

# Evaluación de topologías de agregados celulares a partir de un modelo de *Off-Lattice* para bioimpresión de tejidos (Draft)

Nicolas Puentes Urrego

October 31, 2022

## Introducción

Aunque ha habido avances clínicos alrededor del trasplante, no hay un esquema fuerte con respecto al procedimiento del trasplante y del donador (Molina et al. 2018). A pesar de ser voluntario, en general la negación de donación es un problema de actualidad (Molina et al. 2018). En países como México se tiene que más de 21500 pacientes esperan un órgano (Excelsior 2022). Para el caso de Bogotá se encuentran 1993 personas en lista de espera, donde la red solidaria tuvo que tomar las debidas precauciones teniendo en cuenta lo ocurrido con el CoVid-19 por el riesgo del receptor durante el trasplante (Bogotá 2021). Para mayo del 2020, los trasplantes realizados en Colombia sumaron 320 de los cuales el 77% provenían de cadáveres y el resto de los donantes vivos (siendo la mayoría los padres para el caso de los menores de edad) (Salud 2022). Según la Fundación Cardio Infantil, el 20% de los pacientes que requieren un trasplante puede llegar a fallecer esperándolo (Cardioinfantil 2021).

La comprensión de los tejidos y órganos hace parte de un dilema de la ontogenia (desarrollo individual de un organismo), como también para el estudio de la ingeniería tisular (Flenner et al. 2012). El objetivo de la ingeniería de tejidos es el diseño funcional de órganos y células permitiendo la regeneración y sustitución de ciertos órganos (Imani et al. 2012). En la actualidad, las investigaciones en ingeniería tisular se han centrado en el estudio de los scaffold (andamios de crecimiento de los agregados celulares) como base estructural de la organización de las células de manera aislada de un tejido (Imani et al. 2012). A partir de la ontogenia se sugiere que no se debería imitar la estructura de los tejidos, sino que se deberían emular

microentornos para crear tejidos que fomenten las interacciones complejas entre las células y la matriz adyacente (Mironov et al. 2009). Lo anterior genera un aspecto más biomimético para la simulación de ciertos aspectos de la remodelación de ciertos tejidos (Imani et al. 2012). En diferentes grupos de investigación se están buscando soluciones a la escasez de órganos a partir de diferentes enfoques como los xenotransplantes (órganos animales) o también la ingeniería regenerativa (Boland et al. 2003).

La xenotransplantación tiene buen enfoque si se tienen en cuenta los animales transgénicos con capacidad reducida a una respuesta inmune, aunque hay una opción de propagación de virus animales (Boland et al. 2003).

Uno de los patrones más ampliamente estudiados para la formación de organelos es por la interacción de la afinidad celular diferencial (K. Jakab, Damon, et al. 2008). El DAH trata a los tejidos como fluidos con cierta adhesión que se reorganiza buscando su mínima energía libre interfacial (Steinberg 2007). Esta hipótesis fue propuesta por Steinberg y valida numerosos signos moleculares controlando esta afinidad (Steinberg 2007). Esta hipótesis puede ser comprobada a partir de las tensiones superficiales presentes en los tejidos (Steinberg 2007).

Los tejidos artificiales en teoría deberían eliminar el problema que existe con la biocompatibilidad que es una propiedad crucial para cualquier enfoque en la formación de agregados u órganos (Mironov et al. 2009). Lo anterior es crucial debido a la carencia de métodos en ingeniería tisular, los órganos solo se podrían producir a partir de procesos embrionarios de manera natural (Mironov et al. 2009). En la actualidad no se conoce el alcance de

la ingeniería tisular para ser capaz de la imitación de los diferentes tejidos a partir de la histogénesis, morfogénesis y organogénesis (Mironov et al. 2009). La aproximación más cercana que se tiene es la construcción de ciertos tejidos vascularizados, aunque este enfoque sigue siendo un trabajo en curso. Para lograr lo anteriormente dicho se han propuesto procesos como el autoensamblaje a partir de la generación de ciertas estructuras a diferentes escalas espaciales (K. Jakab et al. 2004). Procesos como la histogénesis y organogénesis son ejemplos de autoensamblaje que a través de la interrelación entre las células y la interacción de la célula con su medio (K. Jakab et al. 2004). Debido a ciertas limitaciones intrínsecas y económicas en la producción tisular, se puede pensar que la tecnología actual todavía no es capaz de imitar un órgano humano vivo 100% autentico (Mironov et al. 2009).

Actualmente se tienen técnicas emergentes basadas en la bioimpresión mediante la disposición de agregados “capa por capa” como biotinta, generando una fusión posterior a la bioimpresión para la construcción del tejido deseado (Flenner et al. 2012). Para poder usar la bioimpresora se requiere de la manipulación de ciertos “bloques de construcción”, los cuales son células propias de cierto organismo combinado con una matriz de soporte (Sego et al. 2017). Por razones biológicas, los agregados celulares tienen forma esférica denominados esferoides celulares siendo impulsados por las mismas células (Sego et al. 2017). Las técnicas actuales pueden llegar a ser costosas por el material usado y los equipos personalizados para este proceso (Maritan, Lian, and Mulligan 2017). Adicional a lo anterior, los esferoides abarcan una gran cantidad de tamaños y formas que generan una dificultad para la comparación de las condiciones de crecimiento (Maritan, Lian, and Mulligan 2017).

Para diferentes agregados celulares no se tienen suficientes experimentaciones para poder ser comparados. Usualmente, los modelos computacionales usados actualmente para sistemas multicelulares se limitan a la interpretación de procesos morfogénicos de formas específicas (Flenner et al. 2012). Existen modelos a partir de la representación por elementos viscoelásticos, modelos por “spins” adyacentes a partir de la discretización del espacio como el **Cellular Potts** para clasifi-

cación celular o también métodos *Off-Lattice* a partir del centro de masa de esferas. Autores como Broadland han sugerido modelos a partir de elementos finitos modelando fuerzas y dinámicas presentes en sistemas multicelulares (Flenner et al. 2012). En la actualidad se tiene un acuerdo entre lo experimental y lo teórico de que el equilibrio entre la adhesión de las células y la tensión cortical (tensión entre las membranas de las células) determina la morfología celular, lo anterior define un sistema a partir de la dinámica de los agregados y la morfogénesis de los tejidos (Thomas et al. 2014). A partir de lo anterior se puede deducir que se requiere de un framework con el cual se puedan obtener datos de calibración de ciertos agregados celulares para poder tener los datos disponibles para poder llegar a simular diferentes geometrías de los diferentes agregados celulares para poder ser usados en diferentes topologías presentes en los diferentes tejidos o constructos celulares.

## Marco teórico

### Bioimpresora 3D

La bioimpresión se basa en la disposición precisa capa por capa (layer-by-layer) del agente biológico y/o agregados celulares. Esta técnica está basada en técnicas biomiméticas nombradas anteriormente con el potencial de superar los limitantes presentes con el uso de scaffold sólido. El uso de la bioimpresora requiere del uso de gotas esféricas que puedan ser almacenadas en un cartucho de la impresora (Imani et al. 2012). Esta técnica ofrece ciertas ventajas como: mejoramiento del tiempo de supervivencia de las células y el uso de una densidad celular más alto. Para el caso de las bioimpresoras existen casos en donde se requiera la impresión de más para estructuras más complejas que lo requieran (K. R. Jakab et al. 2006).

Actualmente existen distintos métodos experimentales para la fabricación de estructuras complejas, entre los métodos se encuentra la extrusión, teolitografía, impresión asistida por láser, entre otros. Este tipo de métodos presenta cierto tipo de inconvenientes con respecto a la precisión, resolución y la velocidad de producción. Los procesos actuales usan hidrogeles blandos como portador de la célula o fármaco, donde los biopolímeros más

usados son: la poli caprolactona, ácido poli láctico, ácido hialurónico, polietilenglicol y compuestos inorgánicos como lo son el fosfato de calcio (Shanjani et al. 2015).

El procedimiento de la formación de las estructuras a partir de bioimpresora se realiza de la siguiente manera:

- **Preprocesamiento:** Preparación de la biotinta
- **Procesamiento:** Entrega automatizada de los agregados celulares con cierta matriz extracelular.
- **Postprocesamiento:** Incubación de los constructos celulares bajo ciertas condiciones de maduración.

Una de las características distintivas con la impresión reside en que la impresión 3D solo suministra un material inerte mientras que la bioimpresión después del procesamiento requiere de un proceso adicional de maduración. El proceso de maduración puede llegar a ser controlado a partir de ciertas estimulaciones mecánicas con ciertos tipos de biorreactores. La cuantificación de la bioimpresión es complicada y no es raro que los encargados de usar las bioimpresoras tengan que recurrir a un enfoque basado en la prueba y error (Shanjani et al. 2015).

Entre las principales limitantes que restringen a la impresión se debe al estado de la gelificación del hidrogel usado. Una gelificación no homogénea dificulta mejorar la precisión de ciertos tejidos en donde se requiere una estructura con pocas capas. Otra limitación es la construcción de ciertos tubos ramificados a partir de esferoides grandes y los espacios vacíos entre esferoides impresos (K. Jakab et al. 2010). Aunque el proceso de impresión a partir de extrusión mecánica es el más usado, hay investigaciones recientes con otros tipos de disposición de las células. Uno de los métodos es la funcionalización magnética de la matriz extracelular permitiendo el desarrollo de biofabricaciones impulsado a partir de la levitación magnética (Koudan et al. 2016). En la actualidad los sistemas requieren una mejor integración de componentes multifuncionales blandos y duros (Shanjani et al. 2015). Para el caso de impresión de láminas celulares, se tiene que pueden llegar a ser ideales para la impresión de piel dañada. Lo anterior se logra a

partir la preparación de ciertos agregados con un diámetro comparable al grosor del injerto deseado (K. Jakab et al. 2010).

## Biotinta

A partir de la formación de los agregados celulares se tiene la ventaja de una correcta disposición fisiológica de ciertos tejidos a partir de los contactos adhesivos con los vecinos celulares. Para una correcta formulación de biotintas, se requiere conocer la interacción entre las células como también el uso óptimo de ciertos hidrogeles junto al tipo de célula usado. Las biotintas son críticos para la biofabricación de los órganos por poseer ciertos parámetros reológicos. Para poder realizar el proceso de impresión se requiere del ambiente óptimo para el desarrollo, motilidad y actividad metabólica de las células (Levato et al. 2014).

La formación de los agregados celulares a partir de hidrogeles plantea varios desafíos: uno de ellos es utilizar hidrogeles altamente hidrofílicos en donde los agregados sean limitados a una forma esférica independiente de la morfología nativa de la célula; otro desafío es la impresión de tejido grande lo cual requiere la encapsulación de una gran cantidad de células que es difícil de obtener de un injerto. Por lo anterior se deben usar estrategias para mejorar las propiedades mecánicas y bioquímicas de los bioenlaces del biomaterial con las células para lograr una óptima construcción de tejidos funcionales (Levato et al. 2014). La óptima construcción del tejido también depende de la naturaleza de la fusión de los agregados (siendo aplicable a líquidos altamente viscosos) (Shafiee et al. 2015). Sin embargo, el uso de biotintas no es general para todo tipo de tejidos.

Esta reconstrucción de tejidos requiere de ciertos scaffold con respecto a la cierta propiedad que se requiera (Shanjani et al. 2015): Para el caso de materiales estructurales como huesos, se requiere una integridad estructural y mecánica. Para el caso de ambientes blandos, se requiere el uso de ciertos hidrogeles blandos para permitir la difusión de ciertos bioagentes (como señales bioquímicas y metabólicas). Estos hidrogeles proporcionan un ambiente adecuado para que los agregados cumplan con sus funciones celulares como lo son la adhesión, motilidad, crecimiento y diferenciación

si se requiere.

Por lo anterior, la rigidez para ciertos andamios rígidos debe ser similar a tejidos duros como el hueso esponjoso poroso, mientras que la propiedad más importante para los hidrogeles blandos es el módulo elástico similar a tejidos como lo son el cartílago, músculo y vasos sanguíneos (Shanjani et al. 2015).

En el contexto de lograr un biomimético a partir de la interacción de los agregados celulares y la matriz extracelular, se debe ayudar a las células a diferenciarse o fusionarse de la manera óptima. Por consiguiente, estos entornos deben proporcionar ciertos factores moleculares, biológicos y físicos que optimicen el potencial de la regeneración de los tejidos. Se pueden usar células mesenquimales humanas que pueden llegar a formar ciertos tipos de tejidos (como lo pueden ser vasos sanguíneos, cartílago, hueso, entre otros), pero no se pueden formar necesariamente músculos, nervios o hepatocitos. Hay investigaciones recientes a partir de células iPS procedente de ciertos tejidos humanos, con los cuales se puede llegar a formar ciertas células similares a la embrionarias para la regeneración de ciertos tejidos cardiacos. La técnica mencionada requiere de una modificación genética de estas células en un futuro (K. Jakab et al. 2010).

## Agregado Celular

El uso de bioimpresoras 3D depende de los organismos vivos usados para la formación de los tejidos, por ello se requiere el uso de ciertos agregados celulares generalmente producidos como esferoides. En comparación con monocultivos se tiene que los esferoides se auto ensamblan a partir de ciertas interacciones celulares naturales imitando patrones de diferenciación presentes en entornos naturales, como también interacciones de las células con la matriz extracelular (Imani et al. 2012). A partir de la experimentación se ha visto que, si la interacción entre las células es lo suficientemente alta, entonces se van a formar los agregados deseados (Boland et al. 2003). Hay casos en donde ciertas células que generan una matriz extracelular adicional a la proporcionada, generando que la estructura promueva su autoensamblaje (Boland et al. 2003). Como ejemplo se tiene que los fibroblastos

no se adhieren entre sí, sino que su autoensamblaje es a través de su matriz extracelular, donde estas células pueden llegar a ser manipuladas genéticamente para la expresión de ciertas moléculas que promuevan la aglomeración de cierta población de células adyacentes o en otros tipos de células para ayudar a su aglomeración (Robu, Mironov, and Neagu 2019).

Para entender la base molecular de la agregación celular se sabe que cuando una población celular se diferencia, estas se pueden polarizar a partir de ciertas moléculas de adhesión a partir de cierta expresión genética que solo se expresa en partes restringida de las membranas de las células. En consecuencia, esto genera la minimización de la energía conformacional a partir de cierta fuerza motriz de la reorganización celular (K. Jakab, Norotte, et al. 2008).

La capacidad de los esferoides para lograr la fusión se sustenta a partir de conceptos de fluidez tisular, donde los tejidos embrionarios se consideran como líquidos muy viscosos. Específicamente los esferoides se redondean en forma esférica similar a una gota de líquido en suspensión o en superficies no adhesivas. Es importante saber que los agregados celulares deben ser lo suficientemente pequeños para permitir la supervivencia de las células en el centro del agregado (Boland et al. 2003).

Para la producción de agregados celulares se deben tener en consideración ciertos conceptos físicos como la transferencia de masa y los esfuerzos cortantes entre las células. Para el caso de la transferencia de masa se tiene en cuenta la difusión de los diferentes sustratos y químicos que hacen parte del metabolismo de las células. También se deben tomar en cuenta los esfuerzos cortantes como generador de la interacción y adhesión de las células para su autoensamblaje. En la literatura hay información y datos de la aparición de necrosis en los esferoides por el crecimiento del mismo esferoide (Decarli et al. 2021). La reducción del tamaño de los agregados es resultado de interacciones célula-célula más fuertes que genera una estructura compacta y el aumento de este puede ser debido también por necrosis en ciertas zonas del agregado (Imani et al. 2012). Para el uso de agregados celulares en 3D se debe tener en cuenta que estos tipos de cultivos producen cierta mor-

fología distintiva y ciertos eventos de señalización dependiendo de las células usadas, donde lo anterior en contraste con cultivos bidimensionales, son diferentes (Imani et al. 2012).

Actualmente, el modelo para la fusión de agregados son las células ser la línea celular de mamíferos industrial más importante, de manera similar a la *Escherichia Coli* para las bacterias y la *Saccharomyces Cerevisiae* para las levaduras. Se usa las células de CHO por las siguientes razones (Omasa, Onitsuka, and Kim 2010):

- Existen buenas normas de fabricación (GMP) certificadas para CHO y las normas de seguridad para estas células están claramente definidas.
- Los medios industriales sin suero están desarrollados y su adaptación es fácil
- La producción de líneas celulares de CHO está bien estudiada.
- Se han desarrollado cultivos con alta densidad en ciertos lotes a gran escala y su tecnología de escalado es bien establecida.

Además de formar tejidos con los agregados celulares, los esferoides se investigan para la producción de órganos o también la prueba de medicamentos a partir de diferentes cultivos celulares. Con respecto a los cultivos celulares, se tiene que las investigaciones más recientes se realizan para la construcción de tejidos vasculares a partir de tubos lisos que envuelven cilindros de agarosa, usándose para evitar el deterioro de los lúmenes (espacio interior de una estructura tubular de cierta arteria o intestino) (Robu, Mironov, and Neagu 2019). En ciertos esferoides compuestos por células de diferente origen (endoteliales, fibroblastos y células madre mesenquimales) se pueden generar estructuras vascularizadas similares permitiendo la construcción de segmentos vasculares ramificados que pueden ir desde pequeñas arterias hasta capilares (Robu, Mironov, and Neagu 2019).

### **DAH (hipótesis de adhesión diferencial) y Fusión de Esferoides**

La fusión de los esferoides es esencial para la formación de los tejidos a partir de las bioimpresoras 3D donde este proceso está presente durante el proceso embrionario. La fusión de los tejidos es un

fenómeno físico impulsado por fuerzas de tensión superficial de las células sustentado a partir de la “hipótesis de adhesión diferencial” propuesta por Malcolm Steinberg (Steinberg 2007).

Según Steinberg, la formación de estructuras se produce por (Steinberg 2007):

- La diferencia de adhesión célula-célula entre los diferentes tipos de células existentes en el modelo.
- La motilidad celular: las células buscan la configuración espacial en donde se tengan enlaces fuertes como puede ser en la mezcla de dos tipos de células de diferente cohesividad generando que las células menos cohesivas se separen y ocupen la región central rodeada por la población menos cohesiva (como ocurre con dos gotas de fluidos inmiscibles).

Steinberg introdujo el concepto de tensión superficial tisular como un valor cuantitativo para poder llegar a clasificar los agregados celulares (Steinberg 2007). La tensión superficial tisular está dada por la relación de la adhesión celular y tensión entre las células en el agregado (Flenner et al. 2012).

A partir de lo anterior se puede ver que los tejidos son tomados como líquidos viscoelásticos cuya tensión es medible. Los experimentos in vitro han mostrado que la tensión superficial entre células está bien definida con lo cual se puede llegar a caracterizar los agregados celulares (Robu, Mironov, and Neagu 2019).

### **Simulación de Fenómenos Biológicos**

Aunque el uso de agregados celulares para la formación de tejidos es el proceso más investigado para la producción de órganos en los últimos años, el uso de estos esferoides es costoso. Lo anterior ocurre por el uso adecuado de tipo celular, sensibilización a los factores específicos para cada tipo de célula, producción de esferoides a gran escala y las condiciones adecuadas de impresión. A partir de lo anterior varios autores usan el modelamiento para la predicción de la evolución de la impresión (Robu, Mironov, and Neagu 2019).

Lo anterior ha intensificado la necesidad del uso de modelos computacionales multifocal de manera eficaz para poder entender los fenómenos presentes

a diferentes escalas temporales y espaciales. La modelación de estos tipos de células tiene como finalidad la identificación de las condiciones para la explicación de ciertos comportamientos complejos como lo puede ser la homeostasis, aparición de estados patológicos, modelado de medicamentos y prueba de medicamentos en ciertos tipos celulares (Maspero et al. 2019). Para lograr la simulación se han propuestos modelos biofísicamente aceptables para la interacción entre las células. Generalmente el estudio de la interacción de las células en la escala temporal y espacial de ciertos tipos de células en ambientes heterogéneos puede llegar a ayudar el estudio de ciertas técnicas actuales de una manera más eficiente (Maspero et al. 2019). Aunque el uso de simulaciones es un factor de favorecer la investigación, para este caso se debe garantizar la correcta simulación de los tejidos a partir de los datos necesarios para la fusión de los agregados. Lo anterior es importante para verificar que en la fusión no haya falla en el consumo de oxígeno y nutrientes (Robu, Mironov, and Neagu 2019).

### Fusión de Esferoides y Tiempo de Fusión

El tiempo de adhesión es un parámetro que se debe tener en cuenta para la determinación de la velocidad de impresión de las diferentes capas sucesivas (Boland et al. 2003). De la fusión de esferoides se sabe experimentalmente que durante el proceso los tejidos blandos esféricos se comportan como dos gotas de fluidos viscoelásticos fusionándose, cuya descripción requiere de una modelación hidrodinámica a priori. No obstante, la simplicidad de la geometría de la fusión no permite una descripción del proceso de la fusión a partir de la conservación de masa presente en la fusión de dos gotas viscosas (Flenner et al. 2012).

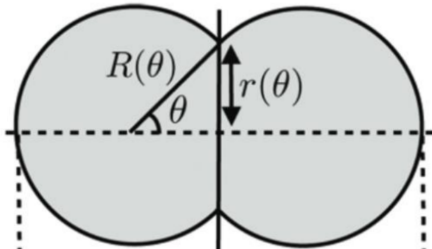


Figure 1: Esquema de la fusión de dos esferoides con el mismo diámetro (Oriola et al. 2022)

Una forma conveniente de la descripción se puede

representar de la siguiente manera:

$$(r/R_o)^2 = \sin^2\theta = 1 - \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

A partir de este enfoque, la fusión de diferentes agregados celulares con distinto origen puede determinarse a partir de un tiempo característico ( $\tau$ ) para poder calibrar la fusión real con el tiempo generado en el modelo (Flenner et al. 2012).

Aun así, hay autores como David Oriola (Oriola et al. 2022) han realizado la simulación del cambio del ángulo entre las esferas a partir de la suposición de la consideración de los esferoides como un material Kelvin-Voigt incompresible, que puede llegar a ser caracterizado a partir de la viscosidad ( $\eta$ ), módulo de cizalla ( $\mu$ ) y la tensión superficial ( $\gamma$ ). Este modelo fue usado por representar de manera efectiva ciertos modelos con tejidos y esferoides celulares. A partir de ciertas aproximaciones de la ecuación constitutiva del tensor del tensor de esfuerzos, se halla la siguiente ecuación que representa la dinámica de la fusión:

$$\theta = 2 \cdot \frac{\cot(\theta)}{\tau} (R_o/R_\theta)^3 \cdot [f(\theta) - \beta \cdot g(\theta)] \quad (2)$$

Donde  $\tau = \eta * R_o/\gamma$  siendo el tiempo de la viscoelasticidad característico y  $\beta = \mu * R_o/\gamma$  siendo el parámetro adimensional que caracteriza el grado de fusión de las esferas. Y finalmente las funciones  $f(\theta)$  y  $g(\theta)$  son:

$$f(\theta) = \frac{4}{1 + \cos(\theta)} \quad (3)$$

$$g(\theta) = \frac{2}{\cos(\theta) \cdot (1 + \cos(\theta))} \cdot \left[ \frac{2 \cdot R_o \cdot (1 + \varepsilon_\gamma)}{R(\theta) \cdot (1 + \cos(\theta))} - 1 \right] \quad (4)$$

Para el caso de  $\beta = 0$ , la ecuación de la dinámica de la fusión se reduce a la expresión de la sinterización de gotas viscosas. Si se asume  $\beta$  como un parámetro de bifurcación se halla que  $\beta > \beta_x = 1/\varepsilon_\gamma$  con valores finales de  $\theta = 0$  (cuando no hay fusión de esferas). Aun así, para  $\beta < \beta_c$ , el sistema genera un estado inestable en  $\theta = 0$  generando la fusión de los agregados (Oriola et

al. 2022). Para regímenes de baja coalescencia y a un ángulo ( $\theta_{max}$ ), tienen una baja correlación con  $\varepsilon_Y$  (grandes cambios de  $\varepsilon_Y$  se acompañan con pequeños cambios en  $\beta$ ). A partir de las experimentaciones dadas en (Oriola et al. 2022), se asume por simplicidad que  $\varepsilon_Y = 0$ .

## Modelos de simulación de la fusión de esferoides

Distintos autores han formulado modelos computacionales como herramienta para la fusión. El desarrollo de la fenomenología y la exploración de parámetros característicos requiere de un contexto eficiente. Para la comprensión de los tejidos se han usado ciertos modelos computacionales basados generalmente en dos tipos de modelos:

1. **On-lattice:** Son modelos que asumen el espacio de simulación como una aproximación discreta del espacio. Aproximan el espacio de fusión de las células a píxeles. Son modelos muy dependientes de la malla usada para la simulación. Usualmente los modelos On-Lattice usan modelos estocásticos para poder evaluar la evolución del sistema y u cuántica) para la identificación de las células o compuestos químicos presentes en los límites de la simulación. Entre los modelos más conocidos están el Cellular Automata y el Cellular Potts. Para el caso del Cellular Potts se tiene que fue un modelo muy usado en las dos últimas décadas para la simulación de tejidos mesenquimales a partir de la descripción de la adhesión celular.
2. **Off-Lattice:** Son modelos asumiendo una distribución continua de la célula en el espacio. Se usan diferentes aproximaciones físicas para interpretar el comportamiento de las células como lo son la aproximación a esferas viscoelásticas, fluidos muy viscosos a bajos números de Reynold, asumiendo sólidos en difusión a partir de la difusión de Turing, asumir superpuestas, entre otros. Normalmente estos modelos asumen aproximaciones de fenómenos físicos que se aproximen a la naturaleza de la fusión de los agregados celulares. Para el caso de las esferas superpuestas se asume la 3<sup>ra</sup> ley de Newton (Principio de Acción Reacción) para modelar las interac-

ciones de las células en el agregado celular.

Se puede ver que a inicios de la década pasada se estaban usando modelos discretos (principalmente Cellular Potts) para el desarrollo de entornos de simulación basados en la discretización del espacio como en el caso de Parallelized Cellular Potts o ASMC3D para la simulación de tejidos y formación de tejidos por haptotaxis o quimiotaxis. (Germann, Marin-Riera, and Sharpe 2019). Para el caso de la segunda mitad de la década pasada se puede ver que se han desarrollado más modelos continuos basados en modelos Vertex (basado en simular las membranas de las células como polígonos irregulares). Aunque los modelos continuos tengan una aproximación más real, estos modelos tienden a requerir una capacidad computacional muy alta. Por lo anteriormente dicho, se han sugerido modelos intermedios como lo son las Esferas superpuestas que solo toman el centro de masa de cada célula para el cálculo y asume las leyes de newton para su dinámica (Mathias et al. 2020).

Autores como (Mathias et al. 2020) han desarrollado un framework para la comparación de diferentes interacciones entre células para comparar las que generen una mejor aproximación usando diferentes herramientas numéricas para la solución de las ecuaciones diferenciales presentes en el sistema. Otros modelos (con su respectivo Framework) usados se presentan en la Tabla 1 a partir de modelos Discretos (On-Lattice) o Continuos (Off-Lattice).

### Tabla 1 Pendiente

Para una mejor ejemplificación se van a explicar dos modelos: el discreto (Cellular Potts) que es el mas usado en los casos discretos y el continuo (esferas superpuestas) que se está empezando a usar en los dos últimos años para la modelación de agregados celulares.

## Modelo de Cellular Potts

El modelo de Cellular Potts (CPM) es un modelo muy usado por su versatilidad. El modelo (también llamado modelo de Glazier-Graner-Hogeweg) es un modelo computacional usado para células y tejidos a partir de sus interacciones individuales y colectivas. En esa época, se relacionó la mezcla de agregados celulares heterogéneos concluyendo que se clasificaban en parches celulares de manera

espontánea. Para entender lo anterior, Graner & Glazier se propusieron modelar este fenómeno basado en la “hipótesis de adhesión diferencial”. El modelo propuesto por Graner y Glazier es basado en el modelo Potts usado inicialmente en física para la simulación de los imanes (donde este modelo emula la interacción entre diferentes compuestos químicos con cierto spin que es análogo al spin de las partículas cuánticas) en una red cristalina (Flenner et al. 2012).

El modelo se basa en una representación matricial del espacio donde cada pixel representa un espacio de las células o la matriz extracelular en un sistema multicelular a partir del spin, donde 0 representa la matriz extracelular y los demás números enteros positivos representan los diferentes tipos de células en el sistema. Para describir la interacción entre las células se hace a partir de la energía efectiva (para el caso de CPM se asumen amortiguaciones perfectas y fluctuaciones casi térmicas) para poder simular la evolución continua del sistema para minimizar la energía total del sistema. Para el caso de la energía efectiva se tiene que para los casos de haptotaxis y quimiotaxis se modela añadiendo energía potencial química y de crecimiento. En general para poder simular un órgano completo se requiere simular aproximadamente 105 células con tamaño de red similar (Glazier & Popp, 2007).

De manera general, el CPM se realiza de la siguiente manera: 1. Se escoge un pixel discreto en el espacio matricial 2. Se escoge un vecino del pixel escogido 3. Se halla el cambio del hamiltoniano entre los dos pixeles hallados. 4. Se usa el algoritmo de Metrópolis para aceptar o rechazar en el nuevo pixel 5. Se repite el primer paso.

Como se dijo anteriormente, se requiere definir el algoritmo de metrópolis con el cual se evalúa el cambio de “spin”. Se propone un cambio de “spin” causado por el cambio del hamiltoniano. El cambio del “spin” es aceptado a partir de cierta probabilidad dada por la siguiente ecuación:

$$P(\Delta H) = \begin{cases} 1 & \Delta H \leq 0 \\ e^{-\Delta H/T} & \Delta H > 0 \end{cases} \quad (5)$$

Donde T es el valor definido como el parámetro que mide la fluctuación de motilidad del sistema.

A partir de la experimentación se ha determinado que el planteamiento está en consonancia con la hipótesis de adhesión diferencial de Steinberg (DAH), que afirma que las células buscan activamente minimizar la energía libre total de adhesión del sistema multicelular. El mecanismo morfogénico propuesto en este trabajo, la fusión de esferoides celulares está bien caracterizado tanto experimentalmente como teóricamente (Robu, Mironov, and Neagu 2019).

## Modelos “*Off-Lattice*”

Aunque los modelos discretos son muy usados para simulación de la concentración de ciertos compuestos químicos presentes en la dinámica intracelular, se ha visto que los modelos “*Off-Lattice*” o sin discretización del espacio pueden describir la disposición de las células en los agregados de manera más realista. Entre los modelos Off Lattice más conocidos se encuentran (Mathias et al. 2020):

- Modelo de Reacción-Difusión
- Modelo Vertex
- Método de Elementos Subcelulares
- Lattice Boltzmann
- Phase Field
- Esferoides Viscoelásticos

Aunque estos modelos presentan una aproximación al realismo es lo suficientemente aproximada, estos modelos requieren de una capacidad computacional muy alta (Mathias et al. 2020). A partir de lo anterior es importante definir que las generalizaciones de los modelos de “*Off-Lattice*” (Nava-Sedeño et al. 2020):

- Se representa cada célula o partícula a partir de un punto en el espacio que se mueve con velocidad constante a partir de un vector unitario ( $\nu \in R^d$ )
- La partícula solo interacciona con sus vecinos circulares con radio  $R(B_R(X_M))$
- La interacción entre las partículas es modelada a partir de un potencial ( $U_M$ ), donde la partícula de las células es modelada a partir de las leyes de movimiento de Newton.

Por la dificultad de la capacidad computacional, se ha planteado modelos simplificados de modelos “*Off-Lattice*”



## Modelo “Off-lattice” basado en el Centro de Masa

Los modelos *Off-Lattice* (CBM) se basan en el seguimiento del centro de masa de cada partícula a partir de las interacciones mecánicas presentes entre las células. Aunque existen otros modelos basados en el centro de masa como lo son los modelos **Vertex** que requiere el cálculo de la tensión interfacial y presión de las células (Mathias et al. 2020). Para el caso del modelo basado en el centro de masa, se logra una relación equilibrada con respecto a la eficiencia numérica y la capacidad de incorporación de modelos continuos de la mecánica celular presente en la agregación de las células teniendo en cuenta aspectos importantes como lo son la temporalidad del sistema a partir de la biofísica del sistema (Mathias et al. 2020).

Para el caso del modelo *Off-Lattice* (CBM) se han propuesto diferentes modelos físicos a partir de la interacción entre las células para proporcionar descripciones del sistema con modelos parecidos a Lattice Boltzmann como lo son el modelo *Johnson-Keller-Roberts*.

De manera general, para los diferentes modelos *Off-lattice* se usa la tercera ley de Newton, donde:

$$m_i * a = m_i * \ddot{x}_i = F_i \quad (6)$$

A partir de la suma de las fuerzas en cada célula se halla la siguiente ecuación:

$$m_i * \ddot{x}_i = -\nabla * \dot{x}_i + \sum_{j \neq i} F_{ij} \quad (7)$$

Para la simulación se usa la siguiente ecuación simplificada, donde:

$$\lambda * \sum_j \dot{x}_i - \dot{x}_j = \sum_j F_{ij}^S + F_{ij}^a \quad (8)$$

Donde para el caso presentado se tienen las fuerzas repulsivas ( $F_{ij}^S$ ) & fuerzas atractivas ( $F_{ij}^a$ ).

El sistema representado a partir del centro de masa puede ser representado de la siguiente manera:

Para calcular la evolución temporal, normalmente se usa el método de Euler hacia delante (“*forward Euler method*”):

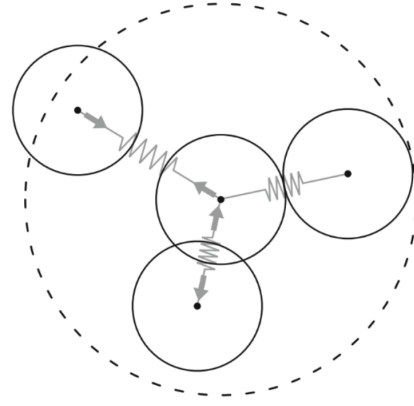


Figure 2: Ilustración del modelo de centro de masa. Se asume fuerzas de atracción y repulsión (Mathias et al. 2020)

$$y_{n+1} = y_n + \Delta t * f(t_n, y_n) \quad (9)$$

Aunque actualmente se han usado métodos con varios pasos teniendo en cuenta valores pasados. Entre los métodos más usados se encuentra el método de Adams-Bashforth, donde:

$$y_{n+1} = y_n + \frac{3}{2} * \Delta t * f(t_n, y_n) - \frac{1}{2} * \Delta t * f(t_{n-1}, y_{n-1}) \quad (10)$$

Para la simulación es este tipo de sistemas se tiene software generado como lo puede ser *Ya/a* (Germann, Marin-Riera, and Sharpe 2019) que usa el language de programación CUDA usando GPU (tarjetas gráficas) permitiendo su paralelización en cada paso de Euler en un proceso similar hallado en la paralelización en los modelos de Cellular Potts (Tapia and D’Souza 2011).

## Modelos de fuerzas características de la interacción celular

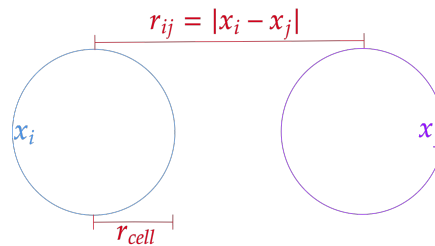


Figure 3: A

En los últimos años se han desarrollado y usado diferentes interacciones con los cuales se han mod-

elado la interacción entre las células presentes en el agregado celular, entre los modelos mas usados se tiene los siguientes:

### Modelo Cúbico

Este modelo fue desarrollado por (Delile et al. 2017). En este modelo se asume la relación entre las células como fuerzas cúbicas par ale caso de las fuerzas atractivas y las fuerzas de resorte lineal como la interacción de repulsión. Este modelo ha sido usado en un framework llamado *MecaGen*. Las interacciones son las siguientes:

$$F^{Cubic}(r) = \begin{cases} \mu \cdot (r - r_{max})^2 \cdot (r - r_{min}) & \text{si } r \leq r_{max} \\ 0 & \text{si } r_{max} < r \end{cases} \quad (11)$$

### Modelo Lineal Generalizado de resorte

Este modelo fue desarrollado por (Cooper et al. 2020). Este modelo usaba la suma de polinómios para la representación de la atracción y repulsión. El modelo ha sido usado en el software llamado “*Chaste*” usado para el estudio del cáncer. Las interacciones se representan con la siguiente ecuación, donde:

$$F^{GLS}(r) = \begin{cases} \mu \cdot \log(1 + (r - r_{min})) & \text{si } r \leq r_{min} \\ \mu \cdot (r - r_{min}) \cdot \exp(-\alpha(r - r_{min})) & \text{si } r_{min} < r \leq r_{max} \\ 0 & \text{si } r > r_{max} \end{cases} \quad (12)$$

Para los dos modelos mencionados anteriormente se tiene que  $\mu$  es el parámetro que representa la relación de atracción & repulsión de las células,  $r_{min}$  es la distancia mínima entre las células donde se inicia la repulsión de las células en los agregados,  $r_{max}$  es la distancia máxima donde no hay

interacción de atracción del medio presente entre las células &  $s$  es un factor que determina el ancho de la fuerza que es dependiente de  $r_{max}$ .

## Metodología

Para poder realizar las simulaciones, el modelo basado en el centro de masa fue programado en Julia usando un *wrapper* dentro del lenguaje CUDA usado como lenguaje para computación en paralelo creado por Nvidia®. El software usado para esta tesis se llama CellAggregate.jl. La búsqueda de vecinos cercanos de cada célula se realiza a partir de una versión modificada del algoritmo de vecinos cercanos kNN a partir de la programación paralela del mismo método en CUDA, el algoritmo se presenta en 1. Para el cálculo de las fuerzas que interaccionan en cada célula se usa un calculo paralelizado a partir de los vecinos hallados con kNN. La ecuación de movimiento (8) fue resuelta con el método Leapfrog.

**Result:** Devuelve una matriz con los índices de las esferas más cercanas (nn) a cada esfera en el agregado

**Input :** X(x,y,z), nn←number of nearest neighbors

**Output:** Matrix[nn,size(X)]

**begin**

Variables Iniciales

Size ← Size(X) ;

Defining Coordinates of each cell on the aggregates

$i_{Cell} = repeat(X, Size) -$   
 $transpose(repeat(X, Size));$

Calculating Norm on every cell on the aggregate

$Dist = sqrt.(i_{Cell}.^2)$

Calculating index of knof each cell in the aggregate

**for**  $i=1:nn$  **do**

$idx[i, :] = findmin(Dist; dims = 1)[2]$

$Dist[idx[i, :]] = Inf$

**end**

**end**

**Algorithm 1:** kNN algorithm for parallel computing

## Algoritmo kNN

El algoritmo kNN (k vecions mas cercanos) es un modelo usado en modelos de clasificación no paramétrico que se basa en la predicción de objetos cercanos a partir de la proximidad o distancias (que pueden ser euclidianas) sobre la agrupación de cierta posición con respecto a su entorno con presencia de otras posiciones de ciertos objetos (Raschka 2018). Aunque estos modelos son usados principalmente con fines de regresión tambien puede llegar a tener otros usos.

Para lograr esta clasificaión, se declara una etiqueta en la clase de objeto a clasificar y se realiza un cálculo de los objetos cercanos a cada uno de los objetos en cierto sistema (Raschka 2018). Este modelo hace uso de vectores de distancia en un espacio multidimensional asumiendo cada objeto como  $p$  y los atributios de evaluación como  $q$ , donde los vectores se representan como en la ecuación (13). (Hastie, Tibshirani, and Friedman 2004)

$$x_i = (x_{1i}, x_{2i}, \dots, x_{pi}) \in X \quad (13)$$

El espacio cartesiano (X) es dividido bajo ciertos parámetros de localización. Para cada punto identificado en el espacio se le asigna una clase de cercanía para cada punto. Normalmente, para el cálculo de distancias se suele usar distancias euclidianas como se puede ver en la ecuación (14)(Hastie, Tibshirani, and Friedman 2004).

$$d(x_i, x_j) = \sqrt{\sum_{r=1}^p (x_{ri} - x_{rj})^2} \quad (14)$$

La fase inicial del algoritmo almacena un conjunto de vectores de las distancias de cada punto con respecto al resto. Despues de generada la información inicial, se requiere una fase de clasificación donde se calculan las distancias de cada conjunto de puntos a partir de los vectores inicializados en el espacio característico (Cover and Hart 1952). Con la información anterior se calcula la distancia entre los vectores hallados anteriormente y a partir de las distancias halaldas, se seleccionan los  $k$  -ésimos vecinos mas cercanos (Cover and Hart 1952). Dependiendo del espacio a evaluar se

pueden usar diferentes métricas de distancia como lo pueden ser Manhattan, Minkowski o Hamming.

Para poder evaluar ul valor óptimo  $k$  para el algoritmo depende del sistema que se vaya a evaluar. La asignación del valor  $k$  tiende a ser un parámetro de equilibrio en donde conlleva a escoger valores excesivos o faltantes. Para el caso de valores bajos se pueden presentar varianzas muy altas pero altos sesgos. Esta elección depende principalmente de la naturaleza de los datos de entrada. Generalmente se recomienda la elección de valores impares para  $k$  para evitar empates en la clasificación(Hastie, Tibshirani, and Friedman 2004).

La elección de  $k$  dependerá en gran medida de los datos de entrada, ya que los datos con más valores atípicos o ruido probablemente funcionarán mejor con valores más altos de  $k$ . En general, se recomienda tener un número impar para  $k$  para evitar empates en la clasificación, y las tácticas de validación cruzada pueden ayudarlo a elegir la  $k$  óptima para su conjunto de datos (Raschka 2018).

Para el caso del algoritmo (1) usado en el repositorio (CellAggregate.jl) se puede ver que primero se define el tamaño de las coordenadas de las células a evaluar. Despues se evalua la fase inicial en donde se calcula la diferencia de distancias  $i_{Cell}$  en las dimensiones espaciales presentes en los puntos presentes en  $X$  para poder generar un arreglo de vectores con las distancias entre los diferentes puntos presentes en  $X$ . Despues se calcula la distancia  $Dist$  a partir del uso de la métrica de la distancia euclidiana para el cálculo de estas distancias entre los diferentes puntos presentes en  $X$ . Al final se halla los valores con menor distancia de manera iterativa con respecto al parámetro  $nn$ .

Para el caso de la evaluación del valor  $k$  de de células evaluadas como esferas (como aproximación) se toma en cuenta la naturaleza de los datos. Como se tiene esferas, entonces se va a tomar una rama de la geometría que se enfoca en el estudio del empaquetamiento de esferas. Para este caso se tomó el empaquetamiento cerrado de esferas cerradas con el cual se logra la disposición mas densa de esferas. Gauss demostró que esta distribución genera la densidad más alta con la fracción vacía mas baja logrado a partir de un empaquetamiento hexagonal, la fracción ocupada por las esferas se puede ver en la ecuación (15) y el empaquetamiento se

puede ver en la imagen (4) (Conway and A. 2011).

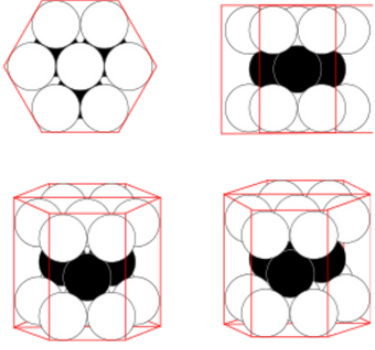


Figure 4: Perspectivas del Empaquetamiento HCP

$$\frac{\pi}{3\sqrt{2}} \approx 0.74048 \quad (15)$$

Para el caso del empaquetamiento hexagonal, se tiene que la máxima cantidad de esferas que puede rodear a una esfera interna es de 12 esferas. Por lo anterior se escogió el valor de 13 como  $k$  para el algoritmo kNN por las consideraciones físicas del sistema y se escogió el número impar recomendado por (Raschka 2018) para un mejor funcionamiento del algoritmo.

### Algoritmo Cálculo de Fuerzas

El modelo basado en el centro de masa de las células usado para esta herramienta toman en cuenta las coordenadas del centro de masa de cada célula en un lapso temporal suponiendo que las células se comportan como esferas rígidas (Mathias et al. 2020). Se supone principalmente que las interacciones entre las células están regidas a un potencial de interacción dependiente principalmente de una distancia de interacción máxima ( $r_{max}$ ) y una distancia inferior ( $s$ ). Con estas dos distancias se usan en la expresión a partir de que la magnitud de interacción solo depende de la distancia entre las células ( $r$ ) (Delile et al. 2017). Con las interacciones dependientes de la distancia se tiene que si las células se encuentran en una distancia menor de  $s$ , las células tienen un potencial de repulsión; cuando la distancia se encuentra entre la distancia mínima ( $s$ ) y la distancia máxima ( $r_{max}$ ) se ejerce una fuerza de interacción en el modelo

**Result:** Devuelve una matriz con los valores del  $dX$  generado con la fuerza que depende del potencial usado

**Input :**  $X(x,y,z)$ ,  $idx=kNN(X)$

**Output:**  $dX=Matrix[size(X)]$

**begin**

*Defining Coordinates of each cell on the aggregates*

$r_p = X - X[rand_{idx}]$ ;

$r = reshape(repeat(X), nn, size(X), 3) - X[idx]$ ;

*Finding Distances*

$dist = ((sum(r.^2)).^{0.5})$

$dist =$

$reshape(repeat(dist), nn, size(X), 3)$ ;

*Finding forces for each cell*

$F = (-K .* ((dist. - r_{max}).^2) .* (dist. - s)). * r ./ dist$

$F[dist. > r_{max}] = 0$

*Calculating de  $dX \rightarrow dX[i,:] += r./dist * F$*

$dX = sum(F[2 : end]; dims = 1)$ ;

*Adding fp for random forces*

$dX = dX - fp .* (r_p ./ ((sum(r_p.^2)).^{0.5}))$ ;

**end**

**Algorithm 2:** Forces algorithm for parallel computing

(Mathias et al. 2020). Para estos potenciales de interacción se tienen los modelos 11 y 12 explicados anteriormente.

Para poder calcular las fuerzas, se presenta el algoritmo (2) usado en el repositorio (CellAggregate.jl) se puede ver que primero se define la matriz de coordenadas de los puntos presentes en el agregado celular, los índices de los agregados celulares (idx) mas cercanos de cada célula calculado con el algoritmo 1 explicado anteriormente y se puede ver que se toma un index  $r_p$  que representa la fuerza contráctil que se ha visto que tiene encidencia importante en el modelo. Con las anteriores variables se calcula la variable  $r$  que representa la distancia de cada célula con sus vecinos mas cercanos respectivamente. Con los vectores halladas, se hallan las distancias a partir de la métrica de distancia euclídea y se repite en una matriz para facilitar los cálculos matriciales presentes en los cálculos con tarjeta gráfica. Con los potenciales de interacción presentes en 11 y 12 se calcula la fuerza ejercida por cada vecino mas cercano. Con las fuerzas calculadas se halla la suma de las fuerzas de los vecinos para hallar el  $dX$  calculado a partir del vector unitario  $r/dist$  de cada interacción. Al final se suma la interacción contráctil y se halla la velocidad de cada célula en un intervalo de tiempo pequeño.

## Algoritmo Leapfrog

PENDIENTE

## Bibliografía

- Bogotá, Alcaldía Mayor de. 2021. [https://saludata.saludcapital.gov.co/osb/fichas\\_tecnicas\\_osb/enf-cronicas/OSB\\_enfermedades\\_cronicas\\_organos.pdf](https://saludata.saludcapital.gov.co/osb/fichas_tecnicas_osb/enf-cronicas/OSB_enfermedades_cronicas_organos.pdf).
- Boland, Thomas, Vladimir Mironov, Anna Gutowska, Elisabeth A. Roth, and Roger R. Markwald. 2003. "Cell and Organ Printing 2: Fusion of Cell Aggregates in Three-Dimensional Gels." *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 272 (June): 497–502. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10059>.
- Cardioinfantil, Fundación. 2021. <https://cardioinfantil.org/noticias/actualmente-en-colombia-mas-del-20-de-los-pacientes-fallecen-esperando-un-trasplante/>.
- Conway, John Horton, and Sloane N J A. 2011. *Sphere Packings, Lattices and Groups*. Springer.
- Cooper, Fergus, Ruth Baker, Miguel Bernabeu, Rafel Bordas, Louise Bowler, Alfonso Bueno-Orovio, Helen Byrne, et al. 2020. "Chaste: Cancer, Heart and Soft Tissue Environment." *Journal of Open Source Software* 5 (March): 1848. <https://doi.org/10.21105/joss.01848>.
- Cover, T M, and P E Hart. 1952. "Approximate Formulas for the Information Transmitted By a Discrete Communication Channel." *IEEE TRANSACTIONS ON INFORMATION THEORY*. Vol. 24.
- Decarli, Monize Caiado, Robson Amaral, Diogo Peres Dos Santos, Larissa Bueno Tofani, Eric Katayama, Rodrigo Alvarenga Rezende, Jorge Vicente Lopes Da Silva, et al. 2021. "Cell Spheroids as a Versatile Research Platform: Formation Mechanisms, High Throughput Production, Characterization and Applications." *Biofabrication*. IOP Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/abe6f2>.
- Delile, Julien, Matthieu Herrmann, Nadine Peyri  ras, and René Doursat. 2017. "A Cell-Based Computational Model of Early Embryogenesis Coupling Mechanical Behaviour and Gene Regulation." *Nature Communications* 8 (January). <https://doi.org/10.1038/ncomms13929>.
- Excelsior. 2022. Notimex. <https://www.excelsior.com.mx/nacional/ante-falta-de-organos-llaman-a-concientizar-sobre-la-donacion/1367140>.
- Flenner, Elijah, Lorant Janosi, Bogdan Barz, Adrian Neagu, Gabor Forgacs, and Ioan Kosztin. 2012. "Kinetic Monte Carlo and Cellular Particle Dynamics Simulations of Multicellular Systems." *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 85 (March). <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.85.031907>.
- Germann, Philipp, Miquel Marin-Riera, and James Sharpe. 2019. "Ya||a: GPU-Powered Spheroid Models for Mesenchyme and Epithelium." *Cell Systems* 8 (March): 261–266.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.02.007>.
- Hastie, Trevor, Robert Tibshirani, and J. H. Friedman. 2004. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction: With 200 Full-Color Illustrations*. Springer.
- Imani, Rana, Shahriar Hojjati Emami, Hossein Fakhrazadeh, Nafiseh Baheiraei, and Ali M. Sharifi. 2012. "Optimization and Comparison of Two Different 3D Culture Methods to Prepare Cell Aggregates as a Bioink for Organ Printing." *Biocell* 36: 37–45. <https://doi.org/10.32604/biocell.2012.36.037>.
- Jakab, Karoly Robert, Brooke Damon, Adrian Neagu, Karoly Jakab, Brook Damon, Anatolij Kachurin, and Gabor Forgacs. 2006. "Three-Dimensional Tissue Constructs Built by Bioprinting Cell Level Biomechanics View Project Computer Simulations for Predicting the Outcome of 3D Bioprinting View Project Three-Dimensional Tissue Constructs Built by Bioprinting." *Biorheology*. Vol. 43. IOS Press. <https://www.researchgate.net/publication/6876030>.
- Jakab, Karoly, Brook Damon, Françoise Marga, Octavian Doaga, Vladimir Mironov, Ioan Kosztin, Roger Markwald, and Gabor Forgacs. 2008. "Relating Cell and Tissue Mechanics: Implications and Applications." *Developmental Dynamics* 237: 2438–49. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21684>.
- Jakab, Karoly, Adrian Neagu, Vladimir Mironov, Roger R Markwald, and Gabor Forgacs. 2004. "Engineering Biological Structures of Prescribed

- Shape Using Self-Assembling Multicellular Systems.” [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400164101](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400164101).
- Jakab, Karoly, Cyrille Norotte, Brook Damon, Françoise Marga, Adrian Neagu, Cynthia L. Besch-Williford, Anatoly Kachurin, et al. 2008. “Tissue Engineering by Self-Assembly of Cells Printed into Topologically Defined Structures.” *Tissue Engineering - Part A* 14 (March): 413–21. <https://doi.org/10.1089/tea.2007.0173>.
- Jakab, Karoly, Cyrille Norotte, Françoise Marga, Keith Murphy, Gordana Vunjak-Novakovic, and Gabor Forgacs. 2010. “Tissue Engineering by Self-Assembly and Bio-Printing of Living Cells.” *Biofabrication* 2. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/2/022001>.
- Koudan, Elizabeth V., Elena A. Bulanova, Frederico D. A. S. Pereira, Vladislav A. Parfenov, Vladimir A. Kasyanov, Yousef D. Hesuan, and Vladimir A. Mironov. 2016. “Patterning of Tissue Spheroids Biofabricated from Human Fibroblasts on the Surface of Electrospun Polyurethane Matrix Using 3D Bioprinter.” *International Journal of Bioprinting* 2: 45–52. <https://doi.org/10.18063/IJB.2016.01.007>.
- Levato, Riccardo, Jetze Visser, Josep A. Planell, Elisabeth Engel, Jos Malda, and Miguel A. Mateos-Timoneda. 2014. “Biofabrication of Tissue Constructs by 3D Bioprinting of Cell-Laden Microcarriers.” *Biofabrication* 6. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035020>.
- Maritan, Sarah M., Eric Y. Lian, and Lois M. Mulligan. 2017. “An Efficient and Flexible Cell Aggregation Method for 3d Spheroid Production.” *Journal of Visualized Experiments* 2017 (March). <https://doi.org/10.3791/55544>.
- Maspero, Davide, Chiara Damiani, Marco Antonietti, Alex Graudenzi, Marzia Di Filippo, Marco Vanoni, Giulio Caravagna, Riccardo Colombo, Daniele Ramazzotti, and Dario Pescini. 2019. “The Influence of Nutrients Diffusion on a Metabolism-Driven Model of a Multi-Cellular System.” *Fundamenta Informaticae* 171: 279–95. <https://doi.org/10.3233/FI-2020-1883>.
- Mathias, Sonja, Adrien Coulier, Anass Bouchnita, and Andreas Hellander. 2020. “Impact of Force Function Formulations on the Numerical Simulation of Centre-Based Models.” *Bulletin of Mathematical Biology* 82 (October). <https://doi.org/10.1007/s11538-020-00810-2>.
- Mironov, Vladimir, Richard P. Visconti, Vladimir Kasyanov, Gabor Forgacs, Christopher J. Drake, and Roger R. Markwald. 2009. “Organ Printing: Tissue Spheroids as Building Blocks.” *Biomaterials* 30 (April): 2164–74. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.084>.
- Molina, María Isabel, Paola Andrea Toro, Eliana Manzi, Diana Dávalos, Karen Torres, Ana María Aristizábal, Catalina Gómez, and Gabriel J. Echeverri. 2018. “Principales Causas de Negativa Familiar a La Donación de Órganos y Tejidos: 10 Años de Experiencia En Un Centro Latinoamericano.” *Nefrología* 38 (March): 225–27. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2017.05.004>.
- Nava-Sedeño, Josué Manik, Anja Voß-Böhme, Haralampos Hatzikirou, Andreas Deutsch, and Fernando Peruani. 2020. “Modelling Collective Cell Motion: Are on- and Off-Lattice Models Equivalent?: Equivalent on- and Off-Lattice Models.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0378>.
- Omasa, Takeshi, Masayoshi Onitsuka, and Wook-Dong Kim. 2010. “Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells.” *Current Pharmaceutical Biotechnology*. Vol. 11.
- Oriola, David, Miquel Marin-Riera, Kerim Anlaş, Nicola Gritti, Marina Sanaki-Matsumiya, Germaine Aalderink, Miki Ebisuya, James Sharpe, and Vikas Trivedi. 2022. “Arrested Coalescence of Multicellular Aggregates.” *Soft Matter*. <https://doi.org/10.1039/D2SM00063F>.
- Raschka, Sebastian. 2018. “STAT 479: Machine Learning Lecture Notes.” [https://sebastianraschka.com/pdf/lecture-notes/stat479fs18/02\\_knn\\_notes.pdf](https://sebastianraschka.com/pdf/lecture-notes/stat479fs18/02_knn_notes.pdf).
- Robu, Andreea, Vladimir Mironov, and Adrian Neagu. 2019. “Using Sacrificial Cell Spheroids for the Bioprinting of Perfusable 3D Tissue and Organ Constructs: A Computational Study.” *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7853586>.
- Salud, Instituto Nacional de. 2022. <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Red-de-Donaci%C3%B3n-y-Trasplantes-en-Colombia-no-se-detiene.aspx>.
- Sego, T. J., U. Kasacheuski, D. Hauersperger, A. Tovar, and N. I. Moldovan. 2017. “A Heuristic Computational Model of Basic Cellular Processes and Oxygenation During Spheroid-Dependent Biofabrication.” *Biofabrication* 9 (June). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa6ed4>.
- Shafiee, Ashkan, Matthew McCune, Gabor Forgacs, and Ioan Kosztin. 2015. “Post-Deposition Bioink Self-Assembly: A Quantitative Study.” *Biofabrication* 7 (November). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/045005>.
- Shanjani, Y., C. C. Pan, L. Elomaa, and Y. Yang. 2015. “A Novel Bioprinting Method and System for Forming Hybrid Tissue Engineering Constructs.” *Biofabrication* 7 (December). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/045008>.
- Steinberg, Malcolm S. 2007. “Differential Adhesion in Morphogenesis: A Modern View.” *Current Opinion in Genetics and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.05.002>.
- Tapia, José Juan, and Roshan M. D’Souza. 2011. “Parallelizing the Cellular Potts Model on Graphics Processing Units.” *Computer Physics Communications* 182 (April): 857–65. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.12.011>.
- Thomas, Gilberto L., Vladimir Mironov, Agnes Nagy-Mehesz, and José C. M. Mombach. 2014. “Dynamics of Cell Aggregates Fusion: Experiments and Simulations.” *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications* 395 (February): 247–54. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2013.10.037>.