sólo permite un número muy pequeño de capas celulares y es un proceso relativamente lento que sólo puede utilizarse para imprimir estructuras más pequeñas, como mini-órganos.

- 45 Otros procesos específicos de impresión 3D dejan el espacio para los vasos sanguíneos posteriores abierto como una cavidad en el tejido impreso y nutren inicialmente las células circundantes con medio nutritivo. Para crear capilares reales, estos tejidos deben transferirse a un organismo que suministre a las cavidades células endoteliales y células musculares que las rodeen. Este paso también puede realizarse posteriormente en una incubadora. Aunque finalmente puedan crearse capilares en el tejido de esta forma, el proceso dura al menos días y sigue sin alcanzarse la complejidad natural del tejido en cuestión. Además, con estas técnicas sólo pueden conseguirse diámetros de vasos relativamente grandes.

- 50 Otra forma de crear tejidos relativamente sencillos a partir de células de crecimiento lento, como cartílago o hueso, consiste en imprimir en 3D andamios que posteriormente se colonizan con células. En estos tipos de tejido de crecimiento lento, hay tiempo suficiente para la posterior formación de capilares dentro de un organismo debido a la baja tasa metabólica. Sin embargo, este procedimiento se limita a tipos de tejidos como el hueso y el cartílago. En el caso de tipos de células no complicados de crecimiento más rápido, como las células hepáticas, se ha demostrado que se pueden trasplantar con éxito zonas muy pequeñas de tejido a órganos hepáticos. Sin embargo, estas zonas de tejido sólo pueden consistir en estructuras muy pequeñas, ya que de lo contrario las células no pueden seguir nutriéndose.

- 65 Todos los intentos anteriores de producir tejidos u órganos funcionales con una impresora 3D dieron como

resultado unidades de tejido muy pequeñas o de crecimiento muy lento, o estructuras más grandes que sólo eran viables durante muy poco tiempo debido a la falta de capilares diferenciados.

Por lo tanto, se requiere un proceso de impresión 3D que

- puede imprimir selectivamente diferentes tipos de células en un solo paso de trabajo y
- que, por otra parte, puede alcanzar la alta resolución de impresión de los procesos estereolitográficos.
- además, el proceso debe tener una velocidad de impresión que permita imprimir órganos enteros.
- además, el novedoso sistema de impresión debe, en particular, suministrar al tejido recién formado con el medio u otros fluidos adecuados para nutrir las células a través de los capilares creados durante el proceso de impresión, enjuague.
- en particular, el proceso de impresión también debe proporcionar un nuevo tipo de patrón de presión que permita formar un sistema capilar entre estructuras arteriales y venosas en el que el fluido que fluye en él (por ejemplo, medio o sangre) pueda pasar de arterial a venoso.
- en realizaciones esenciales, la implementación del novedoso proceso de impresión requiere una nueva mesa de impresión, ya que las mesas de impresión convencionales de última generación no son capaces de suministrar al tejido impreso el medio nutritivo durante la impresión.
- la implementación del novedoso proceso de impresión requiere preferiblemente una unidad de suministro del cabezal de impresión que mezcle la densidad celular deseada y la concentración de tinta requerida en la gota de impresión de acuerdo con las especificaciones del algoritmo de impresión.

El problema según la invención se resuelve mediante un novedoso proceso de reticulación UV de gotas según la reivindicación 1 que, debido a sus tintas de baja viscosidad, puede utilizar los cabezales de impresión de alta resolución de las impresoras artísticas fotorrealistas y que, además, aumenta la resolución de impresión hasta un nivel molecular mediante reacciones altamente específicas y espacialmente limitadas en la región de los bordes de las gotas individuales.

Los procesos de gota anteriores para la impresión de células son dispositivos en los que gotas relativamente grandes de tintas de hidrogel y las células que contienen son depositadas por el cabezal de impresión de forma similar a una extrusora (térmica o piezoeléctrica, véanse Figura 1 y Figuras 2-7). Por regla general, sólo hay una boquilla de impresión para una tinta de tipo celular. Esta boquilla tiene un diámetro relativamente grande, ya que la viscosidad del hidrogel, que aún se encuentra en estado sol, es sin embargo relativamente alta (Figura 1 y Figuras 2-7). Las gotas resultantes son relativamente grandes y contienen en la línea de control, elevado número de células (aprox. 2000 células por gota).

Sorprendentemente, se ha demostrado que utilizando tintas celulares fotosensibles de nueva formulación en lugar de los hidrogeles utilizados anteriormente, la viscosidad de las gotas de tinta celular podría reducirse tanto que pueden ser procesadas por cabezales de impresión del sector de la impresión artística de alta resolución. Antes esto no era posible. Como resultado, se pueden imprimir gotas de tinta celular de unos pocos picolitros (con aproximadamente 20 células por gota) (Figuras 8-10). Con esta resolución de impresión, ya es posible imprimir capilares cuyo diámetro es significativamente menor que el de los capilares de los sistemas anteriores. Además, resultó que la resolución de impresión podía aumentarse aún más diseñando las tintas de tal manera que sólo se produjera una reacción de reticulación en la región del borde de las gotas de tinta capilar. En cambio, el volumen de gota restante no sufre esta reacción de reticulación y se enjuaga o se elimina por otros medios para funcionar posteriormente como cavidad capilar. Este novedoso proceso de impresión ha permitido aumentar hasta un orden de magnitud la resolución de impresión a nivel molecular o de células individuales o capas celulares, alcanzando así la finura de los sistemas de estereolitografía. Los capilares que pueden imprimirse con este proceso son tan finos como los capilares del organismo humano.

La reticulación, que se limita a la zona del borde de las gotas de tinta capilar, puede conseguirse tanto mediante componentes de la tinta como mediante un rayo láser dirigido (u otra fuente electromagnética dirigida). Las reacciones que tienen lugar pueden ser de naturaleza física, química o biológica (véase la sección Ejemplos).

Durante todo el proceso de impresión, el tejido resultante se enjuaga preferentemente con medio nutritivo a través de las estructuras capilares. Para ello, durante la impresión se genera un patrón de presión específico que organiza la formación de capilares entre las futuras estructuras arteriales y venosas.

Si se va a imprimir un órgano completo para implantarlo posteriormente en un organismo o paciente, el órgano puede conectarse a la circulación sanguínea del paciente durante un periodo de tiempo limitado antes de implantarlo en un dispositivo especialmente fabricado fuera del cuerpo. Este dispositivo puede utilizarse para comprobar los valores fisiológicos del órgano y determinar el momento óptimo para su implantación.

Estado de la técnica:

En Alemania, hasta 15 000 pacientes esperan un órgano de un donante. Sólo se puede encontrar un órgano adecuado para menos de 1/3 de ellos. En Alemania se realizan cada año unos 3 millones de experimentos con animales para fines de investigación y farmacéuticos, que podrían hacerse superfluos mediante el uso de alternativas. Otro ámbito para la impresión 3D de tejidos es la medicina regenerativa, que sigue haciendo grandes progresos.

La bioimpresión 3D puede ofrecer una solución para estos y otros campos de aplicación. Se utiliza para producir estructuras celulares con impresoras 3D, mediante las cuales las capas celulares se apilan unas sobre otras en un proceso de fabricación aditiva para formar estructuras tridimensionales complejas. Las siguientes técnicas son especialmente adecuadas para la bioimpresión como el modelado por deposición fundida, el proceso de gotas y la estereolitografía:

El modelado por deposición fundida es un proceso de impresión por extrusión que procesa termoplásticos y materiales compuestos, así como cerámica y metales. También puede utilizarse para imprimir células en geles de alginato o gelatina. Una desventaja particular de este proceso es la baja resolución de impresión. El proceso de gota procesa soluciones poliméricas, suspensiones coloidales y suspensiones celulares. Aunque la resolución del proceso de gotas es superior a la del modelado por deposición fundida, no es suficiente para imprimir estructuras vasculares. La estereolitografía, por su parte, utiliza un fino rayo láser para lograr la mayor resolución disponible hasta la fecha. Procesa una solución viscosa de polímero fotocurable que se expone a un haz electromagnético dirigido para reticular la solución espacialmente. Su desventaja es que sólo puede imprimirse un único tipo de célula en una única reacción. Si se va a añadir otro tipo de célula, es preferible cambiar el baño de reacción.

El estado de la técnica describe la bioimpresión por inyección de tinta del líder del mercado Organovo, que produce gotas de tinta con 10 000 a 30 000 células individuales cada una (fuente: Organovo). Organovo utiliza la bioimpresión en particular para la producción de tejido hepático. Por regla general, se insertan en el órgano dañado las piezas de tejido impresas en 3D que apoyan al hígado existente en su modo de acción y prolongan así la vida de este órgano hasta que se encuentre un donante adecuado.

En la bioimpresión por extrusión, las biotintas se inyectan desde una pequeña aguja utilizando presión mecánica. De este modo, todo el andamiaje celular se imprime capa por capa. Este proceso es utilizado, por ejemplo, por los bioimpresores de Envisiontec GmbH. La velocidad de trabajo es relativamente alta, pero lamentablemente la resolución de impresión es muy baja.

La estereolitografía es utilizada, por ejemplo, por las empresas Cellbricks y TissUse ("órgano en un chip"). Proporciona la mayor resolución de impresión, ya que un hidrogel se reticula con la ayuda de un rayo láser. Sin embargo, con este método sólo se puede imprimir un tipo de célula a la vez. Para ensamblar el tejido a partir de varios tipos de células, es preferible que el tejido resultante pase por diferentes bandejas de reacción, lo que significa que el proceso se ralentiza y el tejido impreso sólo alcanza pequeñas dimensiones.

Además de estos métodos más comúnmente utilizados, hay una serie de métodos que han surgido a partir de modificaciones:

Algunas técnicas pretenden que los capilares muy finos (de hasta 10 µm de diámetro) se formen entre las venas y arterias impresas de mayor tamaño durante el propio cultivo celular (Yu y otros, 2014). La problemática es que el tejido impreso debe madurar durante más tiempo. Cuanto más tiempo se mantenga el tejido en cultivo celular, mayor será la probabilidad de que se produzcan artefactos.

Otro enfoque es la impresión de estructuras tubulares con un polímero que posteriormente se despolimeriza y se vuelve a enjuagar, liberando así una cavidad para la formación de un sistema vascular (Kolesky y otros, 2014; Lee y otros, 2014a,b). Sin embargo, este enfoque es inadecuado y difiere del método novedoso aquí divulgado en dos aspectos: 1) se trata de un tubo sin células endoteliales y ramificaciones más finas, se requiere una incubación más larga (con los artefactos esperados) y 2) la resolución de impresión es demasiado baja para poder generar un sistema capilar real.

Otro enfoque es la impresión en tándem: primero, la red vascular se imprime utilizando un sistema de estereolitografía (que tiene una alta resolución pero sólo puede imprimir un único tipo de célula). Posteriormente la estructura vascular impresa se transfiere a otro sistema de impresión 3D (que no tiene buena resolución pero puede imprimir diferentes tipos de células), en el que se imprimen las células tisulares restantes (Yu y otros, 2014). En particular, la estructura vascular impresa debe retirarse del recipiente de reacción de un sistema de impresión 3D y transferirse al recipiente de reacción del otro sistema de impresión 3D. Las diferencias particulares con el método divulgado aquí son: 1) No se pueden imprimir capas unicelulares, las estructuras tendrían que retirarse al cambiar y 2) se necesitan dos impresoras diferentes, lo que aumenta el riesgo de contaminación al cambiar de impresora.

Para poder poner en práctica el método aquí divulgado, en las realizaciones preferidas se requiere en particular una mesa de impresión que pueda suministrar medio nutritivo al tejido impreso, de modo que las células no reciban un suministro insuficiente o mueran. Además, la mesa de impresión debe estar situada

preferiblemente en un espacio de impresión lleno de líquido.

Las mesas de impresión y los espacios de impresión de los procesos de impresión 3D convencionales no pueden utilizarse para este fin. Por ejemplo, la mayoría de los sistemas de impresión 3D (por ejemplo, FDN, SLS, BJ y otros) tienen una mesa de impresora seca en una cámara de impresión seca y no tienen posibilidad de absorción de líquidos.

Aunque algunos tipos de impresoras 3D tienen una cámara de impresión llena de líquido (por ejemplo, SLA), no existe un sistema de suministro para el tejido impreso con una entrada y salida de líquido adicional, como por ejemplo es necesaria para la impresión 3D de tejidos y órganos con estructuras vasculares.

El novedoso sistema de impresión aquí descrito se basa en un proceso de gotas y difiere de los anteriores sistemas de gotas en varios aspectos, que se enumeran a continuación:

1) Se utilizan novedosas biotintas fotosensibles de tan baja viscosidad que no obstruyen los finos cabezales de impresión de las impresoras de arte fotorrealista. Las anteriores gotas de tinta contienen aproximadamente 2000 - 3000 células y están compuestas de hidrogeles (Organovo). Los componentes del hidrogel son la razón de las gotas relativamente grandes, ya que su viscosidad es relativamente alta incluso en estado sólido. Las gotas producidas en el proceso aquí descrito son muy pequeñas, de baja viscosidad y que contienen aprox. 20 células o menos. La masa celular impresa se consigue gracias a que los cabezales de impresión de última generación tienen aproximadamente 160 boquillas o más en lugar de una sola boquilla por tipo de tinta (como se utilizaba anteriormente).

Al mismo tiempo, las tintas tienen una formulación que permite la reticulación inmediata y evita así que las gotas se corran. Los hidrogeles existentes anteriormente en el proceso de gotas que eran fotosensibles, utilizan procesos de curado que se activan mediante una fuente de luz situada fuera del cabezal de impresión y que duran varios minutos. En el novedoso proceso que aquí se describe, la fuente de ondas electromagnéticas (por ejemplo, luz visible, infrarroja o ultravioleta) se encuentra directamente en el cabezal de impresión y puede ser tanto fija como direccional.

2) Las biotintas especiales (tintas capilares) dentro del novedoso sistema de impresión aquí divulgado sólo reticulan selectivamente limitada en las zonas de los bordes de las gotas o en las zonas vecinas a las gotas de otras tintas. Esta reticulación selectiva puede ser provocada por componentes de la tinta o por radiación electromagnética dirigida. La reticulación puede ser de naturaleza biológica, química o física. Los componentes de las gotas de las biotintas especiales que no se encuentran en la zona del borde se enjuagan o se eliminan de otro modo, creando la cavidad necesaria para los capilares resultantes.

Las células capilares no reticuladas (por ejemplo, células endoteliales) que son arrastradas al tejido circundante se convierten en el punto de partida de nuevas estructuras capilares o se pierden durante la diferenciación tisular.

Este proceso permite obtener una resolución de impresión en la que sólo se reticulan específicamente moléculas individuales o células individuales. Hasta ahora, sólo los procesos estereolitográficos de alta resolución permitían reticular células individuales. El tamaño de las gotas oscila preferentemente entre un femtolitro y 10 microlitros. La imagen impresa producida de este modo tiene una nueva calidad, hasta ahora inigualable, en la que

- por una parte, se pueden imprimir simultáneamente diferentes tipos de tintas (por ejemplo, células musculares, células nerviosas, tintas estructurales, tintas capilares) de forma fotorrealista y
- por otro lado, la reticulación selectivamente limitada de los bordes de las tintas capilares hace que la resolución de impresión sea tan alta que se formen capas celulares individuales (por ejemplo, células endoteliales).

3) La formación de un sistema de vasos sanguíneos elásticos durante la impresión, permite suministrar al tejido u órgano resultante suficientes nutrientes durante el proceso de impresión. Las conexiones necesarias a los sistemas de bombeo las proporcionan inicialmente la mesa de impresión y la placa de impresión situada sobre ella (Figuras 2 - 7). Para crear conexiones aún más finas para vasos y capilares personalizadas para cada estructura tisular, se imprimen conexiones individuales a partir de estas conexiones. En realizaciones preferidas, pueden utilizarse tintas para capilares y tejidos o, inicialmente, una tinta para estructuras.

Si se utiliza una tinta estructural, la transición entre la tinta estructural y la tinta celular puede tener lugar a través de un gradiente, lo que estabiliza el sistema. Hasta la fecha, no existe ninguna tecnología de gotas en la que exista un sistema de suministro de este tipo para células impresas.

Tras la impresión, la película de impresión extraíble (en la que se encuentra la impresión acabada y que tiene conexiones de entrada y salida para líquidos) puede seguir cultivándose en una incubadora (Figura 19).

4) Se divulga un novedoso -pero no reivindicado- patrón de presión complejo que permite la formación de capilares entre estructuras arteriales y venosas en los que el fluido que fluye en ellos (por ejemplo, medio o

sangre) pasa de la región arterial a la región venosa. Tales patrones de presión no se conocen todavía y no podrían realizarse debido al estado actual de la técnica.

El patrón de impresión es único porque se pueden imprimir diferentes tipos de células en un único proceso de impresión y, al mismo tiempo, se pueden producir estructuras ordenadas de unas pocas moléculas.

Este patrón de impresión se caracteriza preferentemente por las siguientes propiedades:

- Algoritmo específico para calcular la imagen de impresión en relación con el tipo de célula utilizada (tipo de tinta) y en relación con la distancia y el tamaño de los capilares y las estructuras arteriales y venosas. Para ello el algoritmo se basa, por un lado, en los requisitos para un suministro capilar óptimo al módulo que se va a imprimir y, por otro, en los requisitos fisiológicos y anatómicos de la estructura tisular respectiva.
- El tejido u órgano compuesto por diferentes tipos de tejido y vasos se divide en módulos individuales, que a su vez se subdividen en capas de impresión (rebanadas). Los distintos tipos de células impresas en una capa de impresión del módulo corresponden a su posición vascular o tisular dentro del tejido u órgano respectivo.
- Preferiblemente, se crea un sistema capilar que cubre el área con un diámetro capilar interno de 5 micrómetros y mayor. Preferiblemente, los capilares tienen una distancia de aproximadamente 50 micrómetros entre sí en cada nivel de presión individual. El fluido que circula por ellos pasa de arterial a venoso tras la aplicación de la presión.
- La suma de los niveles de presión individuales da como resultado un módulo único. El módulo tiene preferentemente un vaso ascendente y un vaso descendente (Figuras 15 y 16), ambos conectados entre sí por capilares más pequeños en forma de abanico entre ellos. Los vasos ascendentes y descendentes se convierten en las conexiones para el suministro arterial y el drenaje venoso. La microcirculación resultante representa la unidad de suministro más pequeña del tejido impreso.
- Los módulos básicos se ensamblan y pegan para formar tejidos u órganos más grandes. Los vasos ascendentes y descendentes de los microcircuitos se combinan para formar los vasos principales de suministro y drenaje.

5) Provisión de un nuevo tipo de mesa de impresión que se desplaza en la dirección Z de una cámara de impresión llena de medios y que dispone de conexiones de suministro a través de las cuales se suministra medio al tejido impreso de forma controlable.

6) Provisión de una unidad de suministro de cabezales de impresión en la que la densidad celular y la concentración de tinta se mezclan de forma ajustable. La tinta mezclada para los cabezales de impresión se compone según las especificaciones del algoritmo de impresión. En principio, en el proceso existen tintas para tejidos, tintas capilares y tintas estructurales, aunque también pueden utilizarse otros tipos de tinta.

Objeto de la invención:

Se requiere un proceso de impresión 3D que

- puede imprimir selectivamente diferentes tipos de células en un solo paso de trabajo y
- que alcanza la alta resolución de impresión de los procesos estereolitográficos.
- además, el proceso debe tener una velocidad de impresión que permita imprimir órganos enteros.
- además, es preferible que el novedoso sistema de impresión enjuague el tejido recién formado con medio u otros fluidos adecuados para nutrir las células a través de los capilares creados durante el proceso de impresión (Figura 16).
- preferiblemente, el proceso de impresión también debe proporcionar un patrón de impresión novedoso que permita formar un sistema capilar entre las estructuras arteriales y venosas en el que el fluido que fluye en él (por ejemplo, medio o sangre) pueda pasar de arterial a venoso.
- en particular, el sistema de impresión debe disponer de un dispositivo que garantice una concentración celular suficientemente alta por unidad de volumen en la gota de tinta sin que las células se aglutinen en el cabezal de impresión.

La invención comprende un método de impresión 3D según la reivindicación 1 y una unidad de control según la reivindicación 10.

El proceso de impresión 3D según la invención se implementa con una impresora de gotas de alta resolución y un dispositivo para aplicar ondas electromagnéticas, preferiblemente un láser, una lámpara UV o un diodo. Las tintas utilizadas son tintas de baja viscosidad que pueden ser procesadas por los cabezales de impresión de alta resolución de las impresoras de arte fotorealista y que reticulan directamente bajo la influencia de las ondas electromagnéticas, preferiblemente en un segundo. Las gotas de tinta pueden tener volúmenes de 1 femtolitro hasta 10 microlitros.

El proceso de impresión 3D según la invención también incluye al menos una tinta capilar que reticula selectivamente en las regiones periféricas de las gotas o en las regiones vecinas a las gotas de otras tintas. Esta reticulación selectiva es causada por los componentes de la tinta (de la tinta capilar y/o de las tintas vecinas) o por la propia tinta capilar.

Las células individuales de la zona periférica de las gotas de tinta capilar se reticulan mediante el uso de biotintas u ondas electromagnéticas dirigidas. Las zonas no reticuladas de las tintas capilares se enjuagan o se eliminan de otro modo y forman la cavidad para el sistema capilar y de vasos sanguíneos.

Debido a que la reticulación, se limita selectivamente a la zona del borde de las gotas de tinta capilar, puede activar no sólo células individuales, sino incluso moléculas individuales para una reacción de reticulación u otra formación de capas. La resolución de impresión alcanzada por este proceso es incluso superior a la de los procesos estereolitográficos, que ronda los 20 nm.

Reacciones ejemplares en la zona del borde de las gotas de tinta capilar pueden ser:

- Reacciones tiol-eno
- Reacciones de bloqueo
- Aperturas de anillos nucleófilos
- Autoensamblaje de moléculas y partículas
- Factores selectivos en las células de las tintas capilares y/o biotintas
- Reacciones de polimerización radical o catiónica
- Reacciones de anticuerpos
- Reacciones con componentes de química de clic (por ejemplo, cicloadición, otras)
- otros procesos en los que es posible que dos regiones de borde vecinas lleven a cabo una reacción o interacción espacialmente limitada entre sí o en los que se produce un proceso de "autoensamblaje".

Dado que los componentes de tinta en la gota de tinta requeridos para la impresión del tejido respectivo pueden variar en términos de densidad celular y concentración de tinta y son determinados por el algoritmo de impresión, debe proporcionarse una unidad de suministro del cabezal de impresión aguas arriba del cabezal de impresión según la reivindicación 12 (Figura 8). En esta unidad, las células cultivadas se bombean desde el depósito de células a un concentrador de células a través de una bomba. Aquí, se concentra la densidad celular y se elimina el exceso de medio. Una concentración de células definida se transmite a una unidad de mezcla a través de un contador de células. En esta unidad de mezcla también se introduce un volumen específico procedente de un depósito para el concentrado de tinta. La unidad mezcladora mezcla las tintas según las especificaciones del algoritmo de impresión para el tipo de tejido requerido y las envía a los cabezales de impresión. El número de unidades de suministro de los cabezales de impresión depende del número de tintas necesarias y puede variar. No obstante, las tintas también pueden mezclarse sin las especificaciones del algoritmo de impresión.

Para mantener vivo el tejido impreso, puede ser necesario, por ejemplo, conectarlo a un circuito de alimentación durante el proceso de impresión. Además, el tejido impreso debe estar preferiblemente en una cámara de impresión llena de medio durante la impresión para que no se seque. Las mesas de impresión convencionales no disponen de tal sistema de suministro. Una tarea o aspecto de la invención era por lo tanto, proporcionar una mesa de impresión que suministre al tejido medio nutritivo a través de la entrada y salida de medio durante la impresión (Figuras 2-7).

El líquido para la entrada y salida del medio se alimenta a la impresora desde el exterior, por ejemplo, mediante un sistema de bombas ajustable. El sentido de funcionamiento de las bombas puede invertirse. En particular, el suministro tiene lugar a través de un sistema de mangueras, que se conecta a la base de la mesa de la impresora mediante conectores (por ejemplo, Luer). A través de los pasadores de la base de la mesa de impresión, el medio se canaliza a través de la mesa de impresión hacia la placa de impresión. Hay una membrana de silicona reemplazable entre la base de la mesa de impresión y la placa de presión, que separa la cámara de presión llena de medio de la placa base y la sella contra el medio (Figuras 2-7). La membrana de silicona es necesaria para el sellado, ya que la placa base de la cámara de presión es penetrada por el pasador del tornillo del micrómetro y permite que la mesa de impresión se mueva hacia arriba y hacia abajo.

La experiencia ha demostrado que los sistemas de sellado convencionales, como las juntas mecánicas, son fuentes potenciales de contaminación. La solución innovadora al problema mediante una membrana de silicona

extraíble tiene la ventaja de que es fácil de limpiar y esterilizar. Además, su sustitución es poco costosa. Gracias a su gran elasticidad, se puede elegir libremente el ajuste de la mesa de impresión. La membrana de silicona también actúa como junta entre la placa base y la pared de la cámara de impresión.

Para poder cambiar fácilmente la mesa de impresión (dentro del área de impresión), el pie de la mesa de impresión (fuera del área de impresión) tiene un imán que atrae la mesa de impresión. La fuerza magnética también presiona y sella las clavijas de conexión del pie de la mesa de impresión en el sello del taladro contrario de la placa de impresión. Esta solución favorecida según la invención conduce a un manejo extremadamente fácil al cambiar la mesa de impresión.

El tejido que se va a imprimir debe estar atravesado por muchos vasos para poder abastecerlo suficientemente (Figura 15). Para poder proporcionar el patrón de impresión requerido, se requiere un algoritmo específico con respecto al tipo de célula utilizada (tipo de tinta) y con respecto a la distancia y el tamaño de los capilares y las estructuras arteriales y venosas. En particular, el algoritmo se basa en los requisitos para un suministro capilar óptimo del módulo que se va a imprimir y, por otra parte, según los requisitos fisiológicos y anatómicos de la estructura tisular respectiva. El tejido/órgano compuesto por diferentes tipos de tejido y vasos se divide en particular en módulos individuales, que a su vez se subdividen en planos de impresión (rebanadas). Los diferentes tipos de células impresas en un plano de impresión del módulo corresponden a los diferentes tipos de tejido, su posición vascular o tisular dentro del tejido u órgano respectivo. En particular, se crea un sistema capilar en toda la zona con un diámetro capilar interno de aprox. 10 micrómetros y mayor. Los capilares tienen preferiblemente una distancia de aprox. 50 micrómetros entre sí en cada nivel de presión individual. El líquido que fluye por ellos pasa de arterial a venoso tras la aplicación de la presión (Figura 15).

La suma de los niveles de presión individuales da como resultado un módulo único. El módulo tiene preferiblemente un vasos ascendentes y uno descendente, ambos conectados entre sí por capilares más pequeños en forma de abanico. Los vasos ascendentes y descendentes se convierten en las conexiones para el suministro arterial y el drenaje venoso. La microcirculación resultante representa la unidad de suministro más pequeña del tejido impreso. Los módulos individuales se ensamblan y unen entre sí para formar estructuras diana más grandes.

Las aberturas de conexión preferidas requeridas para el sistema de recipientes en el que se imprimen los recipientes, se encuentran en una placa de presión que está fijada a la mesa de impresión (Figuras 2 - 7). La función de esta placa de presión es distribuir el medio desde las dos conexiones principales de la mesa de presión a las conexiones secundarias requeridas individualmente. Como cada tejido tiene una estructura anatómica diferente, la placa debe crearse individualmente para cada proceso de impresión. Cada placa de impresión se fabrica previamente mediante impresión 3D (por ejemplo, FDM, SLS, BJ, otros). Los archivos para la impresión también proceden del algoritmo del sistema para organizar la impresora. La placa de impresión corresponde a un medio de trabajo creado individualmente para la impresión y está hecho preferentemente de un polímero.

Por encima de la plancha de impresión se aplica una película de impresión, preferiblemente de polímero biodegradable o reabsorbible, que tiene las mismas conexiones que la plancha de impresión. La película de impresión se utiliza para una retirada fácil y no destructiva del tejido de la plancha de impresión. Debido a la biodegradabilidad del polímero, la película de presión se descompone en el cuerpo en poco tiempo (Figura 2-7).

Para permitir que el tejido impreso madure fácilmente en una incubadora comercial, la mesa de impresión con la placa de impresión (opcionalmente sólo la placa de impresión) se transfiere a un recipiente incubador (Figura 19), que se almacena en la incubadora. Este recipiente de incubación consiste, en particular, en una bandeja llena de medio con una tapa que se coloca encima. En la parte inferior de la bandeja está instalada permanentemente una base, sobre la que se monta indistintamente una base de mesa de impresión idéntica. Las mangueras de medio que van hacia y desde la base de la mesa de impresión se introducen a través de aberturas en el recipiente de la incubadora. La mesa de impresión, incluyendo la plancha de impresión, la película de impresión y el tejido impreso, se coloca sobre los pernos de la base de la mesa de impresión (sin membrana de silicona) utilizando fuerza magnética (Figura 19).

Otras realizaciones:

En una realización preferida de la invención, el tamaño de gota está comprendido entre un femtolitro y 10 microlitros. Ventajosamente, este tamaño de gota permite resolver sorprendentemente bien el problema inventivo en una reacción tiol-eno. Las moléculas modificadas con tiol dentro de la gotita no se reticulan en estas condiciones y se enjuagan.

En una realización preferida adicional, las tintas capilares tienen moléculas modificadas con tiol y las biotintas circundantes tienen moléculas modificadas con alilo y un fotoiniciador para desencadenar la reacción de reticulación. Esta reacción de reticulación tiene lugar dentro de las biotintas entre las moléculas modificadas con alilo. Las moléculas modificadas con tiol de las tintas capilares sólo se reticulan selectivamente en la zona

del borde con las moléculas modificadas con alilo de las biotintas.

En otra realización preferida, una 1,3-dipolar cicloadición catalizada por cobre(I) de azidas y alquinos para la reacción de reticulación en la zona del borde de las tintas capilares, por lo que las moléculas modificadas con azidas y las modificadas con alquinos sólo se encuentran en la zona del borde de las gotas de tinta capilar para formar bioenlaces.

En otra realización preferida, la tinta capilar contiene moléculas modificadas con grupos epóxidos que pueden provocar la apertura nucleofílica de anillos con grupos OH o grupos NH₂ de moléculas de las biotintas o que pueden provocar la apertura de anillos catalizada por ácidos o bases por componentes de las biotintas.

En otra realización preferida, las tintas capilares y las biotintas contienen moléculas que forman estructuras de autoensamblaje en la región límite, por ejemplo mediante iones, aptámeros u otras estructuras que tienden a autoensamblarse.

En una realización preferida adicional de la invención, se prevé que las células contengan un factor de selectividad, a través del cual se reticulen selectivamente mediante el movimiento direccional de ondas electromagnéticas dentro de una gota. Además, también pueden ser componentes de la tinta factores de crecimiento, moléculas de señalización, partículas para el desarrollo de una conducción de estímulos u otras moléculas.

Se puede utilizar una fuente de energía de acción selectiva para desencadenar una reacción de reticulación o polimerización a partir de una gota que contiene una mezcla de células diferentes, en la que sólo se golpea el tipo de célula previsto. Preferiblemente, se pueden eliminar las células no reticuladas. Por ejemplo, una pequeña gota de sólo 5 picolitros (aprox. 20 - 200 células) puede consistir en una mezcla de células endoteliales vasculares y mioblastos. En una realización preferida, el anillo de un capilar fino se forma a partir de esta mezcla utilizando un rayo láser de precisión nanométrica. La entrada de energía específica de un láser reticula preferentemente sólo las células endoteliales de la mezcla que están situadas a lo largo del interior del anillo. Con otra entrada de energía específica de un láser, sólo los mioblastos vecinos se reticulan en el lado exterior del anillo en esta realización preferida (Figuras 13 y 14).

En otra realización preferida, las células no reticuladas del interior de la estructura vascular se eliminan mediante láser.

Preferentemente, las biotintas consistentes en un tipo de célula particularmente homogéneo también se reticulan, por ejemplo, para imprimir áreas de tejido homogéneas más grandes.

En una realización preferida, las células a reticular están encerradas en una red que se forma.

En otra realización, las propias células están reticuladas entre sí o con una red. Para ello, disponen de una molécula de reticulación anclada en la membrana celular.

Debido al proceso de impresión comparativamente rápido, es sorprendentemente posible transferir los tejidos impresos relativamente rápido a una incubadora en la que se desencadena una mayor maduración por factores ambientales (por ejemplo, estrés químico, biológico molecular o de flujo).

Preferiblemente, se imprimen más tintas reticulables en determinadas posiciones que desempeñan funciones de apoyo para el tejido, que desempeñan factores importantes para la fisiología de la célula o que desempeñan factores de crecimiento o marcadores, moléculas de señalización, receptores u otros sitios de unión (principio de la cerradura y la llave).

De forma similar a la impresora de chorro de tinta para impresiones artísticas fotorrealistas, el cabezal de la impresora tiene preferiblemente un mayor número de boquillas que se adaptan a la reología respectiva de la tinta. La impresora también tiene preferiblemente una o más fuentes de ondas electromagnéticas no direccionales o direccionales, que desencadenan las reacciones de reticulación.

En una realización preferida, se utiliza un cabezal de impresión para impresiones artísticas fotorrealistas, que ha sido modificado adicionalmente con una o más fuentes de ondas electromagnéticas.

En otra realización, se utiliza un cabezal de impresión compuesto por módulos, cada uno de los cuales corresponde a un cabezal de impresión para impresiones artísticas fotorrealistas con una o más fuentes de ondas electromagnéticas.

En otro aspecto de la invención, la invención se refiere a una estructura novedosa de un cabezal de impresión (véanse Figura 9 a Figura 12) y a un proceso de impresión novedoso en el que se utilizan selectivamente diferentes fuentes de energía para desencadenar diferentes reacciones (Figuras 9-12).

La Figura 13 y la Figura 14 muestran un diagrama esquemático de cómo se pueden reticular ciertas células utilizando varios fotoiniciadores con la ayuda de luz de una longitud de onda específica. Pueden utilizarse láseres como fuente de energía, diodos u otras fuentes de energía (véase el apartado Ejemplos).

5 En una realización preferida, el tejido impreso se nutre durante el proceso de impresión. Las conexiones para el medio nutriente en la placa base se extienden individualmente al tejido que se va a imprimir utilizando tintas estructurales. Partiendo de las conexiones de la placa base, se imprimen conexiones más finas con diámetros más pequeños utilizando una tinta texturizada.

10 En otra realización, el cabezal de impresión está equipado con una tecnología de burbuja, una tecnología piezoeléctrica u otras tecnologías de cabezal de impresión.

En una realización, la fuente de ondas electromagnéticas es una fuente no direccional, como un diodo, láser, lámpara UV u otra fuente.

15 En otra realización, la fuente de ondas electromagnéticas es una lente que puede girar 180°.

La fuente de energía es controlable y móvil, de modo que el rayo láser puede reproducir cualquier forma preprogramada. En otra realización, la luz se genera en una fuente luminosa externa y se transporta al punto de salida mediante cables de fibra óptica.

20 En una realización, la longitud de onda de las ondas electromagnéticas está en el rango UV, el rango visible o el espectro IR.

25 En una realización preferida, se proporciona un dispositivo de succión o un dispositivo de aire comprimido para eliminar el material de tinta no reticulado que se ha lavado.

En una realización, el vacío es controlable y sólo se activa cuando se baja el dispositivo de succión. La distancia entre el dispositivo de succión y el objeto a imprimir se controla mediante un láser (Figura 11 y Figura 12).

30 En otra realización, no se requiere ningún dispositivo adicional para eliminar la tinta o el material celular expulsado, ya que las células expulsadas forman puntos de partida para nuevos capilares en el tejido circundante o se incorporan o perecen durante la diferenciación del tejido circundante.

35 En otra realización, el material de tinta no reticulado se destruye mediante un rayo láser dirigido.

En otra realización, las células no reticuladas, los restos celulares o las tintas se enjuagan mediante un dispositivo y escapan a la cámara de reacción.

40 En una realización, se genera una atmósfera de gas por encima del nivel de presión a través de boquillas de suministro de gas (por ejemplo, gas inerte, CO₂, etc.).

45 En una realización, la longitud de onda y la anchura del haz de la fuente de ondas electromagnéticas son modulables. La impresora tiene una o más fuentes modulables para los haces electromagnéticos dirigidos.

En otra realización, se utiliza preferentemente un láser de femtosegundo.

50 En una realización, el contenido de gas (por ejemplo, CO₂/O₂), el valor de pH y otros parámetros importantes del cultivo celular se regulan durante la presurización a través del medio de cultivo. Además, el intercambio de gases también se regula a través del contenido de gas en la cámara de reacción.

En una realización, el método se lleva a cabo "de abajo a arriba" o "de arriba a abajo".

55 En una realización, el recipiente de reacción de la impresora se inserta opcionalmente en la impresora como un inserto desechable y puede retirarse tras la impresión. Tras la impresión, el tejido u órgano se encuentra en un estado en el que puede ponerse en contacto con el paciente o transferirse al cultivo celular. El recipiente de reacción dispone de conexiones para la entrada y salida de medio de cultivo o sangre para nutrir el tejido.

60 En una realización, el recipiente de reacción se enfría.

En una forma -no reclamada- de aplicación en el paciente, el recipiente de reacción se coloca fuera del cuerpo conectado a su circulación sanguínea. Los factores de crecimiento y diferenciación específicos del paciente proporcionados y la presión sanguínea dentro del sistema vascular aún en diferenciación conducen a una mayor maduración. Durante esta fase, opcionalmente se toman muestras del sistema para controlar el grado de madurez (grado de diferenciación) del tejido u órgano y determinar el momento óptimo para la implantación.

65

El recipiente de reacción dispone de conexiones adicionales para esta toma de muestras.

En relación con el método según la invención, es ventajoso si ciertos tipos de células se hibridan específicamente con moléculas antes de la impresión 3D para hacer que las células respondan selectivamente en una mezcla. El compuesto consiste en un factor selectivo y una molécula de anclaje. El factor selectivo debe provocar preferentemente la reticulación. La molécula de anclaje se utiliza preferentemente para acoplarse a la membrana celular. El factor selectivo también puede unirse directamente a la superficie de la célula sin molécula de anclaje si cumple sus propiedades químicas y físicas. Un haz de energía espacialmente controlado de ondas electromagnéticas, especialmente dirigido en su longitud de onda y frecuencia, incide sobre un factor selectivo de un tipo celular específico y lo activa, por ejemplo, mediante la separación de un grupo protector, la activación de un fotoiniciador, la activación de un socio de reacción o la activación de un componente de bloqueo. Otros tipos de células no se ven afectados por esta reacción de reticulación. (Figuras 13 y 14, véase la sección Ejemplos).

En una realización, el factor selectivo tiene una molécula lipofílica como molécula de anclaje, por ejemplo perfluorocarbonos o lípidos. En otra realización, el factor selectivo tiene como molécula de anclaje regiones moleculares catiónicas o regiones moleculares con cargas parciales positivas. En otra realización, el factor selectivo tiene como molécula de anclaje compuestos peptídicos, por ejemplo péptidos de penetración celular o polinucleótidos.

En relación con la enseñanza según la invención, se utilizan biotintas novedosas:

A diferencia de las biotintas de mayor viscosidad de los procesos de gota convencionales utilizados hasta la fecha, que contienen macromoléculas de cadena larga, las novedosas biotintas del proceso aquí divulgado tienen una viscosidad muy baja y contienen fotoiniciadores. Contienen moléculas de reticulación más pequeñas, de cadena muy corta, que se reticulan inmediatamente después del contacto con las ondas electromagnéticas. En la realización preferida, estas moléculas tienen modificaciones alquilo o modificaciones tiol.

En otra realización, la cámara presurizada se gasea.

En otra realización, los capilares no se imprimen en un ángulo de 10-90 grados con respecto a la placa de impresión, sino en paralelo (0 -10 grados) a la misma.

En otra realización, los capilares ya están enjuagados antes del cierre del anillo.

Proceso general de impresión: principios teóricos y diseños preferidos:

A continuación se describe un método de impresión 3D de órganos y tejidos. Las áreas de impresión más grandes se dividen en módulos individuales, se imprimen independientemente unos de otros (en la misma capa o en capas diferentes) y, a continuación, se imprimen en la misma capa o en capas diferentes. A continuación, los vasos de los módulos individuales se combinan y pegan (por ejemplo, con cola de fibrina) para formar el órgano o tejido diana). Los vasos de entrada y salida de los módulos individuales se combinan para formar los vasos de entrada o salida principales. El módulo individual es preferiblemente una estructura cúbica con una longitud de arista definida.

Un tejido o un órgano pueden tener la misma estructura, pero no son idénticos. Cada individuo difiere ligeramente entre sí, aunque sean de la misma especie. Esto no sólo se manifiesta en el tamaño, sino también en el desarrollo individual. Los músculos de un atleta, por ejemplo, están mucho más capilarizados que los de un no atleta debido a la mayor necesidad de oxígeno. El cuerpo se adapta a las condiciones ambientales, por lo que nunca es idéntico y experimenta una constante acumulación y descomposición.

Por lo tanto, el factor decisivo es la función del tejido y no la reproducción anatómica exacta del tejido del paciente. Por lo tanto, se divulga aquí un sistema de módulos que permite la función del tejido, pero que también se ha simplificado y sistematizado hasta tal punto que la impresión 3D del tejido puede llevarse a cabo de forma económica.

El bloque de construcción básico del tejido u órgano es el módulo cúbico simple (151) (Figuras 15-18) de longitud lateral definida. Para abastecer el tejido, que puede constar de uno a varios tipos de células y, por lo tanto, también puede formar un tejido funcional como un órgano, se conecta un vaso ascendente (152), que posteriormente forma la arteria. El vaso descendente situado en el lado opuesto (153) forma la vena. Los vasos más pequeños (154) se ramifican a partir de los vasos en forma de abanico, extendiéndose hasta el nivel del vaso opuesto del otro lado y discurriendo paralelos entre sí (Figura 15a). Los vasos más pequeños (154) están conectados entre sí por vasos puente (156), que posteriormente forman los capilares y cierran la "circulación sanguínea" y forman una microcirculación (Figuras 15-18).

El microcircuito (Figura 15) representa la unidad de suministro más pequeña del tejido impreso. Aquí, el medio

se canaliza a través del vaso ascendente (arteria) (152) hacia un vaso pequeño (154), que pertenece a la rama ascendente. Desde el vaso más pequeño, el medio fluye a través de los vasos puente (156) hacia un vaso más pequeño (154) situado debajo, que pertenece a la rama descendente y desemboca en el vaso descendente (153).

Dado que al imprimir los vasos con la tinta capilar se imprimen muchas células por gota y sólo las células en los bordes son capaces de reticularse con el tejido circundante, las células sobrantes deben ser enjuagadas. Para ello y para abastecer a las células impresas, cada microcircuito se lava con medio durante un breve espacio de tiempo tras su finalización. Durante cada proceso de lavado, los microcircuitos situados por debajo del último microcircuito también se lavan y se suministran las células. El flujo de medio expulsa las células no reticuladas. Los recipientes horizontales no son ideales para este proceso, por lo que los recipientes impresos están inclinados entre 10 a 90 grados con respecto a la placa de la impresora.

Los vasos ascendentes y descendentes (Figuras 15,16) (152 y 153) se elevan en un ángulo de 90°. Los compartimentos de los recipientes (155) pueden elevarse en un ángulo de 10 - 90°. La impresión es ascendente hasta el centro del módulo individual y luego descendente, de modo que los vasos más pequeños siempre discurren ascendentes hasta la placa de impresión. Esto permite enjuagar fácilmente el exceso de células en los vasos impresos inacabados. Cuando se crea un microcircuito está cerrado, el medio puede drenar a través del vaso descendente (Figuras 15 y 16).

Los compartimentos vasculares (Figuras 15 y 16) se imprimen a una distancia definida, con los compartimentos vasculares de los vasos ascendentes y descendentes corriendo alternativamente uno debajo del otro. Un abanico vascular del vaso ascendente (152) y uno del vaso descendente (153) se conectan entre sí mediante vasos puente (156) y forman el microcircuito (Figuras 15 y 16). Este proceso se repite hasta que se llena el módulo individual. Para imprimir un tejido o un órgano, se imprime un módulo de tejido (Figura 17) (158) que consta de varios módulos individuales. Los módulos individuales se imprimen uno al lado del otro en la placa de la impresora, desplazados en su orientación (Figura 15g), de modo que se crea un módulo de tejido con una longitud lateral y un grosor definidos. Los módulos de órganos pueden imprimirse en paralelo en diferentes impresoras y unirse mediante un adhesivo (por ejemplo, cola de fibrina) para formar unidades de tejido u órganos más grandes (Figura 15e).

Para poder conectar los módulos de tejido al circuito del cuerpo, es preferible imprimir un módulo de conexión de tejido (158) (Figuras 15 y 17)) y un módulo de conexión de tejido (Figuras 15 y 17).

El módulo de cierre tisular (158) consiste en un módulo tisular en el que los vasos ascendentes y descendentes de los módulos individuales se estrechan hacia arriba y, por tanto, se cierran y sellan con varias capas celulares (1510).

El módulo de conexión debe fusionar preferiblemente los vasos individuales de los módulos individuales en vasos más grandes, teniendo en cuenta los requisitos anatómicos y quirúrgicos. Los vasos de alimentación y drenaje discurren a diferentes niveles hacia los vasos de conexión. Los vasos ascendentes y descendentes se conectan de nuevo mediante vasos puente para abastecer el tejido (Figuras 15, 17).

Descripción general del proceso de impresión (Figuras 1-12):

Para conseguir un proceso de impresión económico, el tejido que se va a imprimir se divide preferiblemente en piezas individuales de módulos tisulares, que a su vez están formados por módulos individuales. El módulo tisular se compone de los módulos individuales y los módulos individuales forman una sección transversal de un nivel definido de todo el tejido u órgano con sus diferentes tipos de células y vasos. Esta subdivisión se realiza mediante un algoritmo específico. Al imprimir los niveles individuales (secciones de tejido), se crea un tejido tridimensional.

Según las especificaciones del módulo de tejido, la plancha de impresión con las aberturas de suministro se imprime a partir de un polímero.

La película de impresión hecha de un polímero biodegradable también se imprime y se fija a la mesa de impresión junto con la placa de impresión y se inserta en la cámara de impresión.

Se llenan y conectan los depósitos de tintas capilares, tintas de tejido y tintas texturizadas.

Los tipos de células requeridos se multiplican en un laboratorio externo equipado y certificado para este fin, se preconcentran para el proceso de impresión y se transportan a la impresora en los tanques.

Los recipientes para la entrada y salida del medio se llenan y las mangueras de entrada y salida se conectan a las conexiones correspondientes de la base de la mesa de impresión. La entrada y la salida se alimentan a través de un sistema de bombeo que dispone de un conducto de alimentación y otro de retorno. La cámara de

la impresora también está llena de medio, que puede mantenerse constante mediante un sistema de suministro y drenaje. Ahora puede iniciarse el proceso de impresión y la plancha de impresión se desplaza a su posición inicial.

En primer lugar, las conexiones de los vasos se imprimen en la lámina de impresión de la plancha de impresión utilizando la tinta texturizada. A continuación, la impresora imprime capa por capa, formando las áreas individuales de tejido y los vasos capa por capa y se hunde en el medio de la cámara de impresión hasta que se termina el módulo de tejido. El proceso de impresión está programado de tal forma que se inicie un breve proceso de aclarado en ciclos recurrentes después de que el tejido haya alcanzado una determinada altura, con el fin de aclarar el exceso de células no reticuladas. Este proceso de aclarado puede adoptar diversas formas. Preferiblemente, la rama ascendente se enjuaga una vez después de un número definido de ciclos de presurización y, a continuación, después de otro número definido de ciclos de presurización, se enjuaga la rama ascendente. Siempre alternando hasta que el módulo de malla haya terminado de imprimir. El proceso de lavado alternado permite lavar los vasos entrantes y salientes sin sobrecargarlos.

Una vez impreso el módulo individual, puede retirarse fácilmente de la mesa de impresión utilizando la película de impresión. Los módulos individuales impresos se ensamblan en un tejido u órgano completo utilizando un adhesivo (por ejemplo, pegamento de fibrina). Los vasos de alimentación y drenaje de los módulos individuales se combinan para formar vasos de alimentación y drenaje más grandes.

El tejido puede seguir siendo suministrado con medio a través de la circulación arterial y venosa impresa en el tejido y madurar en una incubadora durante varios días antes de ser trasplantado.

Módulos individuales utilizando el hígado como ejemplo (Figuras 15, 16, 17, 18):

El hígado está formado por aproximadamente 1-1,5 millones de lóbulos hepáticos con un diámetro de 1-2 mm. En el hígado desembocan dos vasos: la arteria hepática, que suministra oxígeno y nutrientes al tejido, y la vena porta, que transporta la sangre desde el estómago y los intestinos con los nutrientes y toxinas absorbidos. Las venas que se unen para formar la vena cava y el conducto biliar salen del hígado.

El módulo único se forma aquí a partir de los lóbulos hepáticos hexagonales individuales (171) (Figura 17a) con un diámetro de 2 mm. Los lóbulos hepáticos están dispuestos uno al lado del otro en 5 filas y tienen cada uno 5 filas de altura (Figura 17d). La disposición de los lóbulos hepáticos en las hileras, que está compensada por medio lóbulo hepático cada dos hileras, permite que se entrelacen al formar módulos de órganos.

Los lóbulos hepáticos hexagonales individuales tienen 3 vasos en cada esquina (arteria (172), vena porta (174), conducto biliar) y en el centro la vena (175). Los 4 vasos forman de nuevo una microcirculación (Figura 17b).

El lóbulo hepático está dividido en 6 segmentos (176) en cada uno de los vasos angulares, a través de los cuales fluye la microcirculación y que forman un abanico vascular. Los dos vasos suministradores, la arteria y la vena porta, discurren paralelos en la microcirculación hacia la vena. La vena viene hacia ellos desde el centro y discurre por debajo de los vasos alimentadores, de modo que los tres vasos forman un triángulo. La arteria y la vena porta están conectadas de nuevo a la vena por puentes vasculares y forman una microcirculación. El conducto biliar está situado en el centro del triángulo vascular.

Proceso de impresión de un módulo hepático (Figuras 17, 18):

Para conseguir un proceso de impresión económico, el tejido a imprimir se divide en módulos de tejido individuales, que a su vez están formados por módulos individuales. El módulo tisular compuesto por los módulos individuales y los módulos individuales forman una sección transversal de un plano definido de todo el tejido u órgano con sus diferentes tipos de células y vasos.

Este módulo único se subdivide a su vez en muchas capas sucesivas (rebanadas) mediante un algoritmo. Cada capa forma entonces una imagen de impresión bidimensional con los diferentes tipos de células y patrones. La impresión de estas capas (rebanadas) crea de nuevo un tejido tridimensional.

De acuerdo con las especificaciones del módulo hepático, la placa de presión con las aberturas de suministro está hecha de un polímero impreso. Las aberturas de suministro son los vasos de suministro y drenaje de los lóbulos hepáticos individuales (arteria, vena porta, vena del conducto biliar).

Del mismo modo, la película de impresión hecha de un polímero biodegradable (preferiblemente polihidroxibutirato, PHB) se dobla con las aberturas de suministro y se fija junto con la plancha de impresión en la mesa de impresión y se inserta en la cámara de impresión.

Se llenan los depósitos para las tintas capilares, las tintas tisulares y las tintas estructurales. Se conectan los

depósitos para los hepatocitos, las células endoteliales, los colangiocitos y las células epiteliales.

Los tipos de células requeridos para la impresión respectiva son multiplicados con antelación por un laboratorio externo equipado y certificado para este fin, preconcentrados para el proceso de impresión y transportados a la impresora en los tanques respectivos.

Los recipientes para el suministro y el drenaje del medio se llenan y las mangueras de suministro y drenaje se conectan a las conexiones correspondientes de la base de la mesa de la impresora. La entrada y la salida se suministran a través de un sistema de bomba, que tiene un flujo y un retorno.

La cámara de la impresora también está llena de medio, que puede mantenerse constante mediante un sistema de entrada y salida.

Ahora se puede iniciar el proceso de impresión, la plancha de impresión se desplaza a su posición inicial. Todos los procesos están organizados por algoritmos programados a tal efecto, que a su vez también reciben y procesan señales de control de la impresora.

La impresora imprime ahora capa por capa, formando las áreas individuales de tejido capa por capa y hundiéndose en el medio de la cámara de impresión hasta completar el módulo de tejido. El proceso de impresión es en el que se inicie un breve proceso de enjuague tras alcanzar un determinado nivel de presión del tejido con el fin de enjuagar las células sobrantes y no reticuladas. La presión se programa de tal manera que el proceso de aclarado se prolonga a medida que aumenta el número de niveles de presión para transportar las células que se van a aclarar a la cámara de presión.

Este proceso de aclarado puede llevarse a cabo en varias formas de realización. En una realización preferida la rama ascendente se purga una vez y, a continuación, la rama descendente después de otro número definido de procesos de impresión. Siempre alternando hasta que el módulo de tejido haya terminado de imprimir. El proceso de enjuague alternado permite enjuagar los recipientes de entrada y salida sin sobrecargarlos.

Una vez impreso el módulo hepático, puede retirarse fácilmente de la mesa de impresión utilizando la película de impresión.

Una vez impresos todos los módulos hepáticos necesarios para el tejido, así como el módulo de lanzamiento del tejido y el módulo de conexión del tejido, se ensamblan en un tejido u órgano completo utilizando un adhesivo (por ejemplo, pegamento de fibrina).

A través de la circulación arterial y venosa impresa en el tejido, éste puede seguir siendo suministrado con medio y madurar en una incubadora durante varios días antes de ser trasplantado (Figura 19).

Ejemplos:

Los ejemplos 1) a 4) corresponden a los ejemplos ya descritos para su explicación en el capítulo "Objeto de la invención". A continuación se completan con otros ejemplos de realización:

Los signos de referencia que figuran en los ejemplos se refieren en particular a las figuras específicas.

1) Proceso general de impresión: principios teóricos y diseños preferidos

Figura 15:

La invención aquí divulgada describe un método para la impresión 3D de órganos y tejidos. Las áreas de impresión más grandes se dividen en módulos individuales, que se imprimen independientemente unos de otros (en la misma impresora o en impresoras diferentes) y luego se ensamblan y se unen (por ejemplo, con pegamento de fibrina) para formar el órgano o tejido objetivo. Los vasos de alimentación y drenaje de los módulos individuales se combinan para formar los vasos de alimentación o drenaje principales. El módulo individual es preferiblemente una estructura cúbica con una longitud de arista definida.

Un tejido o un órgano pueden tener la misma estructura, pero no son idénticos. Cada individuo difiere ligeramente uno de otro, aunque sean de la misma especie. Esto no sólo se manifiesta en el tamaño, sino también en el desarrollo individual. Los músculos de un atleta, por ejemplo, están mucho más capilarizados que los de un no atleta debido a la mayor necesidad de oxígeno. El organismo se adapta a las condiciones ambientales, por lo que nunca es idéntico y experimenta una acumulación y una descomposición constantes.

Por lo tanto, el factor decisivo es la función del tejido y no la reproducción anatómica exacta del tejido del paciente. Por lo tanto, aquí se divulga un sistema modular que permite la función del tejido pero también se ha simplificado y sistematizado hasta tal punto que la impresión 3D del tejido puede llevarse a cabo de forma

económica. El bloque de construcción básico del tejido u órgano es el módulo cúbico simple (151) (Figura 15a) con una longitud lateral definida. Para abastecer el tejido, que puede estar formado por uno o varios tipos de células y, por lo tanto, también puede formar un tejido funcional como un órgano, se abastece por un lado mediante un vaso ascendente (152), que posteriormente forma la arteria. En el lado opuesto, el vaso descendente (153) forma la vena. Los vasos más pequeños (154) se ramifican de los vasos en forma de abanico, se extienden hasta el nivel del vaso opuesto del otro lado y discurren paralelos entre sí (Figura 15b). Los vasos más pequeños (154) están conectados entre sí por vasos puente (156), que más tarde forman los capilares y cierran la "circulación sanguínea" y forman una microcirculación (Figuras 15c y 15d).

El microcircuito es la unidad de alimentación más pequeña del tejido impreso. Aquí, el vaso (arteria) ascendente (152), el medio fluye hacia un vaso pequeño (154), que pertenece a la rama ascendente. Desde el vaso pequeño, el medio fluye a través de los vasos puente (156) hacia un vaso pequeño (154) situado más abajo, que pertenece a la rama descendente y desemboca en el vaso descendente (153).

Dado que al imprimir los vasos con la tinta capilar se imprimen muchas células por gota y sólo las células de los bordes son capaces de reticularse con el tejido circundante, es necesario eliminar las células sobrantes. Para ello y para suministrar las células impresas, cada microcircuito se enjuaga con medio durante un breve espacio de tiempo tras su finalización. Durante cada proceso de enjuague, los microcircuitos situados por debajo del último microcircuito también se enjuagan y se suministran las células. El flujo de medio expulsa las células no reticuladas. Los recipientes horizontales no son ideales para este proceso, por lo que todos los recipientes impresos tienen un ángulo de 10 a 90 grados con respecto a la placa de impresión.

Los vasos ascendentes y descendentes (2 y 3) se elevan en un ángulo de 90°. Los compartimentos de los recipientes (155) pueden ascender en un ángulo de 10 - 90°. La impresión es ascendente hasta el centro del módulo individual y luego descendente, de modo que los vasos más pequeños siempre corren ascendentes hacia la placa de impresión. Esto permite enjuagar fácilmente el exceso de células en los vasos impresos inacabados. Cuando se cierra un microcircuito, el medio puede drenarse a través del recipiente descendente (Figura 15f).

Los compartimentos vasculares se imprimen a una distancia definida, y los compartimentos vasculares de los vasos ascendentes y descendentes discurren alternativamente uno debajo del otro. Un abanico vascular del vaso ascendente (152) y uno del vaso descendente (153) se conectan entre sí mediante vasos puente (156) y forman el microcircuito (Figura 15d). Este proceso se repite hasta llenar el módulo individual. Para imprimir un tejido o un órgano, se presiona un módulo de tejido (158) que consta de varios módulos individuales. Los módulos individuales se imprimen uno al lado del otro en la placa de la impresora, desplazados en su orientación (Figura 15g), lo que da como resultado un módulo de tejido con una longitud lateral y un grosor definidos. Los módulos de órganos pueden imprimirse en paralelo en diferentes impresoras y unirse mediante un adhesivo (por ejemplo, cola de fibrina) para formar unidades de tejido u órganos más grandes (Figura 15e).

Para poder conectar los módulos de tejido a la circulación del cuerpo, es necesario imprimir un módulo terminación de tejido (158) (Figura 15g) y un módulo de conexión de tejido (Figura 15h).

El módulo de cierre tisular (158) consiste en un módulo tisular en el que los vasos ascendentes y descendentes de los módulos individuales se estrechan hacia arriba y, por tanto, se cierran y sellan con varias capas celulares (1510).

El módulo de conexión debe conectar preferiblemente los recipientes individuales de los módulos individuales para formar recipientes más grandes y tener en cuenta los requisitos anatómicos y quirúrgicos. Los vasos de alimentación y drenaje discurren a distintos niveles hasta los vasos conectores. Los vasos ascendentes y descendentes se conectan de nuevo mediante vasos puente para irrigar el tejido.

2) Descripción general del proceso de impresión:

Para conseguir un proceso de impresión económico, el tejido a imprimir se divide en módulos de tejido individuales, que a su vez están formados por módulos individuales. El módulo tisular compuesto por los módulos individuales y los módulos individuales forman una sección transversal de un plano definido de todo el tejido u órgano con sus diferentes tipos de células y vasos. Esta subdivisión tiene lugar con la ayuda de un algoritmo. Al imprimir las capas individuales (secciones de tejido), se vuelve a crear un tejido tridimensional.

Según las especificaciones del módulo de tejido, la plancha de impresión con las aberturas de suministro se imprime a partir de un polímero.

La película de impresión hecha de un polímero biodegradable también se imprime y se fija a la mesa de la impresora junto con la placa de impresión y se inserta en la cámara de impresión.

Se llenan y conectan los depósitos de tintas capilares, tintas de tejido y tintas texturadas.

Los tipos de células requeridos se propagan en un laboratorio externo equipado y certificado para este fin y para el proceso de impresión y se transportan a la impresora en los depósitos.

Los contenedores para el suministro y el drenaje del medio se llenan y las mangueras de suministro y drenaje se conectan a las conexiones correspondientes en la base de la mesa de la impresora. El suministro y el drenaje se realizan a través de un sistema de bombeo, que cuenta con una línea de suministro y otra de retorno. La cámara de la impresora también se llena de medio, que puede mantenerse constante mediante un sistema de entrada y salida. Ahora se puede iniciar el proceso de impresión, la plancha de impresión se desplaza a su posición inicial.

En primer lugar, las conexiones de los vasos se imprimen en la lámina de impresión de la placa de impresión utilizando la tinta texturizada. A continuación, la impresora imprime capa por capa, formando las zonas individuales de tejido y los vasos capa por capa y hundiéndose en el medio de la cámara de impresión hasta completar el módulo de tejido. El proceso de impresión está programado de tal forma que, en ciclos recurrentes, tras alcanzar una determinada altura del tejido se inicia un breve proceso de aclarado para eliminar el exceso de células no reticuladas. Este proceso de aclarado puede adoptar diversas formas. Preferiblemente, la rama ascendente se enjuaga una vez después de un número definido de procesos de impresión y, a continuación, la rama descendente se enjuaga después de otro número definido de procesos de impresión. Siempre alternando hasta que el módulo de tejido haya terminado de imprimir. El proceso de enjuague alternado permite enjuagar los recipientes entrantes y salientes sin sobrecargar los recipientes.

Una vez impreso el módulo individual, puede retirarse fácilmente de la mesa de impresión utilizando la película de impresión. Los módulos individuales impresos se ensamblan en un tejido u órgano completo utilizando un adhesivo (por ejemplo, pegamento de fibrina). Los vasos de alimentación y drenaje de los módulos individuales se combinan para formar vasos de alimentación y drenaje más grandes.

A través de la circulación arterial y venosa impresa en el tejido, éste puede ser suministrado además con medio y madurar en una incubadora durante varios días antes de ser trasplantados.

3) Módulos individuales utilizando el hígado como ejemplo (Figura 17)

El hígado consta de aproximadamente 1-1,5 millones de lóbulos hepáticos con un diámetro de 1-2 mm. En el hígado la arteria hepática, que suministra oxígeno y nutrientes al tejido, y la vena porta, que transporta la sangre desde el estómago y los intestinos con los nutrientes y toxinas absorbidos. Las venas que se unen para formar la vena cava y el conducto biliar salen del hígado.

El módulo único se forma aquí a partir de los lóbulos hepáticos hexagonales individuales (171) (Figura 17a) con un diámetro de 2 mm. Los lóbulos hepáticos están dispuestos uno al lado del otro en 5 filas y tienen cada uno 5 filas de altura (Figura 17b). La disposición de los lóbulos hepáticos en las hileras, que está compensada por medio lóbulo hepático cada dos hileras, les permite entrelazarse en la formación de módulos de órganos.

Los lóbulos hepáticos hexagonales individuales tienen 3 vasos en cada esquina (arteria (172), vena porta (174), conducto biliar) y la vena (175) en el centro. Los 4 vasos forman de nuevo una microcirculación (Figura 17b).

El lóbulo hepático está subdividido en 6 segmentos (176) en cada uno de los vasos angulares, que están separados por el microcircuitos y forman un abanico vascular (Figura 17d). Los dos vasos alimentadores, la arteria y la vena porta, discurren paralelos en la microcirculación hacia la vena. La vena viene hacia ellos desde el centro y discurre por debajo de los vasos alimentadores, por lo que los tres vasos forman un triángulo. La arteria y la vena porta están unidas de nuevo a la vena por puentes vasculares y forman una microcirculación. El conducto biliar está situado en el centro del triángulo vascular.

4) Ejemplo de proceso de impresión de un módulo hepático (Figuras 17 y 18):

Para conseguir un proceso de impresión económico, el tejido a imprimir se divide en módulos individuales de tejido, que a su vez están formados por módulos individuales. El tejido formado por los módulos individuales y los módulos individuales forman una sección transversal de un nivel definido de todo el tejido u órgano con sus diversos tipos de células y vasos.

Este módulo único se divide a su vez en muchas capas sucesivas (rebanadas) mediante un algoritmo. Cada capa forma entonces una imagen de impresión bidimensional con los diferentes tipos de células y patrones. La impresión de estas capas (rebanadas) crea de nuevo un tejido tridimensional.

La placa de impresión con las aberturas de suministro se imprime a partir de un polímero de acuerdo con las especificaciones del módulo hepático. Las aberturas de suministro son los vasos de suministro y drenaje de los lóbulos hepáticos individuales (arteria, vena porta, vena del conducto biliar).

Del mismo modo, la película de impresión se fabrica a partir de un polímero biodegradable (preferentemente polihidroxibutirato, PHB) con las aberturas de suministro y se fija junto con la placa de impresión en la mesa de la impresora y se inserta en la cámara de impresión.

- 5 Se llenan los depósitos para las tintas capilares, las tintas tisulares y las tintas estructurales. Se conectan los depósitos para los hepatocitos, las células endoteliales, los colangiocitos y las células epiteliales.

10 Los tipos de células necesarios para la impresión respectiva son multiplicados previamente por un laboratorio externo equipado y certificado para este fin, preconcentrados para el proceso de impresión y transportados a la impresora en los tanques respectivos.

15 Los recipientes para la entrada y salida del medio se llenan y las mangueras de entrada y salida se conectan a las conexiones correspondientes de la base de la mesa de impresión. La entrada y la salida se alimentan a través de un sistema de bombeo que tiene un flujo de ida y otro de retorno.

La cámara de presión también está llena de medio, que puede mantenerse constante mediante un sistema de entrada y salida.

20 Ahora se puede iniciar el proceso de impresión y la plancha de impresión se desplaza a su posición inicial. Todos los procesos están organizados por algoritmos programados a tal efecto, que a su vez también reciben y procesan señales de control de la impresora

25 La impresora imprime ahora capa por capa, formando las áreas individuales de tejido capa por capa y hundiéndose en el medio de la cámara de impresión hasta completar el módulo de tejido. El proceso de impresión se programa de tal manera que se inicie un breve proceso de enjuague después de que el tejido alcance una determinada altura de impresión, con el fin de enjuagar las células sobrantes y no reticuladas. La presión se programa de forma que el proceso de aclarado se prolonga a medida que aumenta el número de niveles de presión para transportar las células que se van a lavar a la cámara presurizada.

30 Este proceso de lavado puede tener lugar en varias formas de realización. En una realización preferida, la rama ascendente se lava una vez, luego la rama descendente se lava después de un número definido de procesos de impresión. Siempre alternando hasta que el módulo de tejido haya terminado de imprimir. Debido a la alternancia del proceso de aclarado, los recipientes de entrada y salida pueden lavarse sin sobrecargar los recipientes.

35 Una vez impreso el módulo hepático, puede retirarse fácilmente de la mesa de impresión utilizando la película de impresión.

40 Una vez impresos todos los módulos hepáticos necesarios para el tejido, así como el módulo de lanzamiento del tejido y el módulo de conexión del tejido, se pegan con un adhesivo (por ejemplo, cola de fibrina) para formar un tejido completo o un módulo de conexión del tejido.

45 A través de la circulación arterial y venosa impresa en el tejido, éste puede seguir siendo suministrado con medio y madurar en una incubadora durante varios días antes de ser trasplantado.

5) Una versión ampliada de la estructura de la impresora:

La impresora se compone de:

- 50 - Varios cabezales de impresión con un número de boquillas para el proceso de gotas y con una o más fuentes espacialmente controlables de ondas electromagnéticas, que producen una entrada de energía modulable en longitud de onda, intensidad y frecuencia
- 55 - Ondas electromagnéticas modulables que se utilizan para activar selectivamente las reacciones de reticulación
- Un tanque de reacción sellable lleno de medio con conexiones para cambio de medio, muestreo y opcionalmente cambiar la ruta de suministro de medio o sangre del paciente después de la impresión, la bandeja de reacción se puede retirar de la impresora y puede funcionar como una incubadora
- 60 - Una placa base situada en el tanque de reacción con conexiones para el sistema vascular resultante, a través del cual fluye medio de forma continua o a intervalos y que se utiliza para alimentar el tejido impreso
- 65 - Varios depósitos para las tintas necesarias
- Diversas tintas capilares, biotintas y tintas texturadas

- Áreas estructurales (por ejemplo, estructuras de soporte, matriz extracelular u otros componentes no celulares, por ejemplo, polihidroxialcanoatos, fibrinógenos, colágenos, mielinas, glucosaminas, glucolípidos, péptidos, moléculas de azúcar, ácidos grasos, moléculas de bloqueo, moléculas orgánicas e inorgánicas para la conducción de estímulos, etc.)
- Moléculas con propiedades (por ejemplo, moléculas con diferentes propiedades fisiológicas, como factores de crecimiento, factores de transcripción, moléculas receptoras, moléculas de señalización, ARN, ADN, moléculas de diferenciación, etc.)
- Tipos de células homogéneos (por ejemplo, miocitos, células hepáticas, neuronas, etc.)
- Mezclas de tipos de células heterogéneos (por ejemplo, células endoteliales, células musculares) para la presión del sistema vascular

- Una mesa de la impresora que se puede mover hacia arriba y hacia abajo durante la impresión, opcionalmente el cabezal de la impresora se puede mover hacia arriba y hacia abajo en su lugar o ambos a la vez

6) Ejemplo de maduración del tejido impreso en la incubadora

La incubadora se utiliza para diferenciar el tejido u órgano impreso. Tras la impresión, ya se ha creado un complejo tisular con una alta densidad celular, pero las células aún no han alcanzado su estructura tisular y diferenciación definitivas. El tejido u órgano se imprime directamente en una cámara que posteriormente sirve de incubadora. Opcionalmente, el tejido u órgano también puede transferirse a otra incubadora. La incubadora proporciona parámetros de diferenciación importantes que son necesarios para la diferenciación, como sustancias biológicas químicas o moleculares o parámetros de flujo.

La incubadora puede funcionar opcionalmente con medio de cultivo y en un momento posterior fuera de la incubadora, del cuerpo al torrente sanguíneo del paciente o la incubadora se conecta al torrente sanguíneo del paciente inmediatamente después de la impresión. En contacto con la sangre del paciente, los factores de diferenciación y crecimiento necesarios llegan a las estructuras impresas y las células pueden adaptarse al cuerpo.

7) Ejemplo de estructura del cabezal de impresión (Figura 19)

El cabezal de impresión consta de una primera sección para la impresión por gotas de biotintas, tintas capilares y tintas estructuradas. El proceso de gotas suele realizarse mediante boquillas piezoeléctricas o boquillas de burbuja. El proceso de impresión es similar al sistema cian/magenta/amarillo/negro/gris/gris claro/magenta claro/cian claro de las impresoras fotográficas en cuanto a la secuencia y disposición de las gotas producidas. Las tintas de color se sustituyen por el número necesario de biotintas, tintas capilares y tintas texturadas.

En una segunda subárea, el cabezal de impresión tiene una o más fuentes no direccionales o direccionales para ondas electromagnéticas. En su conjunto, las fuentes direccionales generan una fuente de energía selectiva que puede modularse en términos de longitud de onda, intensidad y frecuencia. Por regla general, se utilizan lámparas UV, diodos emisores de luz, láseres o pantallas como fuentes de ondas electromagnéticas. Las ondas electromagnéticas generalmente utilizadas son la luz ultravioleta, la luz visible y las longitudes de onda del espectro infrarrojo.

Las unidades funcionales del cabezal de impresión para el proceso de gotas y para el proceso de suministro de ondas electromagnéticas también pueden disponerse separadas entre sí. El cabezal de impresión también puede construirse a partir de una serie de módulos de dichas unidades.

8) Otro diseño alternativo del tanque de reacción con placa base, suministro de medio (Figuras 1, 2,3,4,5,6,7):

En la cámara de impresión de la impresora hay una mesa de impresión que se puede mover hacia arriba y hacia abajo con una serie de conexiones para el flujo del medio a través de las estructuras vasculares impresas.

Fuera de la cámara presurizada, las conexiones están conectadas a un sistema externo para mantener los parámetros de cultivo celular. Entre ellos figuran la temperatura, el valor pH, el contenido de CO₂, el contenido de O₂, los nutrientes, los factores de crecimiento, etc. Dado que las células no reticuladas dentro de las estructuras vasculares impresas también se eliminan en forma de restos celulares o como células enteras, deben comprobarse los parámetros del medio que drena en la cámara de impresión y, si es necesario, limpiarse o sustituirse.

Durante la presión del tejido vascularizado, se bombea medio a través de las conexiones hacia las estructuras vasculares presurizadas. Esto sirve, por un lado, para nutrir el tejido resultante y, por otro, para enjuagar las estructuras huecas del sistema vascular. El medio entra en las estructuras vasculares a través de las conexiones de la mesa de impresión, fluye a través del tejido vascularizado impreso hasta el momento y se filtra de nuevo por encima del lado que da al cabezal de impresión en las cavidades aún abiertas del sistema vascular. Desde allí, el medio vuelve a fluir pasivamente hacia la cámara de la impresora o es absorbido activamente de la superficie de impresión durante el proceso de impresión (por ejemplo, mediante enjuague o succión).

Durante el proceso de impresión, la mesa de impresión desciende cada vez más dentro de la cámara de impresión. En este caso, es necesario llenar las zonas llenas de aire del depósito de reacción con gas inerte (por ejemplo, nitrógeno, argón).

9) Suministro de la información digital necesaria para el software de la impresora 3D

Los datos digitales sobre la estructura celular de tejidos y órganos se obtienen a partir de procedimientos médicos de obtención de imágenes y se programan en datos de impresión 3D. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, MRT o el método de "transparencia DISCO". Los métodos para determinar estos datos son conocidos por el experto en la materia. A partir de estos datos, se utiliza un algoritmo especial para determinar un número de módulos necesarios para la presión económica de los tipos de células requeridos, así como el tamaño y el espaciado necesarios de los capilares y los vasos venosos y arteriales. Se calcula el tamaño de los vasos. Para una impresión económica, no es necesario reimprimir las estructuras biológicas originales. La estructura de los módulos individuales ya se ha descrito en los apartados 1) a 4).

10) Innovador software de impresión:

El software de la impresora -no reclamado- procesa la información sobre las áreas de tejido a imprimir y la transmite al cabezal y a la mesa de impresión para su ejecución. A diferencia de la programación convencional de impresoras 3D, tanto la tecnología de gotas (patrón de impresión de las tintas específicas y tamaño de las gotas) como, en el caso de una fuente direccional para ondas electromagnéticas, una tecnología láser modulada (longitudes de onda, intensidades y frecuencias de energía requeridas, modulación espacial) se combinan y armonizan entre sí. Un papel central lo desempeña la coordinación espacial y temporal de la liberación de gotas de tipos de tinta específicos sobre la placa de presión del pocillo de reacción con el tejido con el suministro espacial y temporal de ondas electromagnéticas en una longitud de onda, frecuencia e intensidad específicas de la tinta necesarias para su reticulación. La atención se centra en la reticulación selectiva de células endoteliales y células musculares dentro de una gota de tinta de una mezcla celular para formar estructuras vasculares (sección "Grupos protectores utilizados y fotoiniciador")

11) Maduración de un tejido y órgano impreso hasta su trasplante:

La incubadora con tejido u órgano tiene conexiones para la conexión ex vivo a la circulación sanguínea del paciente o a un sistema de suministro de medio. La estructura celular de la impresión 3D se diferencia aún más mediante un periodo de incubación de unas horas a unos días. Las células reciben importantes factores de desarrollo, en particular mediante la conexión del circuito vascular de la impresión con la circulación sanguínea del paciente. Las células endoteliales y las células musculares de las estructuras vasculares impresas también requieren una presión vascular interna específica de la sangre o del medio y una velocidad de flujo específica para diferenciarse.

Durante la fase de maduración, es posible comprobar valores fisiológicos específicos a través de conexiones en la incubadora y controlar así la maduración del órgano o tejido. Si los valores fisiológicos del órgano o tejido impreso alcanzan los valores fisiológicos de un órgano natural dentro de un rango determinado, puede realizarse el trasplante en el cuerpo del paciente.

12) Estructura ejemplar de las nuevas tintas de baja viscosidad:

La estructura básica de las tintas consiste en moléculas de reticulación de cadena corta y baja viscosidad, fotoiniciadores y células. Las moléculas de reticulación de cadena corta tienen al menos un grupo funcional, normalmente 2 o más, que generalmente consisten en grupos alilo o grupos tiol y sufren reacciones de polimerización o adición.

Las moléculas de reticulación utilizadas con frecuencia son moléculas modificadas con metacrilato y moléculas modificadas con tiol, por ejemplo, cadenas peptídicas modificadas con metacrilato o con tiol, polihidroxialcanoatos o ácidos hialurónicos. Las biotintas y tintas estructurales están compuestas predominantemente por moléculas modificadas con metacrilato (polimerización radical o adición) o también por una mezcla de moléculas modificadas con metacrilato y moléculas modificadas con tiol (reacciones tiol-eno). En cambio, las tintas capilares están compuestas generalmente por moléculas de reticulación puras

modificadas por tiol, que sólo reticulan en los bordes de la gota en interacción con las moléculas de reticulación modificadas por alilo de las biotintas y las tintas estructurales.

Por regla general, se utilizan fotoiniciadores que trabajan en el rango de aprox. 380 nm o con fotoiniciadores que se encuentran en el rango infrarrojo. Los fotoiniciadores en el rango infrarrojo son fuentes de energía estereoscópica similares a la estereolitografía multifotónica (absorción multifotónica no lineal), en la que deben superponerse diferentes fuentes de energía para desencadenar una reacción.

Cuando se imprimen células con factores selectivos (por ejemplo, grupos protectores escindibles para grupos tiol), se utilizan fotoiniciadores adicionales por debajo de 380 nm.

Ejemplos de fotoiniciadores utilizados son DAROCUR 1173, IRGACURE 2959 Y 369, $(\text{Ru}(\text{phen})_3/\text{lodo}/(\text{TMS})_3\text{Si-H PIS})$ y fotoiniciador 183 de "P. Xiao y otros/Progress in Polymer Science 41 (2015) 32 - 66, p. 46". Los fotoiniciadores para excitación IR son H-Nu-IR 780 y H-Nu-IR 815. Se ha descubierto que varios fotoiniciadores de la gama de luz visible también pueden activarse mediante multifotones.

13) Suministro de las células necesarias para la impresión:

Las células para el novedoso proceso de impresión 3D aquí divulgado pueden obtenerse de varias maneras. El origen de las células depende del uso previsto del tejido u órgano impreso con ellas.

La forma más sencilla de generar células es utilizar líneas celulares disponibles en el mercado. Con dichas células se pueden optimizar los parámetros de presión y los parámetros de cultivo, ya que no es necesario utilizar las relativamente caras células madre inducidas (iPS) o células aisladas de órganos y tejidos para estos ensayos.

Otra fuente de células es el aislamiento de ciertos tipos de células de órganos y tejidos. Además de células animales para la investigación, este proceso ya se utiliza de diversas formas en medicina regenerativa, por ejemplo el aislamiento de células de cartilago de disco intervertebral a partir de material de prolaps de operaciones de disco intervertebral. El material del prolaps se disuelve y las células se aíslan de él, se multiplican y se utilizan en la impresión 3D de tejidos, entre otras cosas.

Probablemente la fuente de células más exigente es la generación de células madre inducidas (iPS). Para ello procedimientos de varios grupos de trabajo establecidos. Las células iPS son necesarias para imprimir tejidos y órganos humanos que posteriormente se implantarán en el cuerpo humano. Sin embargo, estas células y las estructuras impresas a partir de ellas también pueden utilizarse en cultivos celulares como material de ensayo para fármacos individualizados. Las células iPS suelen cultivarse a partir de células de piel de donantes. Las células de la piel se diferencian en células iPS, se multiplican y se diferencian en los tipos de células necesarios para la impresión. Estos procesos aún no están bien establecidos para un uso generalizado, pero representan el futuro en la producción de implantes autólogos humanos de órganos y tejidos.

Otras fuentes de material celular son las líneas celulares cultivadas para fines específicos, que suelen modificarse de diversas maneras (por ejemplo, a base de ADN, a base de ARN o a base de proteínas).

En principio, cualquier tipo de célula (primaria o línea celular) puede ser cultivada e impresa utilizando el método aquí descrito serán.

13) Ejemplos de tintas para impresión con células que contienen un factor selectivo (Figuras 13, 14):

Una posibilidad para reticular tintas capilares sólo en la región del borde es el uso de mezclas celulares de células doteliales y musculares que se reticulan selectivamente dentro de una gotita. Para ser activadas selectivamente por un rayo láser dirigido, estos tipos de células requieren un factor selectivo específico. Este factor selectivo es, por ejemplo, un grupo protector escindible en un grupo tiol funcional situado en la membrana celular del tipo de célula en cuestión. Mediante el uso de diferentes grupos protectores que pueden escindirse a diferentes longitudes de onda, los diferentes tipos de células pueden separarse entre sí en su reacción de reticulación. En esta aplicación, la tinta capilar consiste generalmente en moléculas de reticulación modificadas con tiol con un grupo protector que están ancladas a la membrana celular y moléculas libres modificadas con tiol y protegidas en la tinta. Además, las moléculas modificadas con alilo están presentes en la tinta para permitir una reacción de reticulación tiol-eno.

14) Ejemplo de estructura de las tintas y factor selectivo (Figura (Figuras 13, 14):

La reacción tiol-eno dependiente de la luz tiene lugar selectivamente dentro del intervalo espacial de reticulación definido por el láser mediante factores selectivos. Estos factores selectivos consisten, por ejemplo, en grupos protectores separables por luz que bloquean los grupos tiol. Debido a su diferente estructura molecular, estos grupos protectores pueden dividirse mediante diferentes longitudes de onda de luz. Se seleccionan grupos

protectores que no se solapan en el rango de su espectro de excitación.

Para reticular selectivamente sólo ciertos tipos de células de una mezcla en una zona alcanzada por el láser, pero no otros, los grupos protectores de los grupos tiol deben escindirse en las células en cuestión. Esto significa que sólo estas células y estas moléculas de reticulación son accesibles a una reacción tiol-eno. Posteriormente, en este ejemplo, la reacción de reticulación tiol-eno se inicia mediante un fotoiniciador cuyo espectro de excitación está por encima de la longitud de onda de todos los grupos protectores utilizados, de modo que no se escindan inadvertidamente (véanse los ejemplos a continuación).

15) Presión del sistema vascular con células que contienen un factor selectivo:

Dado que el diámetro de los capilares finos entre las arterias y las venas es de sólo unos pocos micrómetros, pero las gotas en el procedimiento de gotas son más grandes, el anillo interior de una sola capa de células endoteliales está hecho de una gotita de una mezcla celular se reticula selectivamente. El anillo de células musculares que rodea este anillo también se reticula selectivamente a partir de la mezcla celular. Para ello, las células endoteliales y musculares llevan cada una grupos protectores escindibles a diferentes longitudes de onda como factor selectivo (véanse los ejemplos a continuación). Tras la escisión selectiva de los grupos protectores en el tipo de célula correspondiente, la reacción tiol-eno puede tener lugar en las células desprotegidas. De este modo, un primer rayo láser en la gota elimina primero aprox. 5 - 7 endo-células y las moléculas de reticulación protegidas modificadas con tiol que se encuentran entre ellas se desprotegen para formar una estructura en forma de anillo y, a continuación, se reticulan entre sí en forma de anillo utilizando un segundo haz láser. El segundo rayo láser se utiliza para excitar un fotoiniciador y se sitúa por encima de la longitud de onda del primer y tercer rayo láser.

De este modo se crea un anillo endotelial de una sola capa con un diámetro interior de aproximadamente 10 micrómetros, cuya superficie interna está formada por células bloqueadas no reticuladas. A continuación, las células musculares externas vecinas al anillo endotelial y las moléculas de reticulación protegidas modificadas con tiol se desprotegen mediante un tercer rayo láser y se reticulan con un segundo rayo láser para formar un anillo externo. Mientras que el primer y el tercer rayo láser escinden los grupos protectores correspondientes a diferentes longitudes de onda, el segundo rayo láser provoca la activación de un fotoiniciador, que inicia las reacciones tiol-eno.

Las células no reticuladas dentro de los capilares son destruidas por un rayo láser de mayor energía (cuarto rayo láser) y los restos celulares resultantes son expulsados por el medio de entrada.

16) Grupos protectores y fotoiniciadores utilizados en tintas con factores selectivos (Figuras 13, 14):

Mientras que el tipo de reacción puede seleccionarse libremente para la reticulación de tintas con tipos de células homogéneos y no es selectiva, los distintos tipos de células con tintas heterogéneas tienen socios de reacción tiol-eno con un grupo protector específico que puede escindirse en la longitud de onda correspondiente. Las curvas de las energías de activación necesarias no deben solaparse (Figura 13).

Para la reticulación de las células endoteliales y de las células musculares que las rodean, se utiliza la siguiente técnica de UV-gap- Se utilizan 30 grupos de protección:

325 nm: (7,8-bis(carboximetoxi)-cumarin-4il)metoxycarbonilo para células musculares

400 nm: α carboxi-4metoxi-2-nitrobencil para células endoteliales

(Fuente: Wavelength-selective cleavable photolabile protecting groups for thiols, Nico Kotzur, 2009)

En primer lugar, el grupo protector con la mayor longitud de onda requerida se escinde para no activar inadvertidamente el otro grupo protector. Para la reacción tiol-eno propiamente dicha, se utiliza un fotoiniciador (Ru(phen)₃/Iodo/(TMS)₃ Si-H PIS), cuyo espectro de excitación se sitúa en 532 nm, se utiliza para analizar los grupos protectores de la escisión accidental. También puede utilizarse el fotoiniciador 183 (P. Xiao y otros/Progress in Polymer Science 41 (2015) 32 - 66, p. 46), que se excita a 473 nm.

En un primer paso, el grupo protector de los grupos tiol de las células endoteliales se escinde a 400 nm (primer rayo láser). En esta zona, los grupos tiol de las células musculares siguen estando protegidos. A continuación, el fotoiniciador se activa a 532 nm y se desencadena una reacción tiol-eno en los grupos desprotegidos (segundo rayo láser). Debido a la orientación espacial de los dos rayos láser sucesivos (primero 400 nm, luego 532 nm), se suelen reticular de 5 a 12 células endoteliales en un anillo.

En un segundo paso, los grupos protectores de los grupos tiol de las células musculares se escinden a 325 nm (rayo láser 3). Dado que la orientación espacial de los rayos láser para la zona de las células endoteliales (400 nm y 532 nm) no incide en la zona del anillo muscular que rodea a las células endoteliales, las células

endoteliales de la mezcla celular siguen presentes allí con grupos protectores y no pueden participar en la reacción tiol-eno de los grupos tiol desprotegidos de las células musculares. Posteriormente, la activación del fotoiniciador a 532 nm hace que las células musculares del anillo se entrecrucen por segunda vez (rayo láser).

5 De este modo, puede garantizarse que sólo el tipo de célula deseado se inserte a la estructura correspondiente.

Se dispone de grupos protectores adicionales para grupos tiol para otros factores selectivos requeridos (Figura 13), por ejemplo, el grupo que puede escindirse a 436 nm ((7bis(carboximetil)amino)-cumarin-4-il)metoxicarbonilo). El proceso de reticulación es análogo al descrito anteriormente. (Fuente: Wavelength-selective cleavable photolabile protecting groups for thiols, Nico Kotzur, 2009)

Las células no reticuladas dentro de los capilares son destruidas por un cuarto rayo láser de mayor energía y los restos son expulsados del medio.

15 17) Producción ejemplar de células autólogas del paciente con un factor selectivo

Las células extraídas del paciente (por ejemplo, células de la piel) se convierten en células madre inducidas (iPS), se multiplican, se dividen en fracciones individuales y, a continuación, se diferencian en los tipos de células requeridos. Esta preparación tiene lugar independientemente del proceso de impresión y sólo se menciona aquí como ejemplo para mostrar el camino hacia la impresión de órganos 3D reales. Este proceso puede durar de semanas a meses, dependiendo de la complejidad del órgano a imprimir. Una vez producidas las líneas celulares necesarias, pueden congelarse y almacenarse hasta que sea necesario imprimirlas. Las células congeladas pueden descongelarse, hibridarse con el factor selectivo e imprimirse. Es más suave para las células incubadas durante 24 horas tras la descongelación en el cultivo celular y luego hibridarlas con su factor selectivo específico.

Por regla general, el factor selectivo se une a una molécula de anclaje para anclarse en la membrana celular. Las moléculas de anclaje utilizadas son generalmente de aplicación universal para todos los tipos de células. Sorprendentemente, se ha demostrado que las moléculas de anclaje perfluoradas son las más eficaces. La experiencia ha demostrado que estas moléculas se unen al 100 % de las células implicadas en 2 minutos. No obstante, también pueden actuar como moléculas de anclaje moléculas lipofílicas, péptidos, iones o anticuerpos.

35 18) Preparación de las células con factor selectivo para la impresión:

Poco antes de la impresión, las células del sistema capilar se hibridan con su factor selectivo específico: Las células endoteliales y las células musculares utilizadas se preparan primero por separado en el cultivo celular para la impresión y se hibridan con su respectivo factor selectivo. A continuación se combinan en las tintas capilares.

40 Otros comentarios sobre las ilustraciones:

Figura 1:

Figura 1: Ejemplo de estructura esquemática de una impresora y modo de funcionamiento:

La invención se basa en una impresora piezoeléctrica fotorrealista convencional.

Recientemente se han divulgado modificaciones del suministro de tinta (1-5) y de la estructura de la mesa de impresión (12, 13, 14, 15).

La impresora se compone de las unidades de suministro de tinta (1 - 5), el cabezal de impresión piezoeléctrico (15), el cabezal de impresión (13) con cámara de impresión llena de medio (14) y el motor de la mesa de impresión (12). Además, hay un depósito de medio (8) para suministrar el tejido con mangueras de suministro (9) y un depósito de residuos (11) y mangueras de descarga de medio (10) en la impresora.

Los componentes individuales están rodeados por una carcasa (6). La unidad central de control/ordenador/software (7), que se comunica con los componentes 1 - 5, 15 y 12, se encuentra fuera de la carcasa (líneas discontinuas).

Figura 2 - 7:

Figura 2 - 7: Ejemplo de estructura de tabla de impresora y modo de funcionamiento:

A continuación se describe un nuevo sistema de mesa de impresión. La mesa de impresión consta esencialmente de 5 partes:

Una plancha de impresión (27), una mesa de impresión (13) con conexiones de alimentación, que se acciona mediante un motor paso a paso (23) y un tornillo micrométrico (22) se pueden bajar en la cámara de presión.

La placa de impresión (27) se imprime individualmente para el órgano u organoide utilizando una impresora 3D (FDM, SLS, SLM SLA u otras impresoras), ya que las aberturas para suministrar el tejido pueden ser diferentes. La diferencia puede deberse a la posición, el número y el diámetro.

La placa de presión (27) hecha de un polímero biocompatible tiene las aberturas de conexión para la entrada y salida del medio (21), desde las cuales se extiende un sistema de conductos individualmente para el tejido dentro de la placa y se abre en varias aberturas para suministrar el tejido en la superficie. Las aberturas pueden estar colocadas de forma diferente y tener también diámetros diferentes. A continuación, estas aberturas se conectan a los vasos impresos para irrigar el tejido.

La placa de impresión se atornilla a la mesa de impresión (13), la mesa de impresión está hecha de un material magnético y tiene orificios en los que se insertan los conectores (21) para la entrada y salida del medio. La base de la mesa de impresión (25) se encuentra debajo de la placa de impresión, en la que se inserta el pasador del tornillo micrométrico y las conexiones (por ejemplo, conexiones luer) para la entrada y la salida (21) del medio. En una realización preferida, los conectores de entrada y salida de la parte superior de la base de la mesa de presión (25) están diseñados como espigas y encajan exactamente en los orificios de la mesa de presión. Una placa magnética se fija a la parte superior del pie de la mesa de impresión. La mesa de impresión y el pie de la mesa de impresión están conectados entre sí por la fuerza del imán, creando así una conexión desde las conexiones para la entrada y la salida hasta la placa de presión. El tejido impreso, la plancha de impresión y la mesa de impresión también pueden separarse fácilmente de los demás componentes instalados de forma permanente mediante la conexión magnética y enchufarse a otra unidad de suministro.

Utilizando el pasador del tornillo micrométrico (22) y el motor paso a paso (23), la mesa de impresión y la placa de impresión pueden ser bajadas al área de impresión (espacio por encima del tapete de silicona). La cámara de impresión consta de una placa base (28) y una pared (29) de acero inoxidable, por ejemplo, y forma así un espacio que puede llenarse con medio a través de conductos de suministro. El tejido impreso se baja en este medio para nutrirlo y protegerlo de la desecación. Al bajar las zonas impresas, el nivel de impresión se mantiene a una altura constante. Un rebosadero evita el desbordamiento debido al desplazamiento del medio.

En una realización particular, una alfombrilla de silicona (210) está situada por encima del pie de la mesa de impresión (25) para el sellado.

Esto se sujeta sobre la base de la mesa de impresión (25), por lo que los pasadores para la entrada y la salida permanecen libres y se extienden sobre el borde de la placa base de la cámara de impresión. Atornillando la pared de la cámara de impresión (29) sobre la placa base de la cámara de impresión (28), la cámara de impresión queda sellada y la parte inferior de la base de la mesa de impresión se separa de la cámara de impresión con el pasador del tornillo micrométrico. Debido a la gran flexibilidad del tapete de silicona y el movimiento hacia abajo de la mesa de impresión sigue siendo posible sin problemas.

En otra realización, se instala una junta entre el pasador del tornillo micrométrico (22) y la placa base de la cámara de presión (28) para sellar la cámara de presión en lugar del tapete de silicona (por ejemplo, junta de anillo deslizante).

En otras realizaciones, pueden utilizarse otras construcciones para sellar la cámara de presión.

Figura 8:

Figura 8: Ejemplo de estructura y modo de funcionamiento de la unidad de alimentación del cabezal de impresión:

En la novedosa unidad de suministro de cabezales de impresión aquí descrita, las células cultivadas se bombean desde el depósito de células (82) a través de una bomba (84) al concentrador de células (86), en el que se aumenta la concentración de células y se descarga el exceso de medio (89). A través de un contador de células (88), una concentración de células definida pasa a una unidad de mezcla (87), en la que también se introduce el concentrado de tinta. El concentrado de tinta se transporta desde el depósito (1) a través de una bomba con unidad de medición (85) en un volumen definido a la unidad de mezcla (87). En esta unidad de mezcla (87) se mezcla la tinta para los cabezales de impresión según las especificaciones del programa de impresión y la alimenta a través de un contador de células de control al tubo que conduce al cabezal de impresión piezoeléctrico (811).

El número de unidades de suministro de cabezales de impresión depende del número de biotintas necesarias y puede variar.

Por un lado, la unidad de suministro del cabezal de impresión está controlada por el algoritmo de la impresora para proporcionar la composición de las tintas, por otro lado dispone de una serie de sensores que proporcionan al algoritmo de la impresora información sobre las propiedades de las tintas actualmente mezcladas a las que reacciona el algoritmo.

5 Figuras 9 y 10

Figura 9 y 10: Diseños preferidos del concentrador de células (86) para concentrar las células por decantador

10 Como concentradores celulares (86) para concentrar las células se utilizan preferentemente los siguientes procedimientos, que se caracterizan por un funcionamiento permanente. La concentración de las células se consigue reduciendo de la fase líquida, el medio. Las fases sólida y líquida pueden separarse por fuerza centrífuga o por propiedades del filtro.

15 En estos diseños, se utiliza una centrifugadora de flujo continuo o un decantador para concentrar las células. Ambos sistemas funcionan según el mismo principio utilizando la fuerza centrífuga.

20 En una centrifugadora, las fases sólida y líquida se separan mediante aceleración centrífuga. En la cuba giratoria de la centrifugadora, las partículas sólidas, que tienen una densidad mayor y son por tanto más pesadas que el líquido, se desplazan hacia el exterior por medio de la fuerza centrífuga. Forman un sedimento en la pared interior de la cuba de la centrifugadora.

25 El recipiente decantador tiene forma cilíndrico-cónica y gira a una velocidad adaptada a la tarea de separación correspondiente. El producto alcanza su velocidad circunferencial máxima en el recipiente y forma un anillo cilíndrico en la carcasa del recipiente de la centrífuga. Debido a su mayor densidad, los sólidos contenidos en el producto se depositan en la pared interior de la cuba bajo la influencia de la fuerza centrífuga. La longitud del cilindro y el ángulo del cono de la parte cónica de la cuba pueden adaptarse a la velocidad de separación respectiva durante la fabricación del decantador.

30 Figuras 11 y 12

Figura 11 y 12: Diseños preferidos del concentrador de células (86) para concentrar las células por filtración dinámica

35 En la microfiltración de flujo cruzado, el medio con las células fluye sobre la membrana filtrante durante el proceso de filtración de manera que dos direcciones principales de flujo son ortogonales entre sí. Las direcciones de flujo principales son el flujo de filtración a través de la membrana de filtración y el desbordamiento paralelo a la membrana de filtración. La estructura de la torta de filtración durante el proceso de filtración se contrarresta con el desbordamiento de la suspensión, de modo que el concentrado celular puede salir. La eficacia de la propiedad filtrante es variable debido al número de poros y al tamaño de los poros de la membrana filtrante. Las fibras huecas (membranas capilares o también conocidas como filamentos huecos) son especialmente adecuadas para este fin y su rendimiento se ve reforzado por el efecto pellizco. Una fibra hueca estándar tiene un diámetro interno de aproximadamente 1,5 mm (3,0 mm a 0,1 µm posible) y un tamaño de poro de 200 a 5 nm (2000 nm a 1,0 nm posible). Dependiendo de la aplicación, se combinan de cientos a miles de capilares en módulos y coladas (módulos de fibra hueca). Con ayuda de una bomba de circulación, el producto sin filtrar circula por los capilares hasta que los sólidos en suspensión del retentado están tan concentrados que es necesario vaciarlos y limpiarlos. (Ripperger 1992), (Melin & Rautenbach 2007).

Figura 13

50 factores selectivos - grupos protectores fotolábiles para grupos tiol a las longitudes de onda de 325 nm, 400 nm y 436 nm (Fuente: Wavelength-selective cleavable photolabile protecting groups for thiols, Nico Kotzur, 2009)

Figura 14

55 Células con factor selectivo. Las células de color claro muestran células endoteliales, las oscuras células musculares. Ambos tipos de células están presentes como una mezcla en una gota de tinta capilar y pueden ser activadas selectivamente por 2 rayos láser con diferentes longitudes de onda para la reacción de reticulación.

60 Figura 15

Figura 15: Estructura de un módulo de tejido:

65 El bloque de construcción básico del tejido u órgano es el módulo cúbico simple (151) (Figura 15a) con una longitud lateral definida. Para abastecer el tejido, que puede estar formado por uno o varios tipos de células y,

por lo tanto, también puede formar un tejido funcional como un órgano, se abastece por un lado mediante un vaso ascendente (152), que posteriormente forma la arteria. El vaso descendente (153) del lado opuesto forma la vena. Los vasos más pequeños (154) se ramifican a partir de los vasos en forma de abanico y se extienden hasta el nivel del vaso opuesto de la vasija del otro lado y corren paralelas entre sí (Figura 15b). Los vasos más pequeños (154) están conectados entre sí por vasos puente (156), que más tarde forman los capilares y cierran la "circulación sanguínea" y forman una microcirculación (Figura 15c y 15d).

La microcirculación representa la unidad de suministro más pequeña del tejido impreso. Aquí, el medio se canaliza hacia un pequeño vaso (154) a través del vaso ascendente (arteria) (152), que desemboca en la rama ascendente. El medio fluye desde el vaso menor a través de los vasos puente (156) hacia un vaso menor (154) situado más abajo, que pertenece a la rama descendente y desemboca en el vaso descendente (153).

Dado que al imprimir los vasos con la tinta capilar se imprimen muchas células por gota y sólo las células de los bordes son capaces de reticularse con el tejido circundante, es necesario eliminar las células sobrantes. Para ello y para alimentar las células impresas, cada microcircuito se enjuaga con medio durante un breve espacio de tiempo tras su finalización. Durante cada proceso de enjuague, los microcircuitos situados por debajo del último microcircuito también se enjuagan y se suministran las células. El flujo de medio expulsa las células no reticuladas. Los recipientes horizontales no son ideales para este proceso, por lo que los recipientes impresos están inclinados entre 10 a 90 grados con respecto a la placa de la impresora.

Los vasos ascendentes y descendentes (152 y 153) se elevan en un ángulo de 90°. Los compartimentos de los recipientes (155) pueden ascender en un ángulo de 10 - 90°. La impresión es ascendente hasta el centro del módulo individual, luego descendente de manera que los vasos más pequeños siempre corren ascendentes hacia la placa de impresión. Esto permite enjuagar fácilmente el exceso de células en los vasos impresos inacabados. Cuando se cierra un microcircuito el medio drena por el vaso descendente (Figura y 15f).

Los compartimentos vasculares se imprimen a una distancia definida, y los compartimentos vasculares de los vasos ascendentes y descendentes discurren alternativamente uno debajo del otro. Un abanico vascular del vaso ascendente (152) y uno del vaso descendente (153) se conectan entre sí mediante vasos puente (156) y forman el microcircuito (Figura 15d). Este proceso se repite hasta llenar el módulo individual. Para imprimir un tejido o un órgano, se imprime un módulo de tejido (158) que consta de varios módulos individuales. Los módulos individuales se imprimen uno al lado del otro en la placa de la impresora, desplazados en su orientación (Figura 15g), de modo que se crea un módulo de tejido de longitud lateral y grosor definidos. Los módulos de órganos pueden imprimirse en paralelo en diferentes impresoras y unirse mediante un adhesivo (por ejemplo, cola de fibrina) para formar unidades de tejido u órganos más grandes (Figura 15e).

Para conectar los módulos de tejido al circuito del cuerpo, se imprimirán preferentemente un módulo de conexión de tejido (158) (Figura 15g) y un módulo de conexión de tejido (Figura 15h).

El módulo de cierre tisular (158) consiste en un módulo tisular en el que los vasos ascendentes y descendentes de los módulos individuales se estrechan hacia arriba y, por tanto, se cierran y sellan con varias capas celulares (1510).

El módulo de conexión debe fusionar preferiblemente los vasos individuales de los módulos individuales en vasos más grandes, teniendo en cuenta los requisitos anatómicos y quirúrgicos. Los vasos de alimentación y drenaje discurren a diferentes niveles hacia los vasos de conexión. Los vasos ascendentes y descendentes se conectan de nuevo mediante vasos puente para abastecer el tejido.

Figura 16

Figura 16: Lavado de los capilares resultantes con medio:

El proceso de impresión se programa de tal manera que, en ciclos recurrentes tras alcanzar cierta altura del tejido, se inicia un breve proceso de aclarado para eliminar las células sobrantes y no reticuladas. Este proceso de aclarado puede adoptar diversas formas. Preferentemente, la rama ascendente se enjuaga una vez después de un número definido de procesos de presurización y, a continuación, la rama descendente se enjuaga después de otro número definido de procesos de presurización. Siempre alternando hasta que el módulo de tejido haya terminado de imprimir. El proceso de enjuague alternado permite enjuagar los recipientes de entrada y de salida sin que se desborden de carga.

Figura 17

Figura 17: Hígado - módulo de órganos:

Módulos individuales utilizando el hígado como ejemplo:

El hígado está formado por aproximadamente 1 - 1,5 millones de lóbulos hepáticos con un diámetro de 1-2 mm. En el hígado desembocan dos vasos: la arteria hepática, que suministra oxígeno y nutrientes al tejido, y la vena porta, que transporta la sangre desde el estómago y los intestinos con los nutrientes y toxinas absorbidos. Del hígado salen las venas que se fusionan para formar la vena cava y el conducto biliar.

El módulo único se forma aquí a partir de los lóbulos hepáticos hexagonales individuales (171) (Figura 17a) con un diámetro de 2 mm. Los lóbulos hepáticos están dispuestos uno al lado del otro en 5 filas y tienen cada uno 5 filas de altura (Figura 17c). La disposición de los lóbulos hepáticos en las filas, compensada por medio lóbulo hepático cada dos filas, permite entrelazarlos en la formación de módulos de órganos.

Los lóbulos hepáticos hexagonales individuales tienen 3 vasos en cada esquina (arteria (172), vena porta (174), conducto biliar) y la vena (175) en el centro. Los 4 vasos forman de nuevo una microcirculación (Figura 17b).

El lóbulo hepático está subdividido en 6 segmentos (176) en cada uno de los vasos angulares, que están separados por el microcirculación y forman un abanico vascular (Figura 17d). Los dos vasos de alimentación, la arteria y la vena porta, discurren paralelos en la microcirculación hacia la vena. La vena viene hacia ellos desde el centro y discurre por debajo de los vasos alimentadores, por lo que los tres vasos forman un triángulo. La arteria y la vena porta se conectan de nuevo a la vena mediante puentes vasculares y forman una microcirculación. El conducto biliar está situado en el centro del triángulo del buque.

Figura 18

Superposición de módulos individuales de órganos hepáticos impresos:

Figura 19:

Figura 19: Ejemplo de montaje de una incubadora:

La incubadora de tejidos consiste en una bandeja llena de medio (191) con una tapa (192) que se coloca encima. Una base (193) está instalada permanentemente en la parte inferior de la bandeja, sobre la cual está montada de forma intercambiable una base de mesa de impresión idéntica (25). Las mangueras del medio (194) que van hacia y desde la base de la mesa de impresión se introducen a través de aberturas en el recipiente de la incubadora. La mesa de impresión, junto con la plancha de impresión, la película de impresión y el tejido impreso, se coloca sobre los pernos de la base de la mesa de impresión (sin membrana de silicona) mediante fuerza magnética.

Figuras 20 y 21:

Figura 20 y 21: Ejemplo de estructura de un cabezal de impresión direccional y no direccional

Fuente de radiación electromagnética.

Signo de referencia:

1	Unidad de alimentación del cabezal de impresión (1)	174	Vena porta
2	Unidad de alimentación del cabezal de impresión (3)	175	Vena
3	Unidad de alimentación del cabezal de impresión (4)	176	Segmento
4	Unidad de alimentación del cabezal de impresión (2)	191	Tanque medio
5	Unidad de alimentación del cabezal de impresión	192	Tapa
6	Vivienda	193	Pie
7	Unidad de control central de la impresora 3D	194	Entrada y salida del medio
8	Tanque medio	202	Fuente de radiación electromagnética no direccional
9	Manguera de alimentación del medio (2)	203	Fuente de radiación electromagnética direccional
10	Manguera de descarga media	213	Serie de boquillas piezoeléctricas

ES 2 989 141 T3

5	11	Residuos		
	12	Motor para la mesa de la impresora		
	13	Tabla de impresoras		
	14	Cámara de presión media llena		
	15	Impresora piezoeléctrica		
10	21	Entrada y salida del medio		
	22	Tornillo micrométrico		
	23	Motor paso a paso		
15	24	Disco magnético		
	25	Pie de mesa para impresora		
	27	Placa de presión		
20	28	Placa base para cámara de presión		
	29	Pared de la cámara de presión (marco)		
	210	Alfombrilla de silicona		
25	81	Contenedor para tinta concentrada		
	82	Depósito celular		
	83	Vivienda		
30	84	Bomba		
	85	Bomba (1)		
	86	Concentrador celular		
35	87	Unidad de mezcla		
	88	Contador celular (1)		
	89	Manguera de drenaje Medio		
40	810	Contador de células		
	811	Cabezal de impresión piezoeléctrico		
	812	Suministro de tinta		
45	151	Módulo individual cúbico		
	152	vaso ascendente		
	153	vaso descendente		
50	154	buque pequeño		
	155	Compartimentos del buque		
	156	Buques puente		
55	158	Módulo de terminación de tejido		
	1510	Capas celulares		
	171	Lóbulos hepáticos		
60	172	Arteria		

REIVINDICACIONES

1. Proceso de impresión en 3D para la producción de tejidos y órganos con estructuras vasculares mediante

- 5 (a) una impresora de gotas (15) para impresiones fotorrealistas de alta resolución y
 (b) un dispositivo para aplicar ondas electromagnéticas (202, 203) que comprende las etapas de:
- proporcionar al menos una tinta biológica y una tinta capilar que comprende células y moléculas de reticulación en la impresora de gotas (15)
 - 10 - aplicar al menos una gota de la biotinta y la tinta capilar a un plano de reacción (13)
 - poner en contacto las ondas electromagnéticas con las moléculas de reticulación de estas gotas en el plano de reacción (13)
 - y activar las moléculas de reticulación mediante movimientos no dirigidos o dirigidos de las ondas electromagnéticas en las gotas, de manera que se forman estructuras reticuladas y se obtienen por lo
 - 15 tanto estructuras vasculares.

caracterizado porque las tintas capilares sólo reticulan o reaccionan formando capas en la región del borde de la gota y en donde se eliminan los componentes no reticulados o no unidos.

20 2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque el tamaño de la gota oscila entre 1 fl (femtolitro) y 1 µl (microlitro).

25 3. Proceso según las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque las reacciones de reticulación o de formación de capas en la región del borde de las gotas capilares son causadas por componentes de las tintas o por la influencia de ondas electromagnéticas.

30 4. Proceso según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las reacciones en la región del borde de las tintas capilares son causadas por:

- reacciones tiol-eno
- cicloadiciones
- 35 - aperturas de anillos nucleófilos
- autoensamblaje de moléculas y partículas
- factores selectivos sobre las células de las tintas capilares y/o las biotintas.

40 5. Proceso según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la al menos una biotinta comprende moléculas que soportan la fisiología del tejido u órgano impreso.

45 6. Proceso según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la al menos una biotinta contiene factores de crecimiento, factores de transcripción, moléculas de señalización, moléculas marcadoras y/o moléculas diana para posteriores reacciones de llave-cerradura.

50 7. Proceso según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque las estructuras vasculares impresas se perfunden con medio nutritivo o sangre durante la impresión.

55 8. Proceso según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el plano de reacción se coloca en un biorreactor, que se conecta en particular durante o después de la finalización de la impresión a un circuito sanguíneo

60 9. Proceso según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el dispositivo para aplicar las ondas electromagnéticas (202, 203) es una lámpara UV, un diodo, una pantalla o un dispositivo de rayo láser.

65 10. Una unidad de control (7) para controlar las unidades de suministro de cabezales de impresión (1, 2, 3, 4, 5), un motor (12) para una mesa de impresión (13), un dispositivo para aplicar ondas electromagnéticas (202, 203) y una impresora de gotas (15) para impresiones fotorrealistas de alta resolución y, opcionalmente, diferentes impresoras de acuerdo con un patrón de impresión para la impresión en 3D de tejidos y órganos que tienen estructuras vasculares, caracterizado porque en el patrón de impresión están

presentes las siguientes propiedades:

- Capa de tejido del patrón impreso que consiste en diferentes tipos de tintas caracterizada porque son imprimibles mediante la impresora de gotas (15) para impresiones fotorrealistas de alta resolución y reticulado mediante el dispositivo para aplicar ondas electromagnéticas (202, 203), en la que algunos de los diferentes tipos de tinta sufren reticulación o polimerización sólo en la región del borde de una gota adyacente a otros tipos de gotas
- Capa de tejido que consiste en diferentes tipos de células aplicadas ordenadamente, que son vasos cortados, huecos internamente (152, 153, 154), incluidas venas, arterias y capilares
- Subdivisión de tejidos u órganos más grandes en módulos individuales (151) y simplificación de la imagen de impresión para un proceso de impresión económico.
- Impresión de los módulos individuales (151) independientemente unos de otros en la misma impresora de gotas (15) o en diferentes impresoras de gotas (15) y posterior unión de los módulos individuales (151) a la estructura deseada del tejido o de un órgano
- Módulos individuales (151) con al menos una rama ascendente (152) y una descendente (153) para el suministro y drenaje del medio, así como capilares interpuestos en forma de abanico, que forman una microcirculación que forma la unidad vascular más pequeña
- Combinación de los microcircuitos en vasos principales para la entrada y salida del medio cuando se construyen estructuras mayores a partir de módulos individuales (151)
- Estabilización del tejido impreso mediante el uso de una película de impresión biodegradable o reabsorbible que bordea ambos lados de la impresión en la dirección Z y tiene las conexiones secundarias o principales para los vasos.

11. Unidad de control (7) según la reivindicación anterior, que comprende un algoritmo específico para calcular el patrón de impresión y organizar un proceso de impresión caracterizado porque el cálculo del patrón de impresión se lleva a cabo en relación con el tipo de célula utilizado y en relación con una distancia y un tamaño de los capilares y las estructuras arteriales y venosas y porque, se simplifican por un lado, un suministro capilar óptimo y, por otro, las condiciones anatómicas de la estructura del tejido respectivo en un patrón de presión común, modular y económicamente estructurado, y

- que el algoritmo descompone las estructuras objetivo más grandes en módulos individuales más pequeños (151), que pueden imprimirse independientemente unos de otros, y que
- el algoritmo proporciona la información de archivo para imprimir en 3D una placa de impresión (27) y la lámina de impresión y hace que éstas sean exportables desde el programa informático para otras impresoras 3D, y que
- el algoritmo recibe y procesa la siguiente información para organizar el proceso de impresión:
- información sobre datos anatómicos y fisiológicos, así como las dimensiones de los tejidos y órganos que se van a imprimir,
- información procedente de las unidades de suministro del cabezal de impresión (1, 2, 3, 4, 5) sobre los niveles de llenado de los depósitos (8, 82) y los niveles de llenado de los depósitos (8, 82, 191), una concentración de células en un reactor y en un concentrador de células (86) y a su salida, los volúmenes mezclados en un mezclador (87), así como información sobre los procesos en el cabezal de impresión (811),
- información sobre la posición de la mesa de impresión (13), un nivel de llenado de medio en la cámara de impresión (14), un flujo de volumen de medio por unidad de tiempo en las líneas de suministro y descarga en el área de la mesa de impresión, sobre una dirección de ejecución del volumen del caudal medio,
- información sobre las dimensiones actuales del tejido impreso,
- información sobre la potencia actual del motor de una mesa de impresión (12), y que el algoritmo proporciona información sobre la actividad de una fuente de ondas electromagnéticas (202, 203)
- y que el algoritmo envíe las siguientes señales a las áreas de impresión correspondientes:
- Señales a los componentes individuales de la unidad de suministro del cabezal de impresión (1, 2, 3, 4, 5) para mezclar los componentes de tinta necesarios
- Señales a las bombas (84, 85), que se utilizan para el transporte de volumen específico de las tintas al mezclador (87) y a los cabezales de impresión (811)
- Señales para organizar el suministro y la descarga del medio en el trayecto desde la base de la mesa de impresión (25) hasta los vasos de los tejidos, así como organizar un proceso de enjuague en los capilares
- Señales para el movimiento necesario de la mesa de impresión (13)
- Señales a los cabezales de impresión (811) para el control selectivo de las boquillas de impresión (213) y para el movimiento de un carro de cabezales de impresión
- Señales al dispositivo para aplicar las ondas electromagnéticas (202, 203)
- Señales para pausas de impresión opcionales durante el enjuague capilar.

12. Impresora 3D que comprende una unidad de control según la reivindicación 11 y una unidad de suministro del cabezal de impresión para la impresión 3D de tejidos y órganos que tienen órganos con estructuras

vasculares, caracterizada porque la unidad de suministro del cabezal de impresión está formada por los siguientes componentes:

- un concentrador de células en el que las células cultivadas del depósito de células se concentran hasta una concentración de células específica
- un depósito de concentrado de tinta
- una unidad de mezcla con contador de células, en la que el número requerido de células por volumen y la concentración de tinta requerida se mezclan y se envían al cabezal de impresión,
- en el que el número de unidades de suministro de cabezales de impresión depende del número de tintas necesarias y puede variar, y
- la unidad de suministro del cabezal de impresión está controlada por el algoritmo de la impresora para mezclar una composición de tinta requerida, por un lado, y, por otro, tiene una serie de sensores que proporcionan al algoritmo de la impresora información sobre las características de las tintas actualmente mezcladas a las que responde el algoritmo.

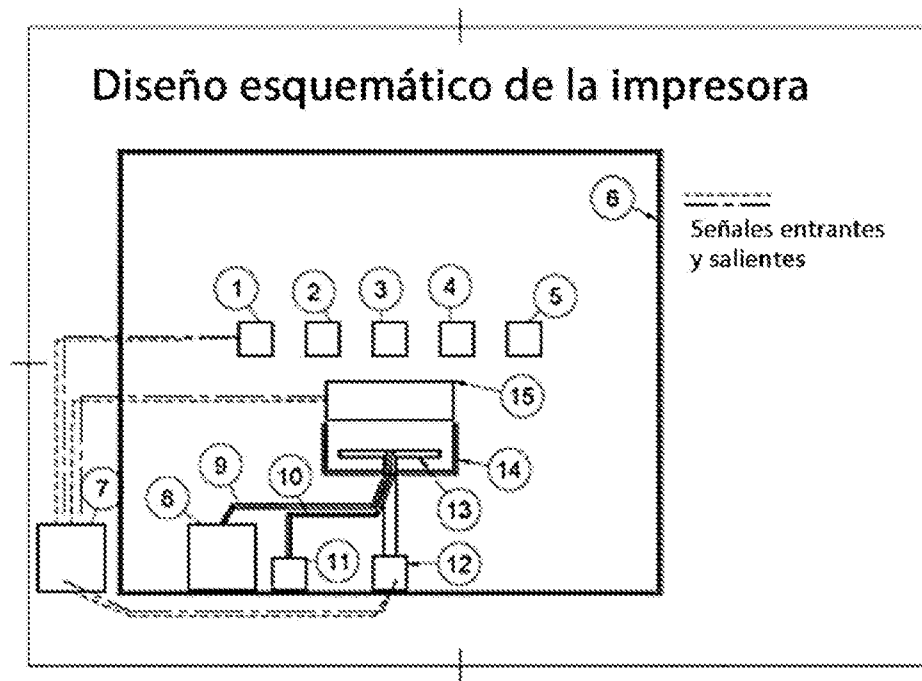


Figura 1

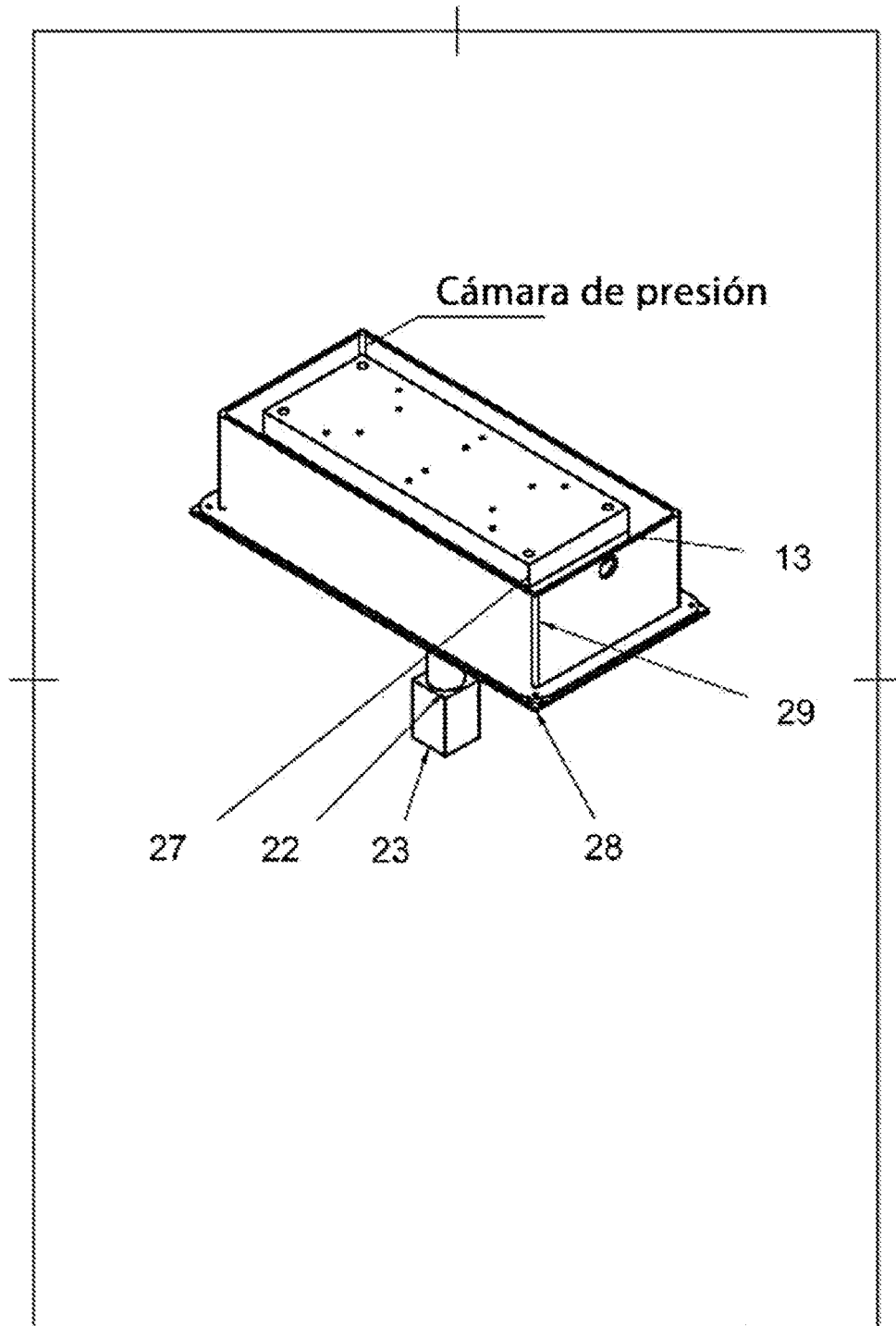


Figura 2

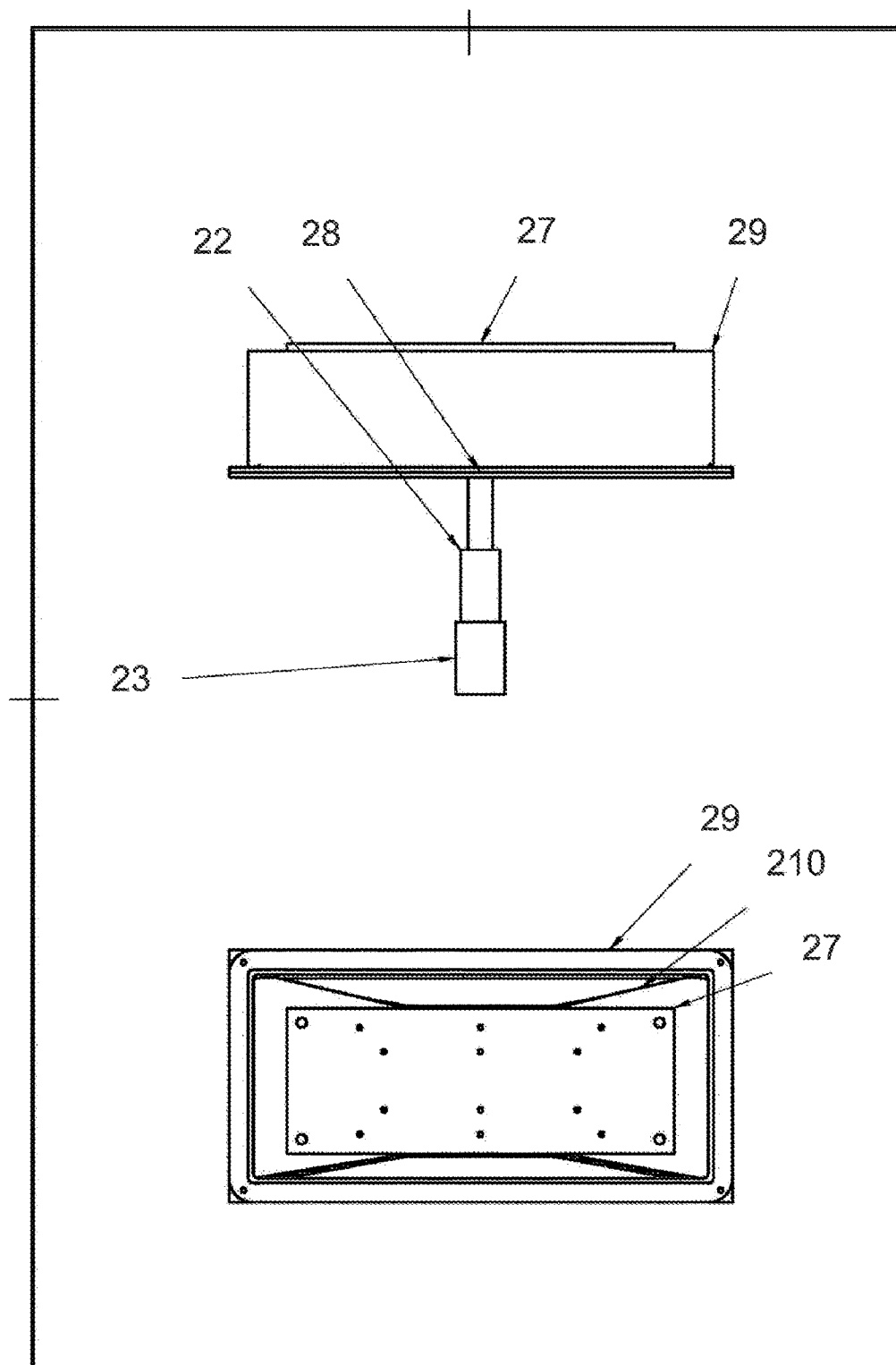


Figura 3

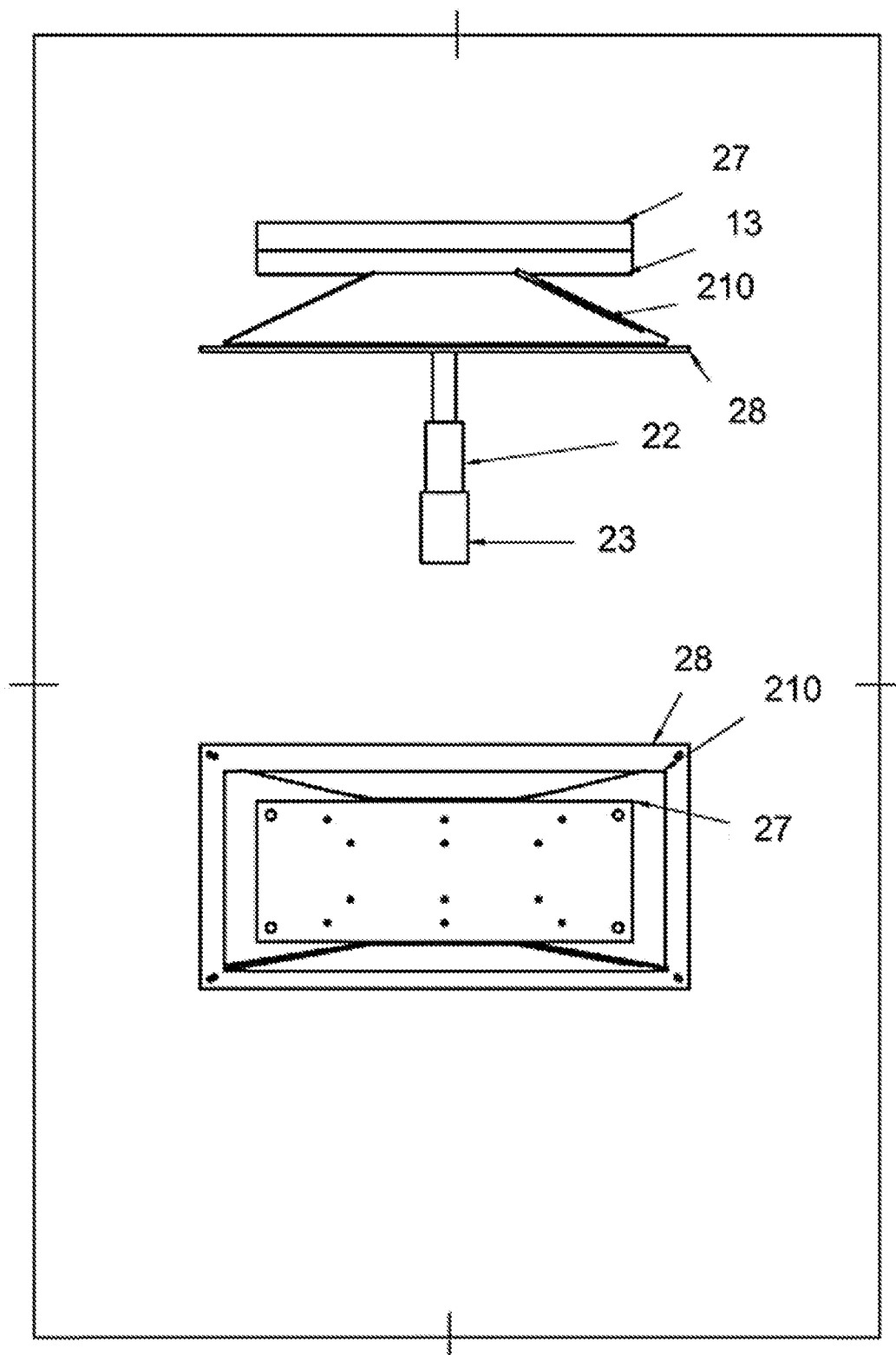


Figura 4

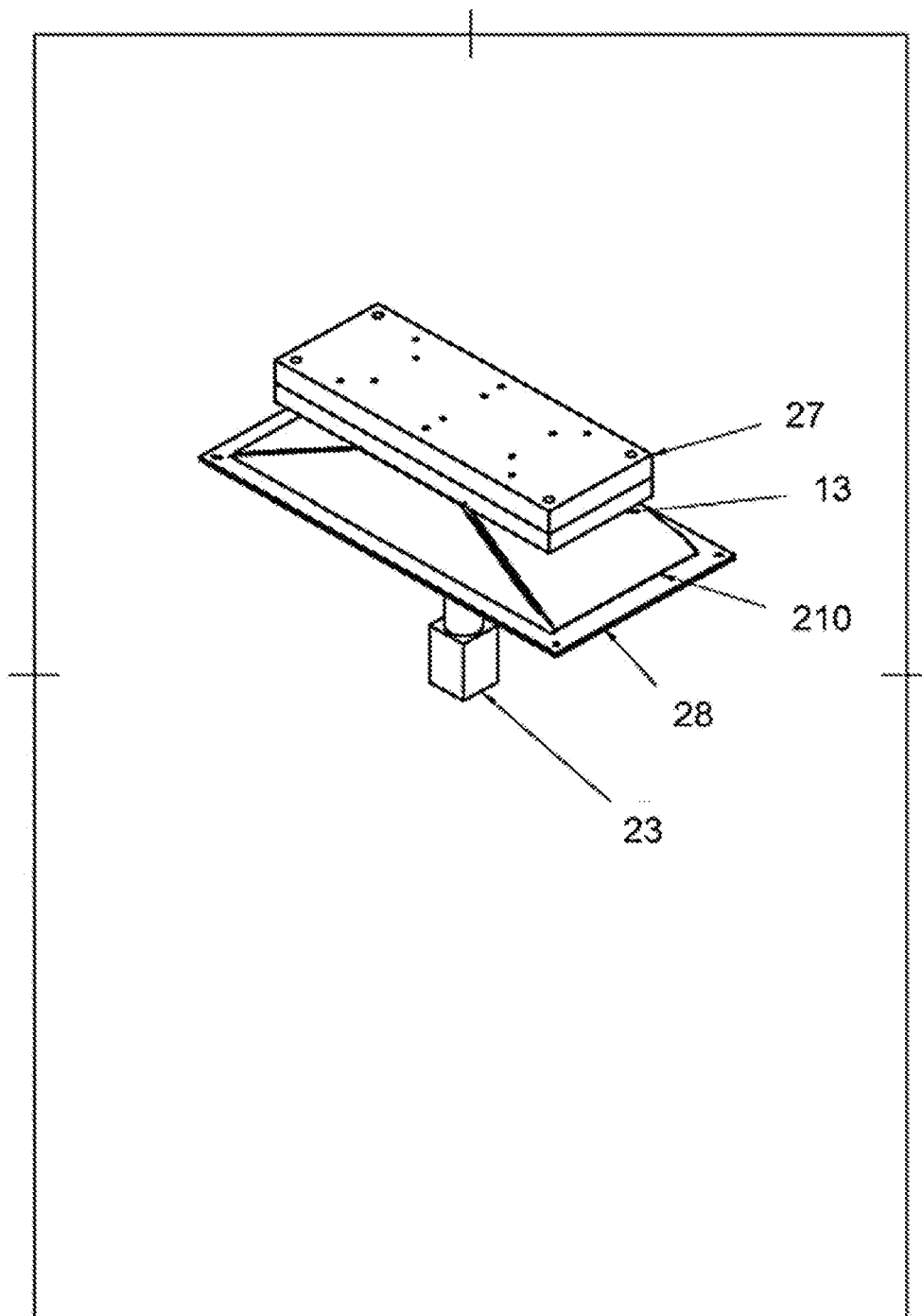


Figura 5

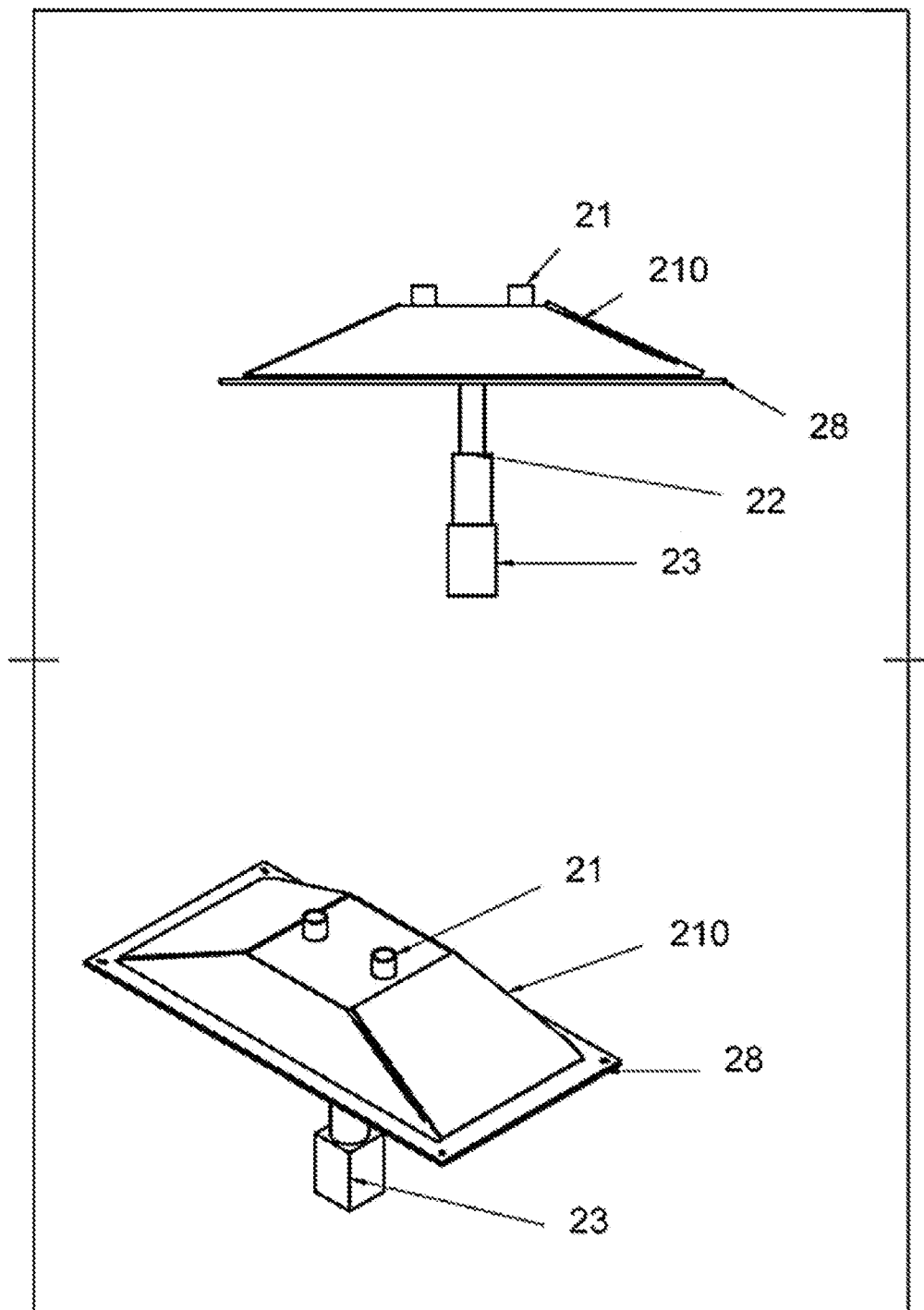
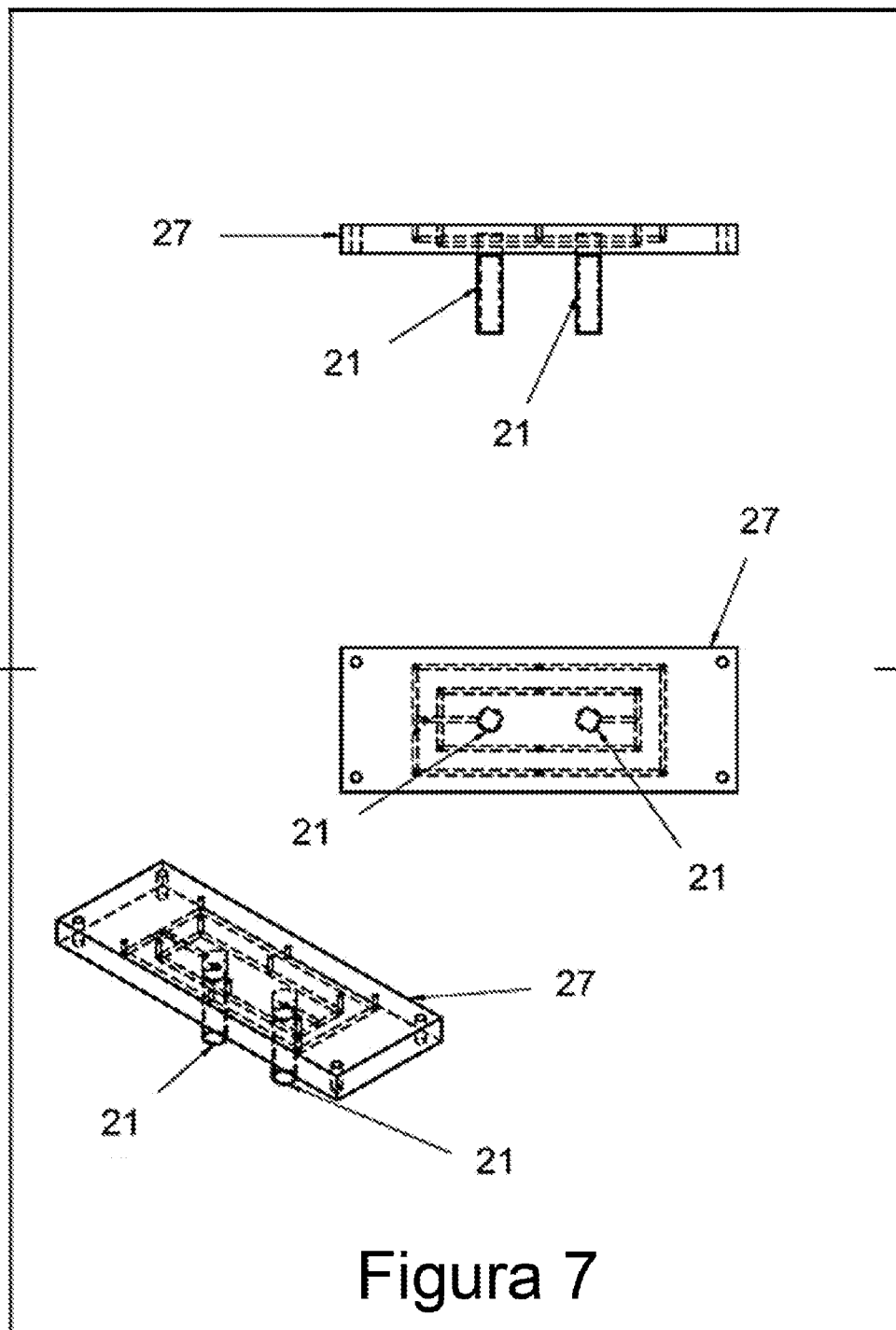


Figura 6



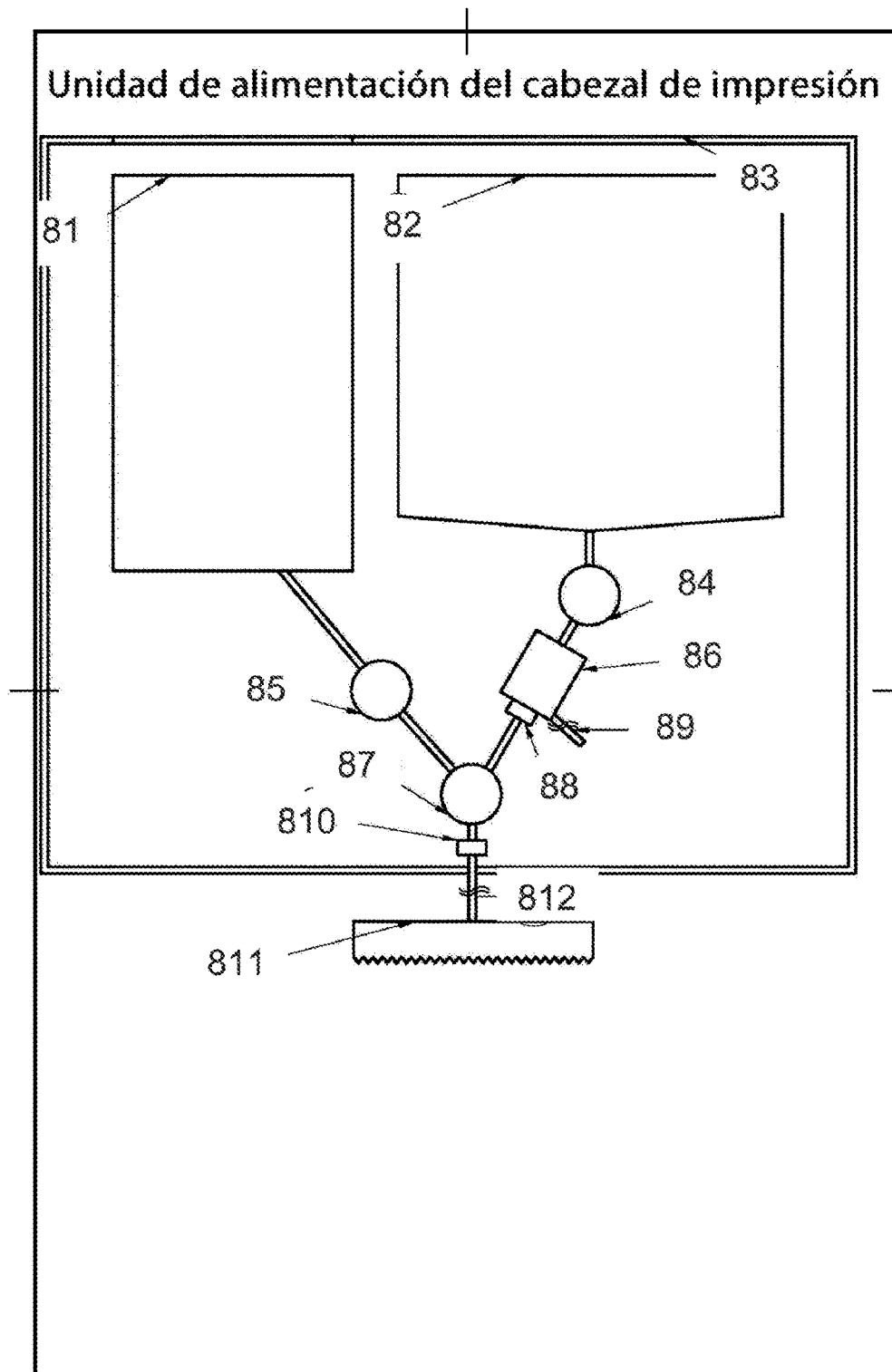


Figura 8

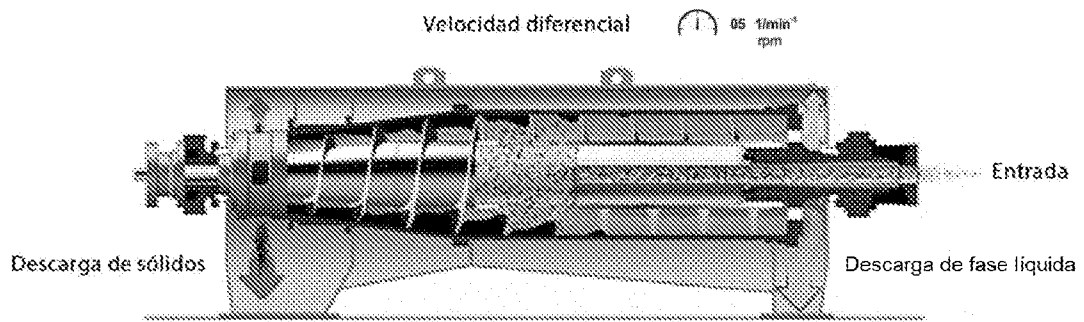


Figura 9

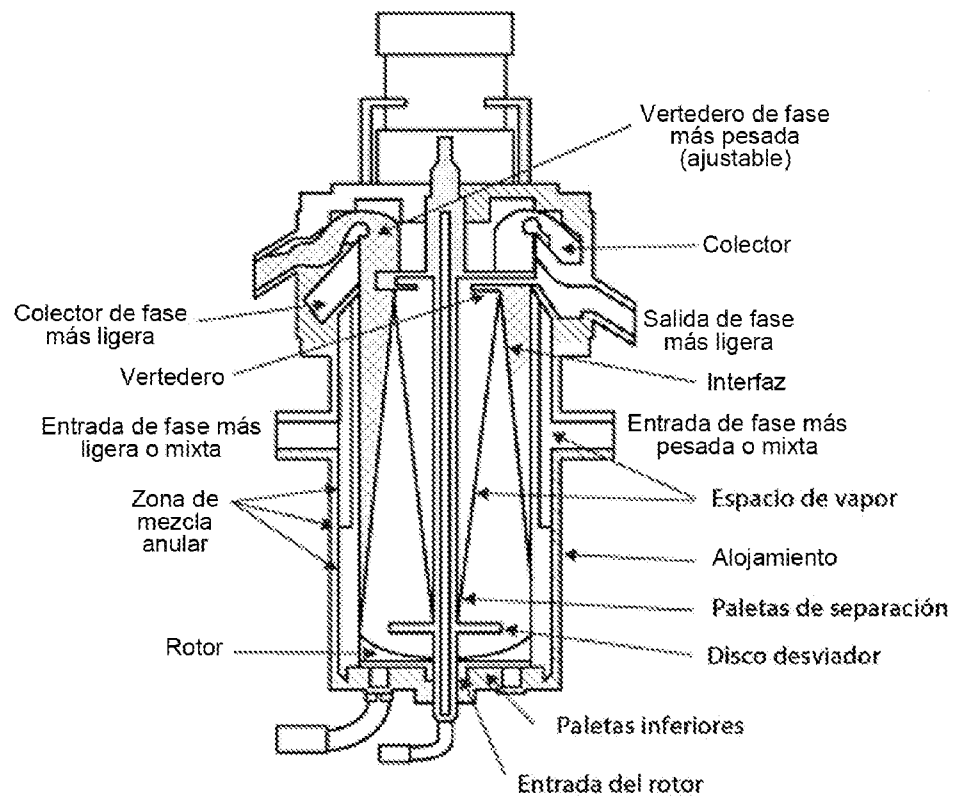


Figura 10

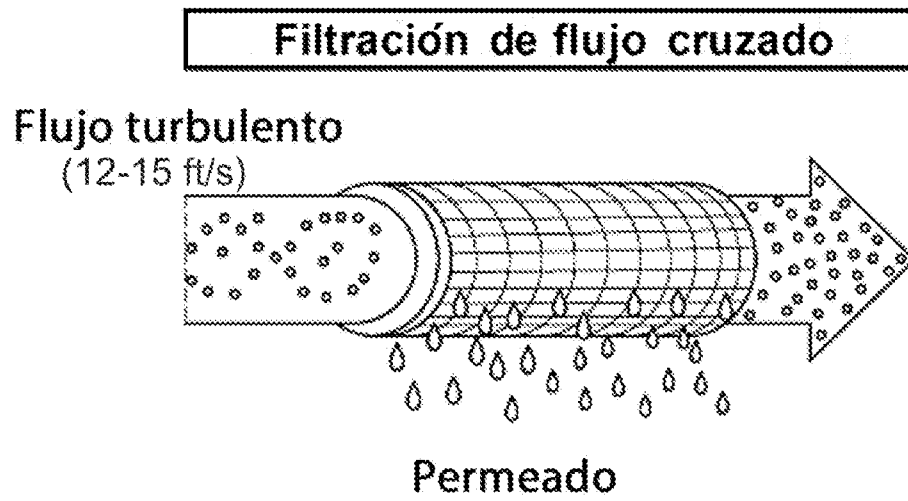


Figura 11

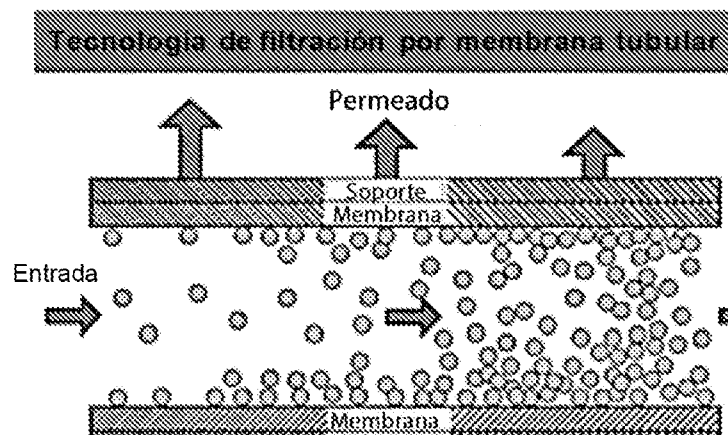


Figura 12

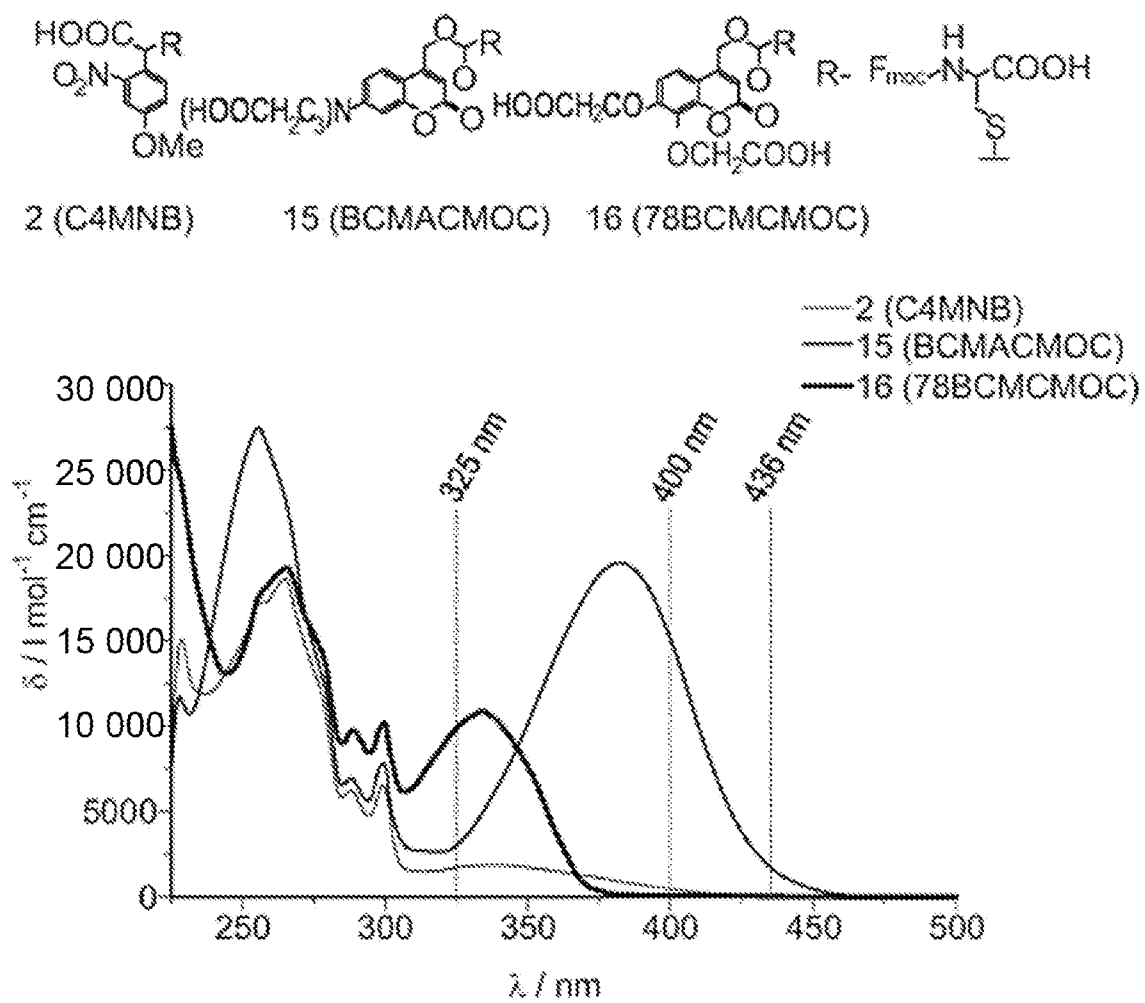


Figura 13

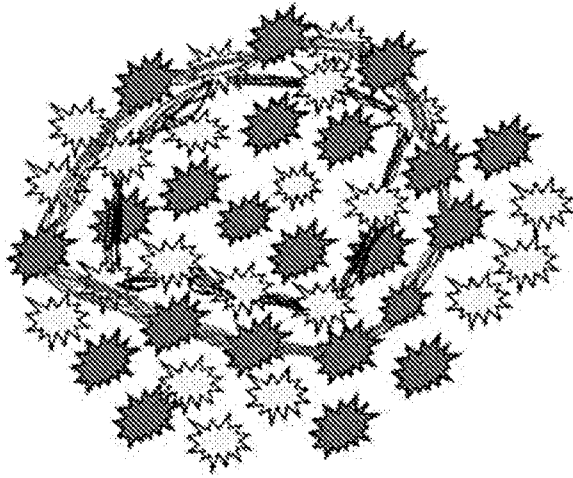


Figura 14

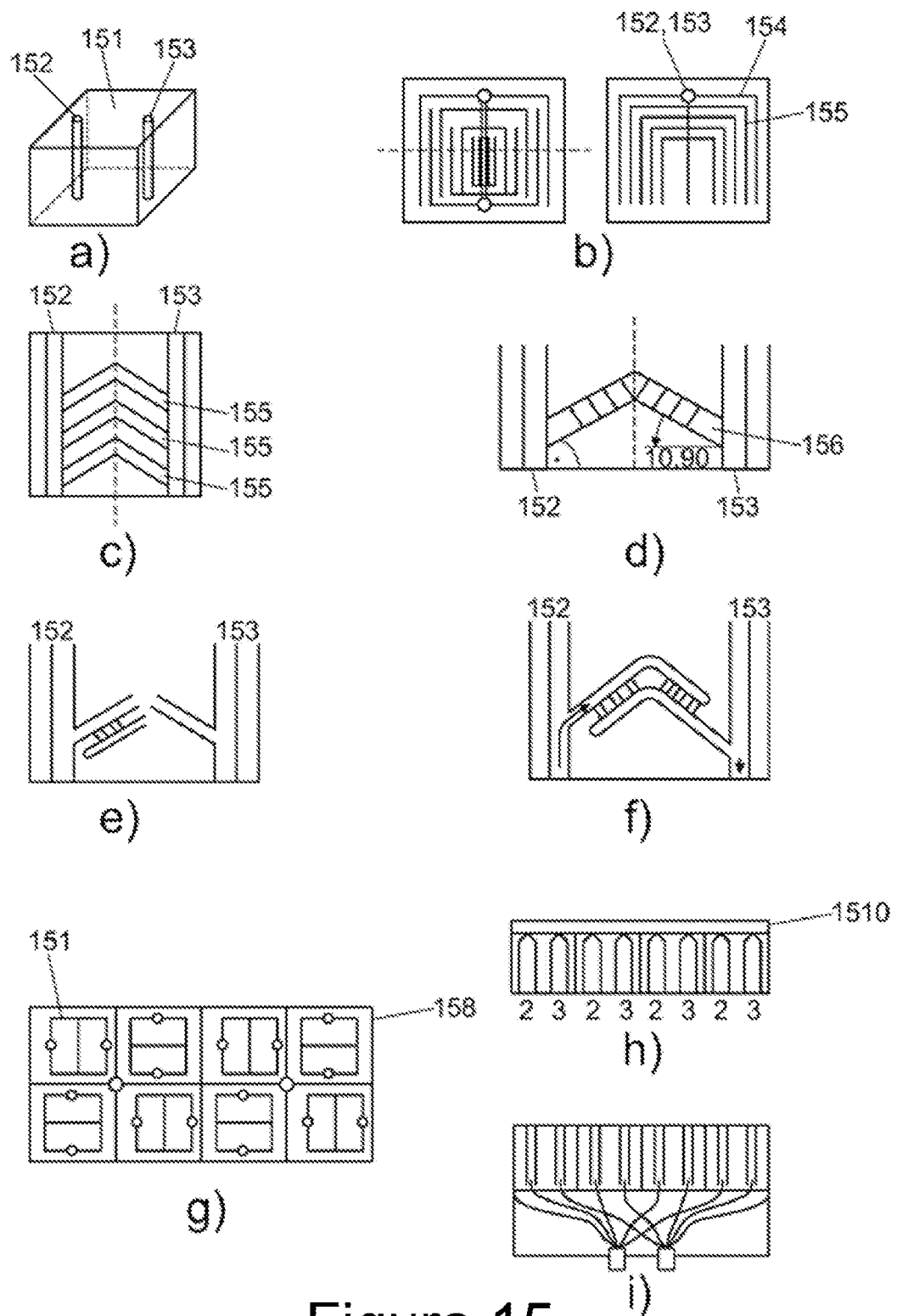


Figura 15

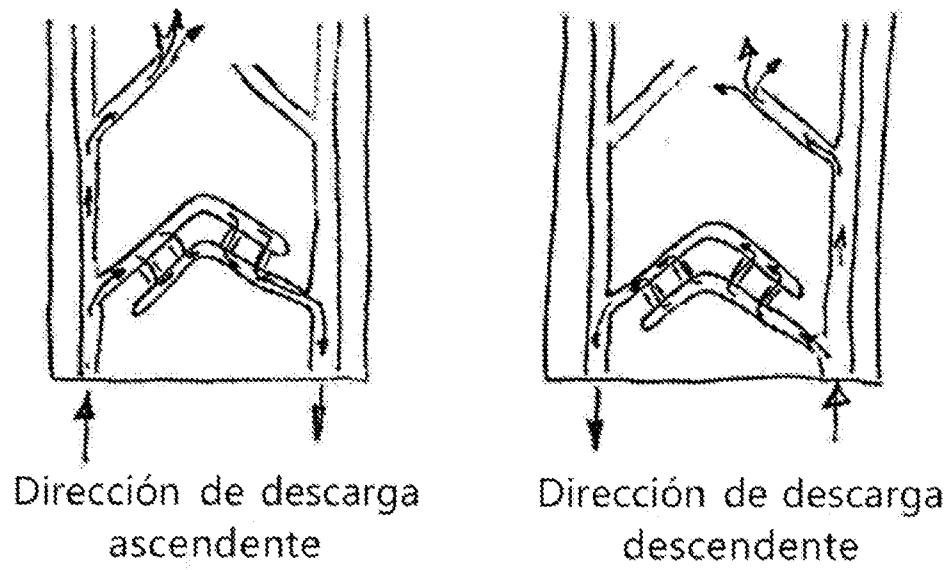


Figura 16

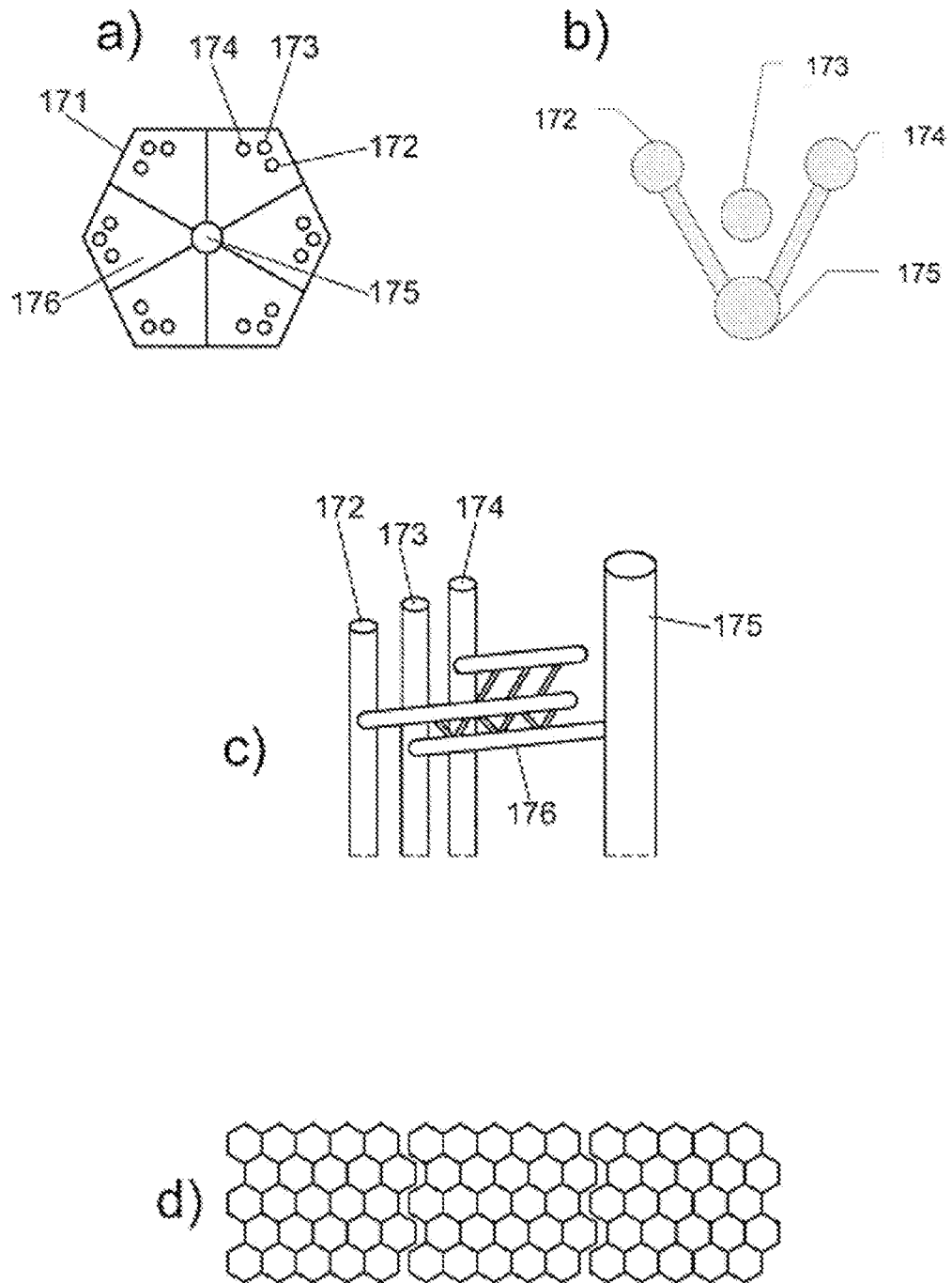


Figura 17

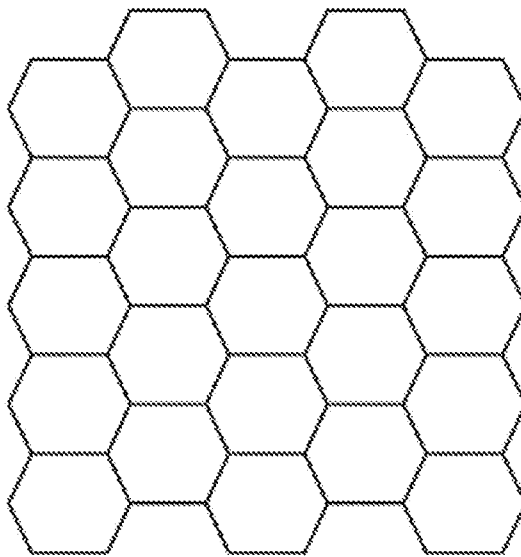
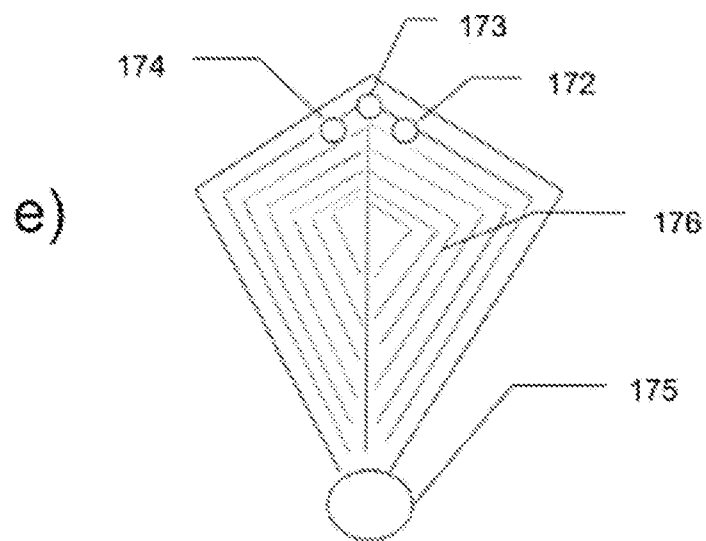


Figura 18

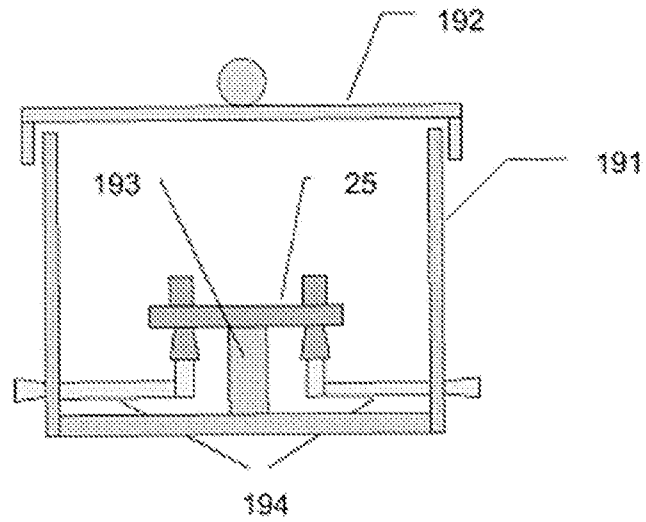


Figura 19

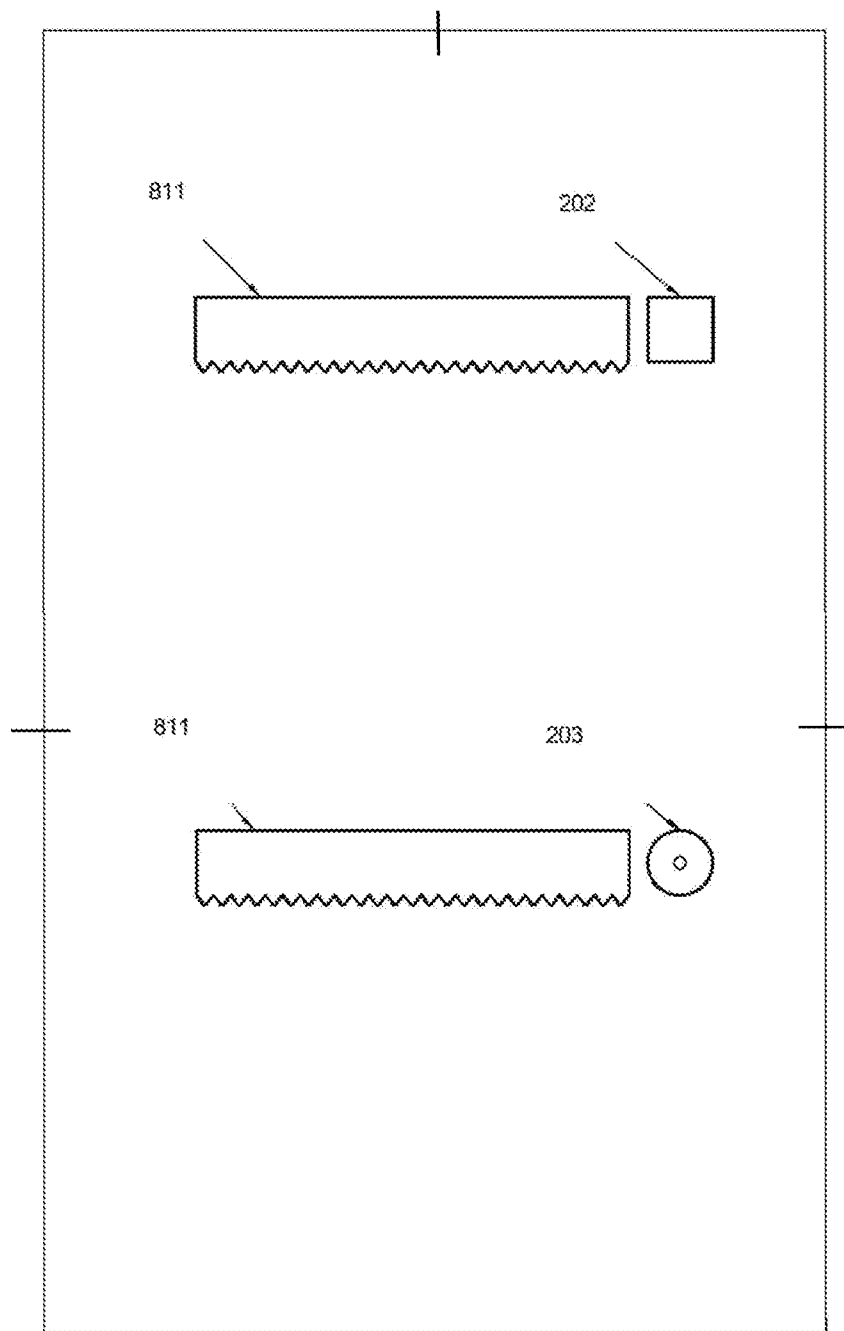


Figura 20

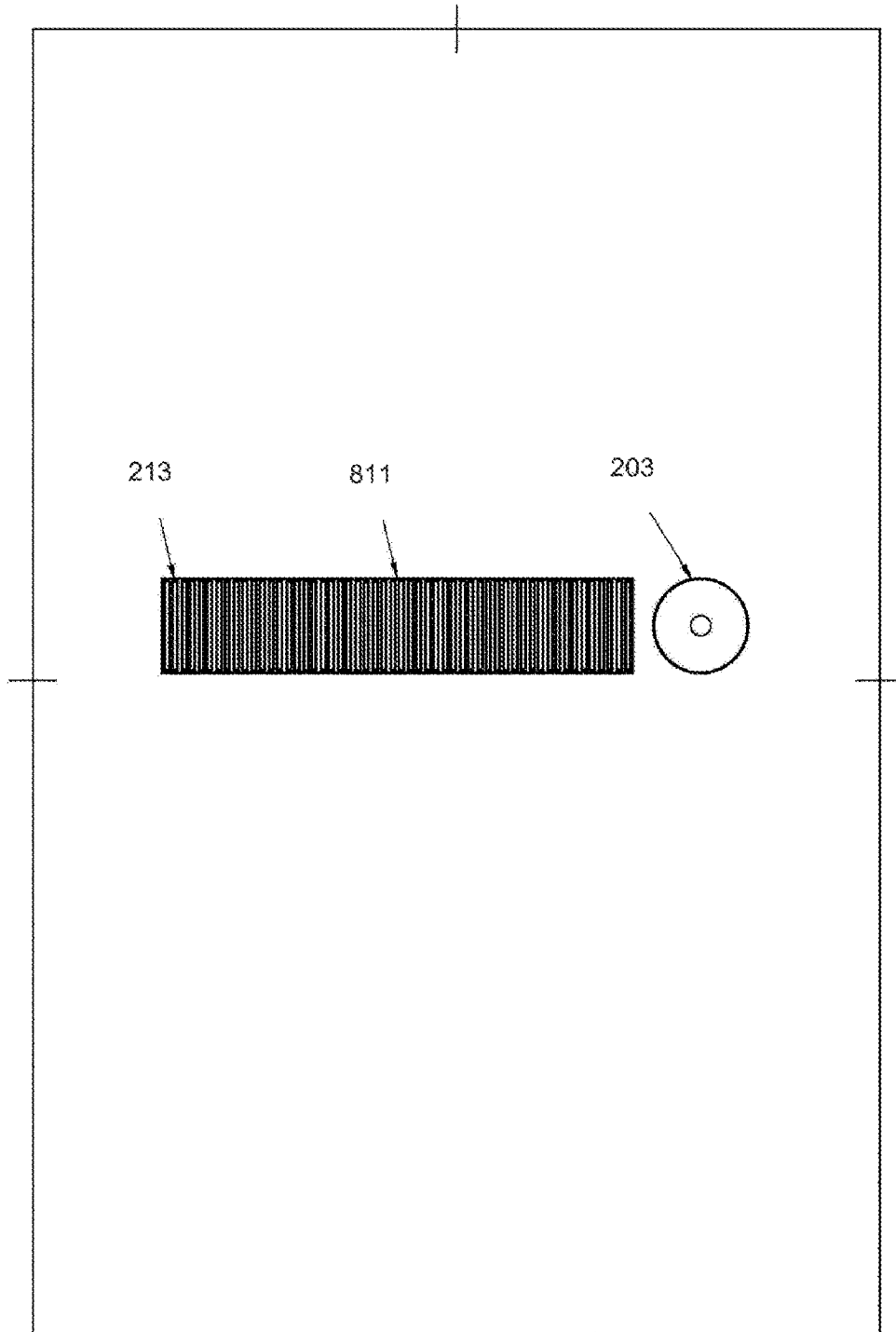


Figura 21