

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Zacatenco**

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**La dinámica entre la proliferación y el reclutamiento
celular podría actuar como un controlador temporal del
tamaño alar en *Drosophila melanogaster***

TESIS

Que presenta

Elizabeth Díaz Torres

Para obtener el grado de

Doctorado en Ciencias

En la especialidad de

Fisiología Celular y Molecular

Director de la tesis:

Dr. Marcos Nahmad Bensusan

Ciudad de México

Diciembre 2022

Índice general

Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
Índice de figuras	IV
1. Introducción	2
1.1. Biología del desarrollo	2
1.2. Desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.3. Crecimiento por proliferación	8
1.4. Crecimiento por reclutamiento	13
1.5. Control de tamaño en <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.6. Planteamiento del problema	19
2. Resultados	21
2.1. Construcción del modelo matemático	21
2.2. Exploración del modelo	26
2.3. Optimización del modelo	29
2.4. Análisis de perturbaciones	30
2.5. Modelo modificado	32

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	I
2.6. Discusión	35
3. Conclusión	41
3.1. Perspectiva	42
Apéndices	44
A. Geometría Elíptica	45
B. Cota superior para $W(t)$	47
C. Dinámica $R(t)$	49
D. Códigos	52
E. Artículo	66
Bibliografía	79

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por el apoyo con la beca de doctorado con número 583903. También agradezco al CINVESTAV por todo el conocimiento que me proporcionó.

Agradezco a mi asesor de tesis el Dr. Marcos Nahmad y a los miembros de mi comité tutorial, las doctoras Liora Shoshani y Yuriria Cortes Poza, por sus aportaciones académicas a mi trabajo.

A mi mamá, María Antonieta Torres Arontes, a mi hermano David Díaz Torres y a mi novio Noé Lagunas Cortés, a quienes amo con todo mi ser y me dieron siempre su apoyo incondicional. También agradezco al resto de mi familia, que no son menos importantes, pero ¡son muchos! tías, tíos, primos, muchas gracias por estar al pendiente de mi en este periodo de mi vida.

A mis amigos y amigas: Fabiola Rodriguez, Luis Ayala, Damián Jacinto, Mónica Corona, Gemma Fernández, Saúl Alvarez, Rocío García, Marycruz Flores, Keity Farfán, Felipe Angeles.

A los doctores Eduard De La Cruz Burelo y Pablo Padilla Longoria, quienes me dieron su apoyo, académico, intelectual y personal para poder terminar mi doctorado, muchas gracias.

Resumen

El crecimiento de los órganos durante el desarrollo es un proceso exponencial guiado principalmente por la proliferación celular, por lo que, incluso pequeñas variaciones en la tasa de proliferación celular integradas sobre varios ciclos celulares durante el desarrollo conducen a grandes diferencias de tamaño. La forma en que los órganos controlan de manera robusta su tamaño final a pesar de las perturbaciones en la tasa de proliferación celular es una cuestión fundamental en la biología del desarrollo. En este trabajo formulamos un modelo matemático para proponer que en el desarrollo del ala de *Drosophila*, el reclutamiento celular, un proceso en el que las células vecinas indiferenciadas se incorporan al primordio del ala, determina el tiempo en el que se detiene el crecimiento en este sistema. Nuestro modelo muestra que pequeñas perturbaciones en las tasas de proliferación de las células comprometidas a formar las alas se compensan con una duración de crecimiento inversamente proporcional. Este mecanismo asegura que el tamaño final del ala sea robusto en un rango de tasas de proliferación celular. Nuestro modelo matemático predice que el control del crecimiento se pierde cuando las fluctuaciones en la proliferación celular afectan tanto a las células de tipo alar como a las reclutables. Estos resultados proponen al reclutamiento celular como un controlador temporal del crecimiento para amortiguar las fluctuaciones en las tasas de proliferación celular y ofrecen un modelo para explicar observaciones experimentales desde hace más de 20 años.

Abstract

Organ growth is an exponential process driven mainly by cell proliferation, and therefore, even small variations in cell proliferation rates, when integrated over a relatively long time, will lead to large differences in size. How organs robustly control their final size despite perturbations in cell growth and cell proliferation rates is a fundamental question in developmental biology. Here we use a mathematical model to propose that in the developing wing of *Drosophila*, cell recruitment, a process in which undifferentiated neighbouring cells are incorporated into the wing primordium, determines the time in which growth is arrested in this system. Our model shows that perturbations in proliferation rates of wing-committed cells are compensated by an inversely proportional duration of growth. This mechanism ensures that the final size of the wing is robust in a range of cell proliferation rates. Furthermore, our mathematical analysis predicts that growth control is lost when fluctuations in cell proliferation affects both wing-committed and recruitable cells. These results propose that cell recruitment as a temporal controller of growth to buffer fluctuations in cell proliferation rates and offer a model to explain experimental observations reported more than 20 years ago.

Índice de figuras

1.1. Trasplante del primordio de ojo entre salamandras. Imagen adaptada de (Twitty and Schwind, 1931)	4
1.2. Trasplante de extremidades entre salamandras. Imagen adaptada de (Twitty and Schwind, 1931)	5
1.3. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.4. Discos imagales y su correspondiente destino en el animal adulto.	7
1.5. Compartimentos del disco alar organizados por los morfógenos <i>Wg</i> y <i>Dpp</i>	9
1.6. Regiones del disco de ala y su destino de diferenciación en la mosca adulta.	9
1.7. Contribución de la proliferación y el reclutamiento celular al tamaño final del ala. Imagen modificada de (Muñoz-Nava et al., 2020).	10
1.8. Regulación de la biosíntesis de proteínas y biogénesis de ribosomas por TORC1. Imagen modificada de (Hietakangas and Cohen, 2009).	11
1.9. Efectos de la inhibición de la vía de TOR y la desnutrición. Imagen modificada de (Parker and Struhl, 2015).	12
1.10. Esquema de un embrión de <i>D. melanogaster</i> . Muestra: cerebro, intestino, discos imagales y a las IPCs, así como las influencias hormonales que tendrán las IPC durante el periodo larvario. Imagen modificada de (Otero-Moreno et al., 2016).	13
1.11. Reclutamiento celular en el disco alar.	15

1.12. Fenotipos de alas obtenidos de la perturbación en vías de señalización involucradas en proliferación. Imagen adaptada de (Cruz et al., 2009). 16

1.13. Perturbación de la tasa de proliferación en las células del compartimento posterior. Imagen adaptada de (Neufeld et al., 1998). 17

2.1. Consideraciones geométricas. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 22

2.2. Número de células W en el frente de reclutamiento. 24

2.3. Procesamiento de discos alares para la estimación de condiciones iniciales. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 25

2.4. Contribución del reclutamiento al crecimiento de las alas de *Drosophila*. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 27

2.5. Curso temporal de población de células W y R . Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 28

2.6. Espacio de parámetros. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022) . . 29

2.7. Optimización. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022) 30

2.8. Perturbaciones en α_W . Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022) . . . 31

2.9. Dinámica bajo perturbaciones en α_W . Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022) 31

2.10. Dinámica bajo perturbaciones simultáneas. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 32

2.11. Modelo modificado. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 34

2.12. Dinámica bajo perturbaciones en α_W , modelo modificado. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 35

2.13. Dinámica bajo perturbaciones simultáneas del modelo modificado. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022). 35

Capítulo 1

Introducción

1.1. Biología del desarrollo

La **biología del desarrollo** estudia los procesos que ocurren desde la fecundación hasta el nacimiento, la senescencia y la regeneración de un ser vivo. En particular, el desarrollo es el período de tiempo en el que están activos a nivel celular y tisular los mecanismos químicos y celulares que se encargan de garantizar que un individuo pase de su fenotipo a su genotipo. El desarrollo tiene cinco etapas semejantes en muchos animales. Se inicia por la **fecundación** que es la fusión de material genético entre los gametos y da lugar a la formación del cigoto; después de la fecundación comienza la **segmentación** del cigoto que es una serie de divisiones mitóticas rápidas, donde el citoplasma es dividido en células pequeñas llamadas blastómeros y al final de la segmentación forman una estructura conocida como **blástula**; los blastómeros migran y se reorganizan durante un proceso llamado **gastrulación** que da como resultado la formación de las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo. Las células de cada capa germinal comienzan a adquirir identidad celular por medio de la diferenciación celular mediada por la expresión diferencial de genes produciendo órganos, tejidos y sistemas, proceso denominado **morfogénesis** (Scott F. Gilbert, 2016).

La complejidad de los mecanismos involucrados en el desarrollo ha dado lugar a abordajes multidisciplinarios con el fin de responder preguntas fundamentales. Diferentes factores contribuyen a que un órgano crezca y tenga un tamaño específico, estos pueden ser intrínsecos (metabolismo, expresión génica, interacciones mecánicas entre las células, morfógenos, etc) o extrínsecos (nutrición, hormonas, temperatura, etc). Estos procesos son regulados en diferentes escalas de espacio y tiempo y están sincronizados para que cuando el órgano en desarrollo alcance el tamaño *adecuado* para desempeñar su función fisiológica de forma óptima las células que lo conforman detengan su crecimiento. Es así como el **control de tamaño** surge como una propiedad emergente de la sincronización de estos procesos y podemos definirlo como la capacidad que tiene un órgano de detener su crecimiento y regular todos los cambios que ocurren en su entorno para alcanzar su tamaño óptimo. Decimos que el control de tamaño es **robusto** cuando que a pesar de ciertas perturbaciones el órgano activa mecanismos de homeóstasis para atenuar estas perturbaciones y así alcanzar el tamaño correcto.

Existen al menos dos mecanismos moleculares que contribuyen al control de crecimiento de un órgano. Uno de ellos requiere factores de crecimiento que activan vías de señalización involucradas en el proceso de proliferación celular, tales como **Wnt**, **TGF (Tumour Growth Factor)**, **Shh (Sonic hedgehog)**, **N (Notch)**, **EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)**, entre otras. El segundo mecanismo bloquea el crecimiento una vez que un organismo ha alcanzado el tamaño adecuado, sobre el cual se conoce poco. Los mecanismos de control funcionan a nivel sistémico como una respuesta general a los niveles nutricionales y a nivel autónomo de tejido u órgano. Esta dualidad de los mecanismos de control de tamaño se planteó gracias a los experimentos realizados por Victor C. Twitty y Joseph L. Schwind a través de sus experimentos de trasplantes de órganos y extremidades entre salamandras de dos especies diferentes *Amblystoma puncta-*

tum y *Amblystoma tigrinum*, ver figuras 1.1 y 1.2, en donde se observó que los órganos y extremidades trasplantados crecieron hasta el tamaño final que habrían alcanzado en la salamandra donadora, de esta manera se propuso que existe un **control de tamaño intrínseco** para cada órgano que no depende del medio donde se lleve a cabo el desarrollo y otro **control de tamaño extrínseco** que depende del medio donde se desarrolla el individuo (Harrison, 1924; Twitty and Schwind, 1931). Posteriormente experimentos de trasplantes de primordios de órganos en otros organismos como el ala de la mosca de la fruta (Bryant and Levinson, 1985), el timo del ratón (Metcalf, 1963), el ala del pollo (Wanson and Lewis, 1982) entre otros, han confirmado la existencia de estos dos componentes del control de tamaño.

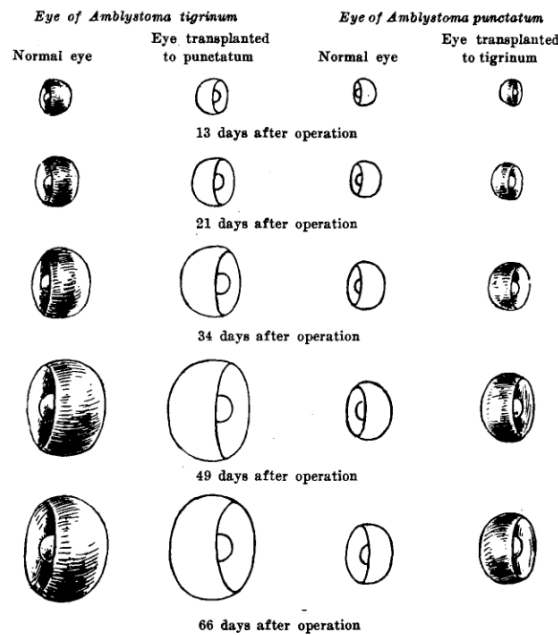


Figura 1.1: Trasplante del primordio de ojo entre salamandras. Imagen adaptada de (Twitty and Schwind, 1931)

La investigación experimental de la biología del desarrollo ha empleado diferentes organismos modelo tales como: pollo (*Gallus gallus domesticus*), pez cebra (*Danio rerio*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), entre otros. Desde los estudios realiza-

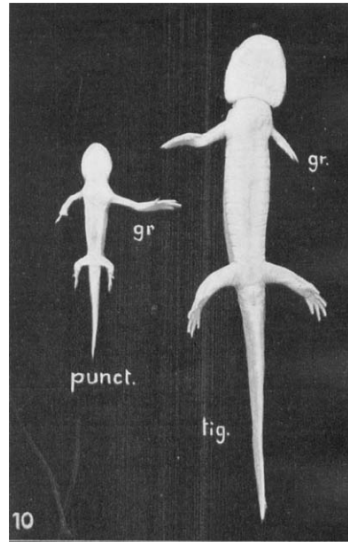


Figura 1.2: Trasplante de extremidades entre salamandras. Imagen adaptada de (Twitty and Schwind, 1931)

dos por el científico ganador del primer premio Nobel en genética Thomas Hunt Morgan (1866-1945) (Morgan, 1917) hasta la actualidad *Drosophila* ha sido el objeto de estudio por excelencia de la genética, por tanto se han desarrollado múltiples herramientas en este campo que permiten estudiar los mecanismos de control de tamaño. Un ejemplo de estas herramientas es el sistema **Gal80/Gal4/UAS** (Duffy, 2002), los cuales permiten manipular la expresión genética en cualquier lugar y tiempo del desarrollo de cualquier proteína de interés (Brand and Perrimon, 1993; McGuire et al., 2004). Además de la practicidad de sus herramientas genéticas, *Drosophila* tiene un ciclo de vida corto, solo cuatro cromosomas que facilitan la manipulación genética, cromosomas politénicos (cromosomas gigantes) y un bajo costo de manutención en el laboratorio. Aunado a esto, el desarrollo de la genómica y bioinformática han permitido la creación de una amplia librería genética (FlyBase.org, <https://flybase.org/>) y la generación de bancos de cepas de moscas como el de Bloomington *Drosophila* Stock Center (<https://bdsc.indiana.edu/>) que facilitan el uso de este organismo como modelo experimental.

1.2. Desarrollo de *Drosophila melanogaster*

El desarrollo de *Drosophila melanogaster* pasa por las etapas de embrión, larva y pupa antes de eclosionar como una mosca adulta. A 25°C Su período embrionario dura aproximadamente un día. Posteriormente pasa por tres etapas o estadios de desarrollo larvario; *L1* larva de primer estadio durante un día, *L2* larva de segundo estadio durante un día y *L3* larva de tercer estadio durante dos días, después comienza el período de pupa que tiene una duración de cinco días y finalmente el insecto adulto que también se conoce como imago eclosiona al décimo día¹, ver figura 1.3.

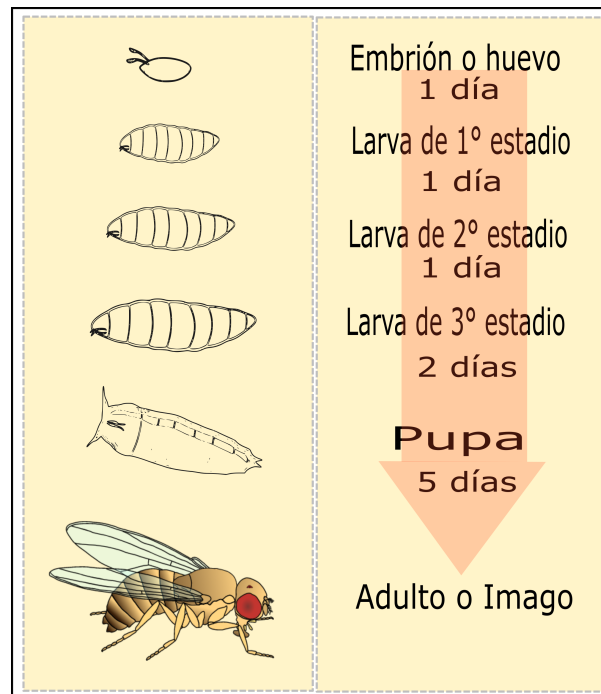


Figura 1.3: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Durante los estadios la larva crece de forma exponencial. Los órganos y estructuras de la mosca adulta comienzan a formarse a partir de unas estructuras larvarias llamadas

¹Este tiempo de desarrollo es dependiente de la temperatura, aquí reportamos tiempos a 25°C.

discos imagales, que son primordios con la identidad del órgano adulto al que van a dar lugar (Morales et al., 1993). Es en este estadio donde se activa la proliferación celular para hacer crecer a los discos imagales que dan lugar a la boca, ojos, antenas, patas, alas, halterios y genitales (Lawrence et al., 1992), ver figura 1.4.

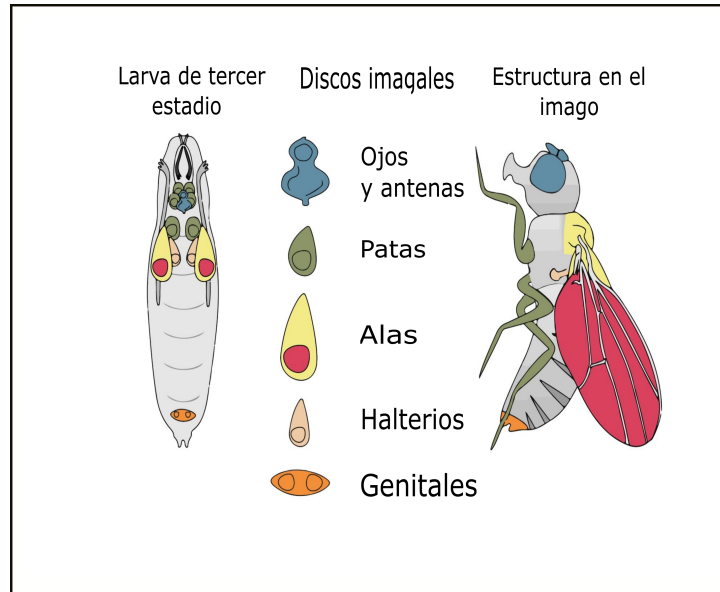


Figura 1.4: Discos imagales y su correspondiente destino en el animal adulto.

El disco de ala empieza a crecer desde un primordio de entre 25 a 50 células hasta alcanzar aproximadamente una población de 50000 células (Zecca and Struhl, 2010). El disco está subdividido en cuatro regiones, denominados compartimentos que son áreas de linaje restringido, es decir, no hay intercambio de células entre compartimentos (García-Bellido, 1975), ver figura 1.5. Estos cuatro compartimentos son conocidos como: anterior (A), posterior (P), dorsal (D) y ventral (V). Las fronteras que dividen a los compartimentos funcionan como fuentes organizadoras de patrones de expresión génica, el borde antero/posterior (A/P), que divide al disco a través de un eje vertical, expresa *Decapentaplegic (dpp)*, mientras que en el borde dorso/ventral (D/V), que divide al disco a través de un eje horizontal, se expresa *Wingless (wg)*, ver figura 1.5. Estos genes actúan como

morfógenos, sustancias que determinan el patrón de desarrollo tisular por medio de su difusión a través de un gradiente de concentración y otorgan información posicional para controlar el nivel de compromiso de varios tipos celulares para su diferenciación dentro de un tejido en formación (Tabata and Takei, 2004). En este caso *Wg* y *Dpp* especifican un patrón génico que determina el desarrollo de los compartimentos del disco, que posteriormente formará el ala, la axila y parte del tórax de la mosca. En el insecto adulto únicamente las células que expresan el gen *vestigial (vg)* y que se ubican en la región de la bolsa del disco contribuyen a la formación del ala (Kim et al., 1996). Las otras células del disco formarán parte del tórax y la bisagra (axila) de la mosca respectivamente, ver figura 1.6. *Vg*, es el gen encargado de dar la identidad de alas a las células del disco (Williams et al., 1991), que interactúa con *Scalloped (Sd)*, proteína que actúa como factor de transcripción y activa la diferenciación del ala (Halder and Carroll, 2001). La expresión de *vg* está controlada por dos potenciadores: el **Boundary Enhancer (vgBE)** y el **Quadrant Enhancer (vgQE)** (Zecca and Struhl, 2007). El *vgBE* actúa a partir del segundo e inicios del *L3* en las células de la frontera D/V por medio de la vía *Notch* (Neumann and Cohen, 1996). Estas células proliferan y con la actividad de *Wg*, *Dpp* y *Vg* (Zecca and Struhl, 2010) mantienen la expresión de *vg* a través del *vgQE* fuera de la frontera D/V, expandiendo así el patrón de *Vg* y por tanto el tamaño del tejido alar.

1.3. Crecimiento por proliferación

El crecimiento del disco imagal alar depende de dos procesos, la proliferación y el reclutamiento celular. La proliferación contribuye al crecimiento y por tanto al tamaño final del ala en un 80 %, mientras que el reclutamiento lo hace en un 20 % (Muñoz-Nava et al., 2020), figura 1.7. La proliferación celular requiere el acceso a nutrientes de la larva, después de la ingesta y digestión de alimentos, éstos pasan a la hemolinfa, que es el fluido equivalente a la sangre en los insectos. Las células productoras de insulina,

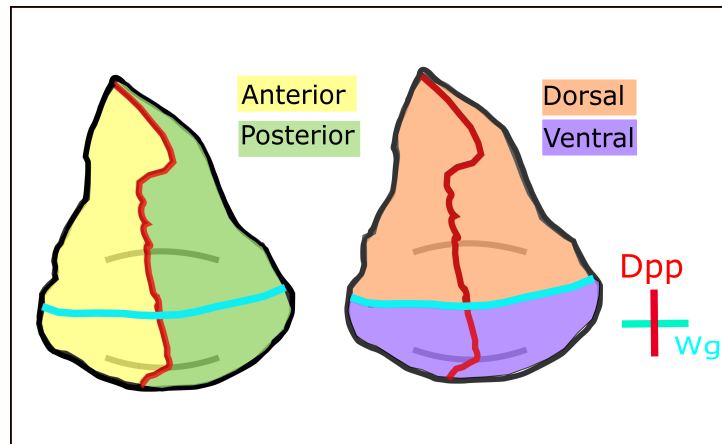


Figura 1.5: Compartimentos del disco alar organizados por los morfógenos *Wg* y *Dpp*.

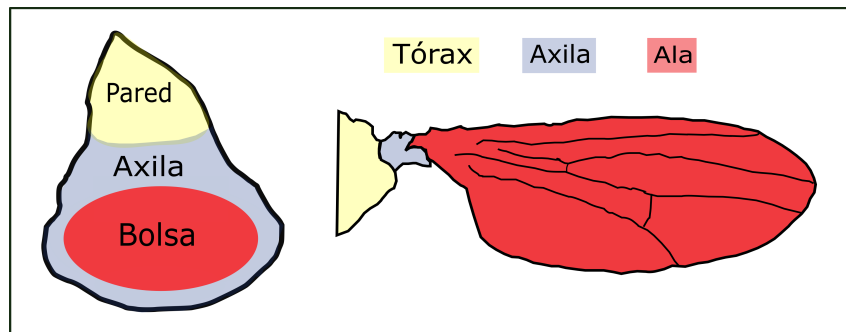


Figura 1.6: Regiones del disco de ala y su destino de diferenciación en la mosca adulta.

las **IPC**² se encuentran en varios tejidos pero principalmente en un grupo de neuronas, estas células sintetizan y secretan a los **Péptidos Parecidos a la insulina (IIP)**³, promoviendo así la liberación de hormonas como la **insulina** y la **ecdisona** (Hietakangas and Cohen, 2009; Otero-Moreno et al., 2016) que a su vez promueven el crecimiento celular a través de la activación de fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt y la vía del complejo de rapamicina 1, **TORC1**⁴ (Romero-Pozuelo et al., 2017), la producción de ribosomas vía el factor de transcripción **Myc** y su actividad por medio de la cinasa S6K la cual fosforila

²Por sus siglas en inglés Insulin-Producing Cells

³Por sus siglas en inglés Insulin-Like Peptides.

⁴Por sus siglas en inglés Target Of Rapamycin

a la proteína ribosómica S6, esta regulación promueve la biosíntesis de proteínas y el consecuente crecimiento celular, ver figura 1.8. De hecho, se ha demostrado que en las larvas que crecen en condiciones de mala nutrición hay una reducción en la actividad de TOR, de tal forma que el fenotipo de las alas de larvas que crecieron desnutridas es similar al de aquellas en las que genéticamente se inhibe la vía de TOR (Parker and Struhl, 2015), como se muestra en la figura 1.9.

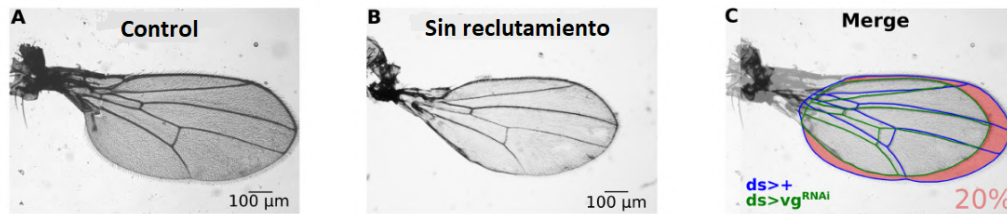


Figura 1.7: Contribución de la proliferación y el reclutamiento celular al tamaño final del ala. Imagen modificada de (Muñoz-Nava et al., 2020).

El aumento en los niveles de aminoácidos, carbohidratos y lípidos en la hemolinfa es sentido por células del **cuerpo graso**, que es el órgano equivalente al hígado y tejido adiposo de mamíferos. El cuerpo graso actúa como integrador de la información nutricional, se ha demostrado que la falta de al menos uno de los aminoácidos básicos de la dieta es suficiente para evitar la señal de saciedad en la larva y con ello la activación del anabolismo y el crecimiento (Colombani et al., 2003). En particular la ausencia de metionina se ha ligado como un posible regulador del crecimiento (Cutforth and Gaul, 1999; Ouattara et al., 2016). Además del cuerpo graso se requiere que los discos imagales tengan el transportador de aminoácidos **slimfast**. Mutaciones en slimfast dan como resultado animales de menor tamaño, con desarrollo retardado y desarreglos metabólicos (Bradley and Leivers, 2003; Mirth and Riddiford, 2007). El cuerpo graso se comunica con células secretoras en el cerebro a través de mensajeros hormonales cuando hay nutrientes en la hemolinfa, para promover el anabolismo y el crecimiento. De esta manera, el cuerpo

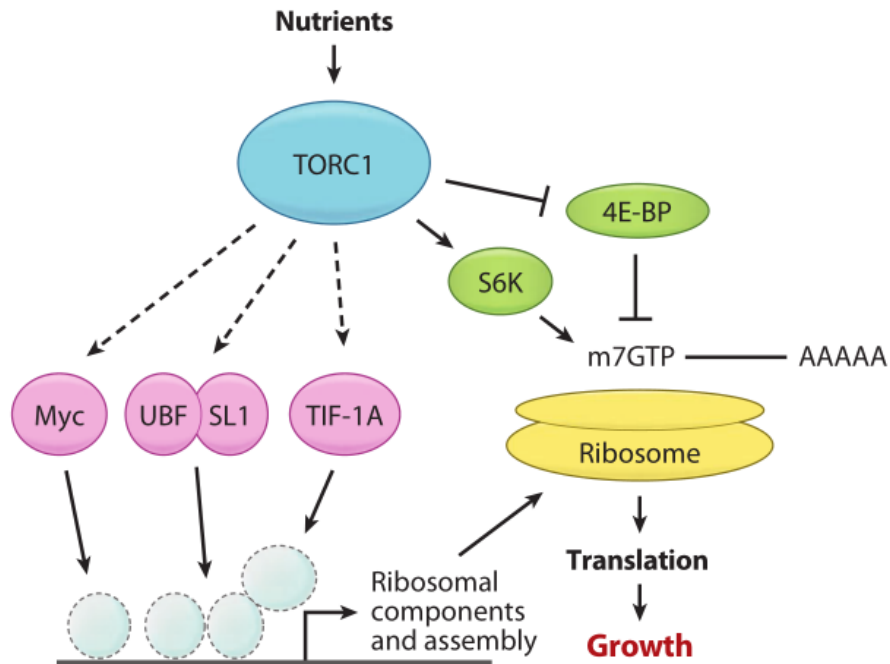


Figura 1.8: Regulación de la biosíntesis de proteínas y biogénesis de ribosomas por TORC1. Imagen modificada de (Hietakangas and Cohen, 2009).

graso comunica al cerebro el estado nutricional del organismo sensando aminoácidos y posiblemente también grasas y carbohidratos, ver figura 1.10.

Si bien la dieta guía de manera sistémica a la proliferación celular, existen mecanismos que lo hacen a nivel de órgano y no tienen una dependencia directa de la nutrición. Ejemplo de estos mecanismos son: los morfógenos, las interacciones mecánicas y la polaridad celular. La proliferación de la células del disco de ala está controlado intrínsecamente por las vías de señalización de **Wnt** y **BMP**, que tienen a sus homólogos en *Drosophila*, *Wingless (Wg)* y *Decapentaplegic (Dpp)* respectivamente, los cuales guían la proliferación celular por medio de la regulación del oncogén **dMyc**, que es homólogo en *Drosophila* de la familia de oncogenes **MYC** en mamíferos, su función está implicada tanto en proliferación como en diferenciación y apoptosis (Henriksson and Lüscher, 1996; Gallant,

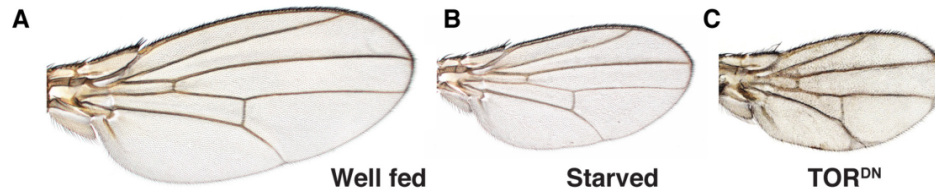


Figura 1.9: Efectos de la inhibición de la vía de TOR y la desnutrición. Imagen modificada de (Parker and Struhl, 2015).

2013).

dMyc se encuentra regulado por las vías de *Wg*, *Dpp* y la vía de la insulina (de la Cova et al., 2004; Doumpas et al., 2013; Prober and Edgar, 2000). La vía de *Wg* inhibe a *dMyc* en la zona del disco más cercana al borde D/V donde no hay proliferación (Johnston et al., 1999; Duman-Scheel et al., 2004). A su vez *Wg* induce la expresión de *dMyc* en otras partes del disco de ala (Herranz et al., 2008). Por su parte, la vía de *Dpp* activa indirectamente la expresión de *dMyc* a través de la represión de **Brinker (brk)**, uno de los represores directos de *dMyc*, de esta manera se inhibe la proliferación en la bolsa del disco (Doumpas et al., 2013). Mientras que la vía de la Insulina disminuye los niveles de *dMyc* a nivel post-transcripcional en condiciones de estrés por falta de nutrientes (Parisi et al., 2011). Los mutantes homocigotos en *Drosophila* de *dMyc* son viables, pero sus fenotipos están relacionados con defectos en el crecimiento. Las moscas son de menor tamaño, con células más pequeñas (Gallant, 2013). Mientras que la sobre-expresión de *dMyc* aumenta el tamaño celular (Johnston et al., 1999). Más aún, cuando se induce daño en el disco de ala, se observa que *dMyc* contribuye al crecimiento en el proceso de regeneración (Smith-Bolton et al., 2009).

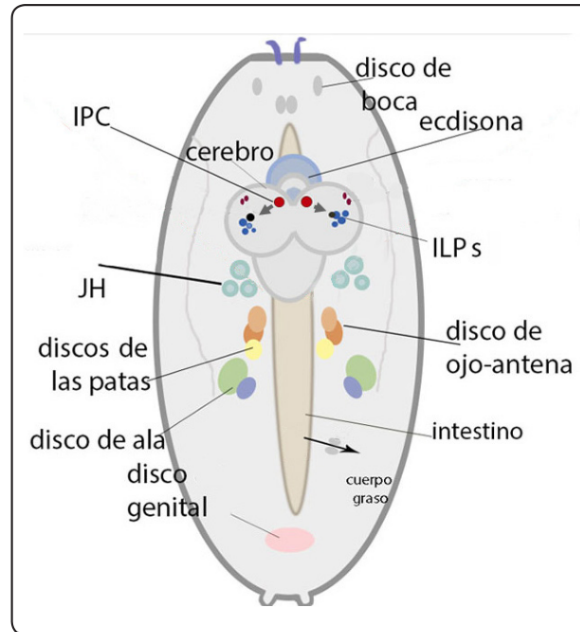


Figura 1.10: Esquema de un embrión de *D. melanogaster*. Muestra: cerebro, intestino, discos imagales y a las IPCs, así como las influencias hormonales que tendrán las IPC durante el periodo larvario. Imagen modificada de (Otero-Moreno et al., 2016).

1.4. Crecimiento por reclutamiento

El reclutamiento celular es un mecanismo de desarrollo en el que una población de células diferenciadas recluta a sus células vecinas a su destino de diferenciación. Como hemos mencionado, el gen encargado de dar identidad de ala a las células de la bolsa del disco es *vg* y por tanto es el factor de diferenciación en este modelo animal. En este caso las células que expresan *vg* en respuesta a la señalización de la vía de **Notch** (Irvine and Vogt, 1997) adyacentes al borde D/V, es decir, aquellas que activan al *vgBE* y *vgQE* se denominan **células reclutadoras**, mientras que las células ubicadas en la periferia de la bolsa son competentes a expresar *vg* como resultado de la señal de reclutamiento se denominan **células reclutables** (Parker and Struhl, 2020). La señal del reclutamiento celular en el disco alar de *Drosophila* consiste en la expansión del patrón de expresión

de *vg* a través del establecimiento de la **Polaridad Celular Planar (PCP)**, que es el proceso por el que las células de un tejido se coordinan para orientar sus componentes y así polarizarse en el plano de un tejido. La señal de reclutamiento comienza por la polarización de las protocadherinas **Fat (Ft)** y **Dachsous (Ds)** que forman uniones heterotípicas (*Ft-Ds*) en las membranas celulares debido a la actividad de **four-jointed (fj)**, que es una cinasa del aparato de Golgi que tiene la capacidad de fosforilar a ambas protocadherinas promoviendo una mayor afinidad de *Ft* por *Ds*, mientras que disminuye la afinidad de *Ds* por *Ft* (Ishikawa et al., 2008), por tanto, el complejo *Ft-Ds* es estable cuando *Ft* es fosforilado por *Fj* e inestable cuando *Ds* es el fosforilado (Brittle et al., 2010). Esta interacción entre las protocadherinas de células adyacentes forma la unión adherente que da estabilidad y rigidez al epitelio que se está desarrollando. Establecida la unión adherente, en la célula reclutable se promueve la polarización de la miosina atípica **Dachs (D)** hacia la membrana donde se une con *Ds*, al mismo tiempo *D* secuestra a la cinasa **Warts (Wts)** consigo a la membrana, de esta forma *Wts* no puede fosforilar al factor de transcripción **Yorkie (Yki)** (Misra and Irvine, 2016), luego, *Yki* no fosforilado se une al factor de transcripción **Scalloped (Sd)** y el complejo *Yki-Sd* ingresa al núcleo (Goulev et al., 2008), donde promueve la expresión de *vg* transcripcionalmente (Zecca and Struhl, 2010), lo que da como resultado el reclutamiento de una célula al dominio de *Vg* (Baena-Lopez, 2003; Zecca y Struhl, 2007a, 2007b; Zecca y Struhl, 2010), ver figura 1.11.

Existen otros ejemplos de reclutamiento celular en diferentes especies, tanto vertebrados como invertebrados (Muñoz-Nava et al., 2021). El oído interno del ratón y el pollo, donde las regiones que formarán las estructuras receptoras de los sonidos y la aceleración, crecen por proliferación y reclutando células que las rodean a través de la vía de Notch (Morrison et al., 1999; Kiernan et al., 2006), la glándula tiroidea del ratón, donde las células del primordio de esta estructura no proliferan y crecen únicamente por el reclutamiento de células mesodermales cercanas (Fagman et al., 2006; Lania et al., 2009)

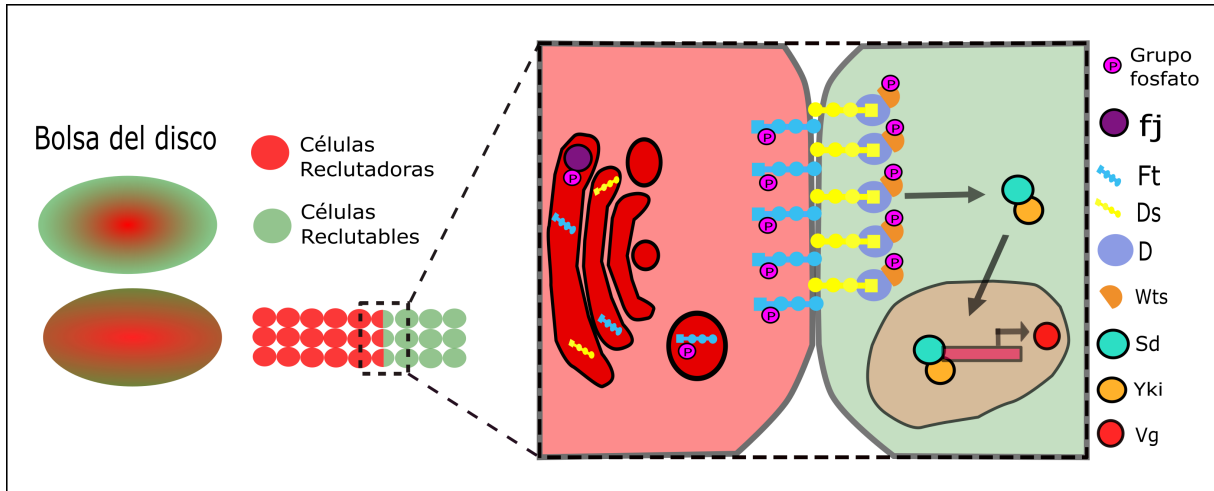


Figura 1.11: Reclutamiento celular en el disco alar.

y también se ha descrito otro tipo de reclutamiento celular en el riñón (Lindström et al., 2018) y en el corazón de vertebrados (Alfano et al., 2019).

1.5. Control de tamaño en *Drosophila melanogaster*

Gracias a las herramientas genéticas desarrolladas en *D. melanogaster* ha sido posible entender como funcionan algunos de los mecanismos que contribuyen al control del tamaño final de las alas de este insecto. Ahora sabemos como influyen las perturbaciones que se hacen sobre factores intrínsecos o extrínsecos que guían el crecimiento por proliferación de las células del disco alar y como estas afectan el tamaño final del ala (Cruz et al., 2009) (ver figura 1.12). Dado que, existe una relación lineal entre el tamaño (área) de la bolsa de un disco imagal alar y el tamaño final que tendrá el ala proveniente de esa región del disco (Matamoro-Vidal et al., 2018), por tanto cualquier perturbación realizada sobre las células de la bolsa del disco se puede estudiar cualitativa y cuantitativamente en las alas del insecto cuando llega a su etapa adulta.

Sobre el control de tamaño Peter J. Brayant y Patrice Levinson en 1984, en el que

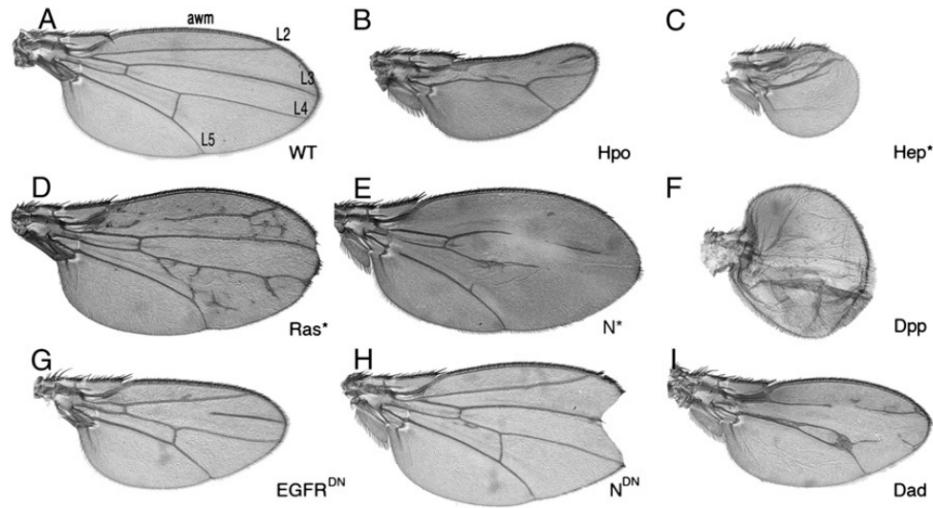


Figura 1.12: Fenotipos de alas obtenidos de la perturbación en vías de señalización involucradas en proliferación. Imagen adaptada de (Cruz et al., 2009).

se trasplantaron discos alares de tercer estadio larvario a la cavidad abdominal de moscas hembras adultas fertilizadas, y observaron que los discos trasplantados alcanzaron el tamaño final que tendrían en desarrollo silvestre (Bryant and Levinson, 1985). Este resultado postuló la existencia de un control de tamaño intrínseco por medio del cual el disco tiene la información necesaria para crecer hasta cierto tamaño sin necesidad de los factores extrínsecos de su entorno. Lo anterior fue apoyado por los experimentos de Neufeld y colaboradores realizados en 1998, en donde se modificó la tasa de proliferación de las células del compartimento posterior (P) del disco alar y se mantuvo a las células del compartimento anterior (A) en condiciones silvestres, el valor de la tasa de proliferación silvestre es de una división cada doce horas, con estos experimentos se aceleró la tasa hasta una división cada 9.5 horas y se desaceleró hasta una división cada 18.5 horas. Los resultados mostraron que para el caso de aumento de la tasa las células del compartimento P disminuyeron su tamaño en comparación con las del compartimento A, lo contrario

sucedió con la disminución de la tasa en donde las células del compartimento P aumentaron su tamaño (Neufeld et al., 1998). El resultado global de este experimento muestra que, sin importar si las perturbaciones a la tasa de proliferación son para aumentarla o disminuirla, el disco crece hasta el tamaño que tendría en desarrollo silvestre, como se observa en la figura 1.13, demostrando que estas variaciones en la tasa de proliferación no modifican el tamaño de los compartimentos y por tanto tampoco modifican el tamaño del disco, más bien, se regula el número de células en función del tamaño celular para construir un compartimento de tamaño normal. Sin embargo, el mecanismo por el cual se atenúan las perturbaciones sobre la tasa de proliferación para asegurar el tamaño final del disco continua siendo objeto de estudio.

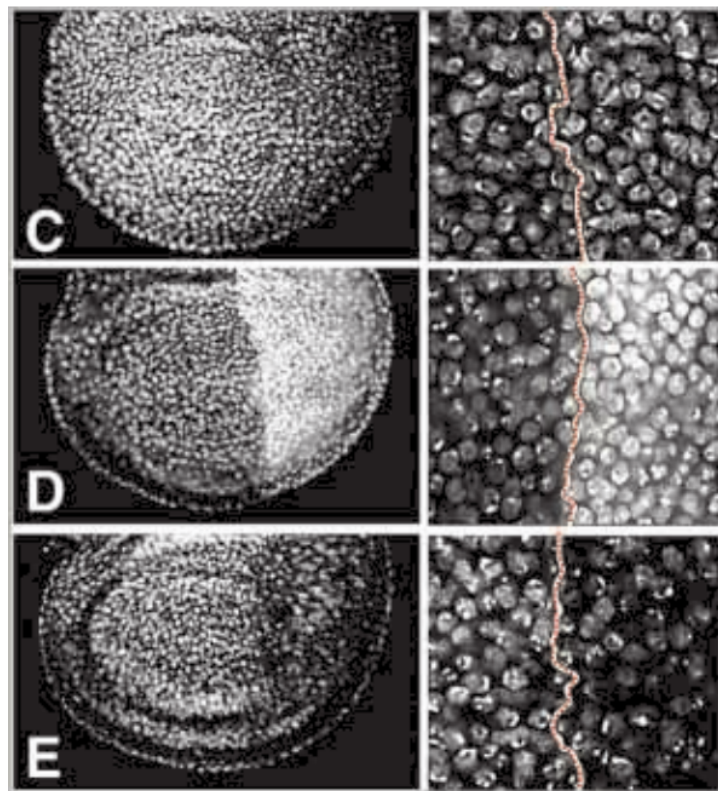


Figura 1.13: Perturbación de la tasa de proliferación en las células del compartimento posterior. Imagen adaptada de (Neufeld et al., 1998).

Para tratar de entender los mecanismos que otorgan robustez al tamaño final del disco alar se han realizado varios experimentos manipulando la tasa de proliferación de cada compartimento. En 2006, Martin y Morata generaron discos alares en los que el compartimento anterior y el posterior tenían diferentes tasas de crecimiento: el compartimento anterior era silvestre y de “crecimiento rápido”, mientras que el compartimento posterior era heterocigoto para una mutación Minute y de “crecimiento lento”. (Martín y Morata, 2006). Los autores encontraron que el compartimento anterior de crecimiento rápido era relativamente grande al principio del desarrollo, pero redujo de manera autónoma su tasa de crecimiento hacia el final del desarrollo, de modo que al pupar, tanto el compartimento anterior como el posterior tenían el mismo tamaño que los discos imagales de las larvas control. Con base en estos datos, los autores propusieron que los compartimentos individuales funcionan como unidades de desarrollo independientes y que el crecimiento y desarrollo de un compartimento no está vinculado al del otro (Martin y Morata, 2006). Sin embargo, experimentos más recientes en los que también se han perturbado los compartimentos del disco de tal forma que estos tienen diferentes tasas de proliferación, se ha encontrado que los compartimentos coordinan su crecimiento para alcanzar el tamaño final que alcanzaría de forma normal (Gokhale et al., 2016).

El crecimiento por proliferación es guiado en gran manera por la cantidad de hormona ecdisona que la larva recibe durante su tercer estadio, previo a que se lleve a cabo la muda a pupa. Niveles basales de ecdisona durante el tercer estadio promueven la proliferación de las células de la bolsa del disco (Herboso et al., 2015; Parker and Shingleton, 2011; Mirth et al., 2009), posteriormente un pulso de ecdisona al final del L3 desencadena la formación del pupario larvario haciendo que las células arresten su ciclo celular en la fase G2, si este pulso de ecdisona ocurre antes se acorta el tiempo de desarrollo larvario L3 dando lugar a animales más pequeños (Mirth et al., 2005), un segundo pulso de ecdisona ocurre 24 horas después de la formación del pupario promoviendo el arresto final del ciclo

celular (Guo et al., 2016; Stevens et al., 1980). Experimentos recientes realizados en discos alares, en los que se eliminan los pulsos de ecdisona pero se mantiene el nivel basal para promover la proliferación, muestran que las células pueden continuar proliferando hasta 12 horas después de la formación del pupario, posteriormente la proliferación disminuye en un periodo de 24 horas hasta detenerse por completo (Strassburger et al., 2020), entonces aunque se sabe que el mecanismo extrínseco del control de tamaño se rige por los niveles de ecdisona esto no explica que mecanismo biológico determina que la proliferación de las células se detenga.

1.6. Planteamiento del problema

El mecanismo de control de tamaño en el disco alar depende de factores intrínsecos y extrínsecos. El mecanismo extrínseco depende directamente de la cantidad de hormona ecdisona que la larva recibe durante su tercer estadio, previo a que se lleve a cabo la muda a pupa. Niveles basales de ecdisona durante el tercer estadio promueven la proliferación de las células de la bolsa del disco (Herboso et al., 2015, Parker and Shingleton, 2011, Mirth et al., 2009). Al mismo tiempo un pulso de ecdisona al final del tercer estadio desencadena la formación del pupario larvario haciendo que las células arresten su ciclo celular en la fase G2, si este pulso de ecdisona ocurre antes se acorta el tiempo de desarrollo larvario dando lugar a animales más pequeños (Mirth et al., 2005), un segundo pulso de ecdisona ocurre 24 horas después de la formación del pupario promoviendo la detención final del ciclo celular (Guo et al., 2016, Stevens et al., 1980). Otros experimentos realizados en discos alares, en los que se eliminan los pulsos de ecdisona pero se mantiene el nivel basal para promover la proliferación, muestran que las células pueden continuar proliferando hasta 12 horas después de la formación del pupario, posteriormente la proliferación disminuye en un periodo de 24 horas hasta detenerse por completo (Strassburger et al., 2020), entonces, aunque se sabe que el mecanismo extrínseco se rige por los niveles de ecdisona que promueven la proliferación, aún no se entiende cuál es el mecanismo que la detiene.

Por otro lado el experimento clásico de (Bryant and Levinson, 1985), en el que se trasplantaron discos de segundo y tercer estadio en hembras silvestres adultas y se observó que los discos proliferaron hasta alcanzar el tamaño final que en desarrollo normal y los experimentos en los que se perturba el desarrollo del disco modificando la tasa de proliferación de alguno de los compartimentos anterior o posterior (Martín and Morata, 2006, Gokhale et al., 2016, Neufeld et al., 1998) y se observa que el tamaño final de los discos se mantiene constante con respecto al que se alcanza en desarrollo sin perturbación, todos estos experimentos ponen de manifiesto que existe un mecanismo intrínseco de control de tamaño. Aunque esta claro que para mantener la robustez del tamaño del disco ambos mecanismos deben estar activos y coordinados durante todo el tiempo de desarrollo aún desconocemos bajo que mecanismo se adquiere esta sincronización, más aún, que mecanismo biológico determina que la proliferación de las células se detenga.

En este trabajo exploramos la dinámica entre los procesos de proliferación y reclutamiento celular modelando matemáticamente lo que ocurre en el disco cuando las células disponibles para reclutarse se acaban, es decir, cuando el proceso de reclutamiento termina. Con base en el trabajo de Baena Lopez (Baena-Lopez and García-Bellido, 2006) que muestra que cuando se sobre expresa *vg* en las células de la bolsa su proliferación disminuye y esto afecta el tamaño y forma final de las alas, proponemos que cuando no hay más células disponibles para reclutarse, las células de la bolsa interpretan que el reclutamiento ha terminado como una señal para dejar de proliferar y utilizamos herramientas de modelación matemática para mostrar que esta coordinación entre la proliferación y el reclutamiento ofrece un mecanismo temporal de regulación del tamaño final del órgano.

Capítulo 2

Resultados

2.1. Construcción del modelo matemático

Para explorar la dinámica entre la proliferación y el reclutamiento celular construimos un modelo matemático en ecuaciones diferenciales ordinarias. El modelo parte de las siguientes suposiciones:

- En la bolsa del disco imagal alar hay dos poblaciones celulares que están creciendo con sus respectivas tasas de proliferación, una población corresponde a células diferenciadas a tipo ala, que expresan el gen selector de ala vg a las cuales denotamos como células \mathbf{W} y se dividen a una tasa $\alpha_{\mathbf{W}}$. La segunda población está constituida por células que expresarán vg debido al reclutamiento y están localizadas en la parte periférica de la bolsa, es decir, alrededor de las células W , estas células se dividen a una tasa $\alpha_{\mathbf{R}}$ y las denotaremos por células \mathbf{R} (ver figura 2.1). Es posible aproximar el crecimiento de ambas poblaciones celulares con una función exponencial (Mao et al., 2013), correspondiente a los primeros términos de las ecuaciones 2.1.

$$\begin{aligned}\frac{dW}{dt} &= \alpha_w W + F(W, R) \\ \frac{dR}{dt} &= \alpha_R R - F(W, R)\end{aligned}\tag{2.1}$$

Para la construcción de la función $F(W, R)$ que nos permite relacionar la proliferación y el reclutamiento consideramos aspectos geométricos y condiciones experimentales que ocurren durante el tiempo de desarrollo, las cuales se describen en los siguientes puntos.

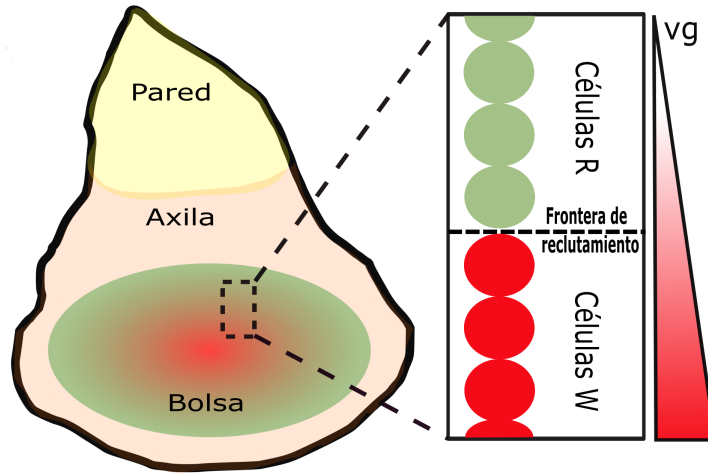


Figura 2.1: Consideraciones geométricas. Imagen adaptada de (Díaz-Torres et al., 2022).

- Consideramos que las células W y R son círculos con diámetros iguales, entre las cuales existe una frontera de reclutamiento en donde ambas poblaciones celulares interactúan, de tal forma que solo las células W en la frontera tienen contacto con células R adyacentes para reclutarlas. También consideramos que el lugar geométrico que describe la frontera de reclutamiento es una circunferencia que aumenta su área en función del número de células W que contiene (ver figura 2.2). Para estimar la cantidad de células W en la frontera de reclutamiento consideramos lo siguiente:

El área total de la bolsa es:

$$A = \pi R^2 \quad (2.2)$$

con perímetro:

$$P = 2\pi R \quad (2.3)$$

Sea a el área de cada célula W :

$$a = \pi r^2 = \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 = \pi \frac{d^2}{4} \quad (2.4)$$

con d el diámetro celular.

Por otro lado, podemos expresar el área de la bolsa en función del número de células W que hay en cualquier momento del crecimiento de la bolsa $W(t)$ y el área unitaria de cada una, esto es:

$$A = W(t)a \quad (2.5)$$

Igualando la ecuación 2.2 con 2.5, y despejando el radio total de la bolsa R , se obtiene:

$$R = \sqrt{\frac{W(t)\pi \frac{d^2}{4}}{\pi}} \quad (2.6)$$

Luego, el número de células en la frontera de reclutamiento se obtiene al dividir el perímetro de la frontera entre el diámetro celular, esto es:

$$\frac{P}{d} = \frac{2\pi R}{d} = \frac{2\pi \sqrt{\frac{W(t)\pi \frac{d^2}{4}}{\pi}}}{d} = \pi \sqrt{W(t)} \quad (2.7)$$

Con lo anterior proponemos que $F(W, R)$ es proporcional a $\pi\sqrt{W}$, que representa el número de células W que pueden reclutar. Sin embargo, $F(W, R)$ debe tener unidades de tasa, por lo que definimos la fracción de células en la frontera de reclutamiento que se reclutarán por unidad de tiempo como ρ .

En el análisis anterior, supusimos que la bolsa del disco es circular, sin embargo si la frontera de reclutamiento es considerada como una elipse podemos demostrar que

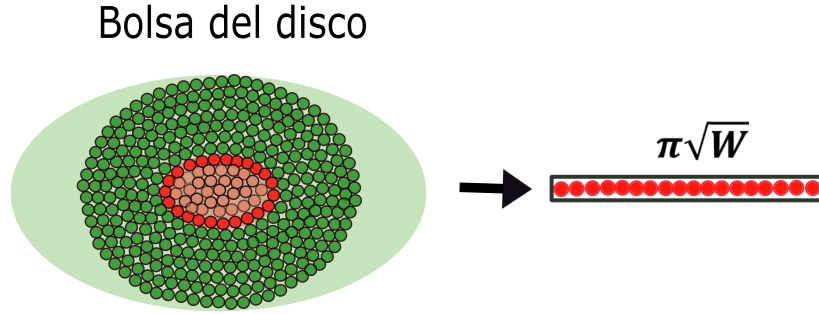


Figura 2.2: Número de células W en el frente de reclutamiento.

la dinámica de reclutamiento sigue siendo proporcional a $\sqrt{W(t)}$ aún cambiando la geometría y el número de contactos entre las células (ver apéndice A).

- Además de las células reclutadoras, el reclutamiento está limitado por las células reclutables disponibles, para establecer esta dependencia introdujimos al sistema una función de *Hill* que considera el número de células R disponibles para reclutarse y la cantidad de células W reclutadoras, a saber $\frac{R}{k\pi\sqrt{W}+R}$, donde el parámetro k modula la cantidad de células que están disponibles para ser reclutadas. Cuando $k = 1$ el número de células que se pueden reclutar es igual a el número de células W que hay en la frontera de reclutamiento, esto es, $R = \pi\sqrt{W}$, en estas condiciones la capacidad de reclutamiento está en un 50 % de su máximo. Con estas suposiciones el sistema queda descrito por dos ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden no lineales.

$$\frac{dW}{dt} = \alpha_W W + \pi\rho\sqrt{W}\left(\frac{R}{k\pi\sqrt{W} + R}\right) \quad (2.8)$$

$$\frac{dR}{dt} = \alpha_R R - \pi\rho\sqrt{W}\left(\frac{R}{k\pi\sqrt{W} + R}\right) \quad (2.9)$$

- Las condiciones iniciales W_0 y R_0 fueron estimadas por el Dr. Luis Manuel Muñoz Nava, usando imágenes de inmunofluorescencia de discos de ala de tercer estadio

tratados con anticuerpos para Vg, Wg y DAPI (que marca núcleos celulares) usando imágenes previamente obtenidas (Muñoz-Nava et al., 2020). Empleando el software de análisis de imágenes ImajeJ, se determinó la bolsa alar de cada disco en el canal teñido con DAPI utilizando la herramienta de selección de elipses, tomando como referencia para el eje menor los pliegues que limitan esta región en los bordes ventral y dorsal (solo las células dentro de estos límites son competentes para expresar Vg). Para eliminar el ruido de fondo de Vg, se seleccionó un rectángulo en una región del disco donde no se espera la presencia de Vg (fuera de la bolsa) y se hizo un promedio de las intensidades dentro de esa área para tener un valor umbral único para determinar si la intensidad de Vg de un píxel es ruido de fondo. Después se binarizaron los píxeles dentro de la bolsa, usando la herramienta de análisis de partículas en ImageJ para definir los píxeles positivos de Vg, se tomó el parámetro de excentricidad entre 0 y 1 para admitir las diferentes formas de los núcleos, luego, todos los píxeles resultantes dentro de la bolsa del ala positivos a Vg corresponden a células W y los negativos a células R (ver figura 2.1) (ver apéndice D). Lo anterior se realizó para observar un curso temporal de las células W y R y en particular se considero el mismo análisis con imágenes de discos de tercer estadio temprano para estimar las condiciones iniciales, dando como resultado $W_0 = 225$ y $R_0 = 169$.

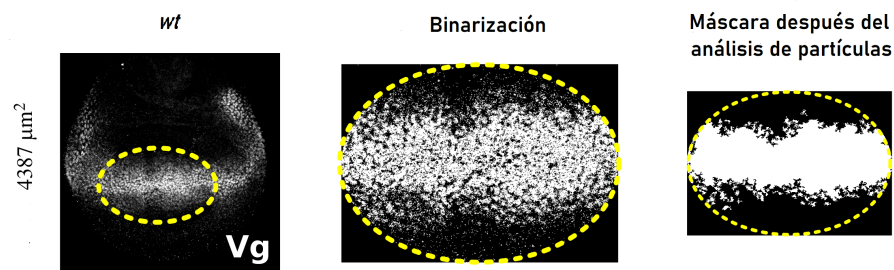


Figura 2.3: Procesamiento de discos alares para la estimación de condiciones iniciales. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022).

2.2. Exploración del modelo

Puesto que nuestro modelo matemático es no lineal, es difícil (o imposible) encontrar una solución analítica exacta, por lo que utilizamos aproximaciones analíticas y soluciones numéricas empleando el software MATLAB, los códigos que se desarrollaron se encuentran en el apéndice D. Como se dijo anteriormente es posible aproximar el crecimiento de las células W a una función exponencial, por lo que demostramos que existe una cota superior que corresponde a una función exponencial (apéndice B) (ver figura 2.4A). Para estimar cuál es la contribución del reclutamiento al crecimiento exponencial, es decir, la tasa de proliferación celular, hicimos una transformación logarítmica a la ecuación 2.8 para obtener la pendiente m que contiene la contribución de la proliferación (α) y la de el reclutamiento (ϵ) (ver figura 2.4B). Por lo anterior, el tamaño final de la población W viene dado aproximadamente por (ver figura 2.4C):

$$W(t) \approx W_0 \exp^{(\alpha_W + \epsilon)t} \quad (2.10)$$

Considerando que la proliferación celular en la bolsa del disco es de aproximadamente 2 divisiones cada 24 horas (Mao et al., 2013) ($2div/1440min = 0,0014 \text{ div}/min$) y que además es uniforme, fijamos $\alpha_W = \alpha_R = 0,0014 \text{ div}/min$ (ver figura 2.4) con la finalidad de hacer una exploración preliminar del modelo. Una estimación numérica de ϵ considerando los parámetros anteriores es de $1,0 \times 10^{-4} min^{-1}$, que es aproximadamente $\frac{1}{10}$ de la tasa de proliferación. Esta tasa de crecimiento relativa es consistente con la contribución experimental previamente reportada del reclutamiento al tamaño del disco (Muñoz-Nava et al., 2020).

Mientras que W es una función creciente del tiempo, la dinámica de las células R depende de los parámetros del modelo. Una exploración analítica del caso particular en que $\alpha_W = \alpha_R = 0,0014div/min$ (apéndice C) revela tres comportamientos diferentes de la población de células R en el espacio de parámetros (ver figura 2.4D). Primero, cuando R

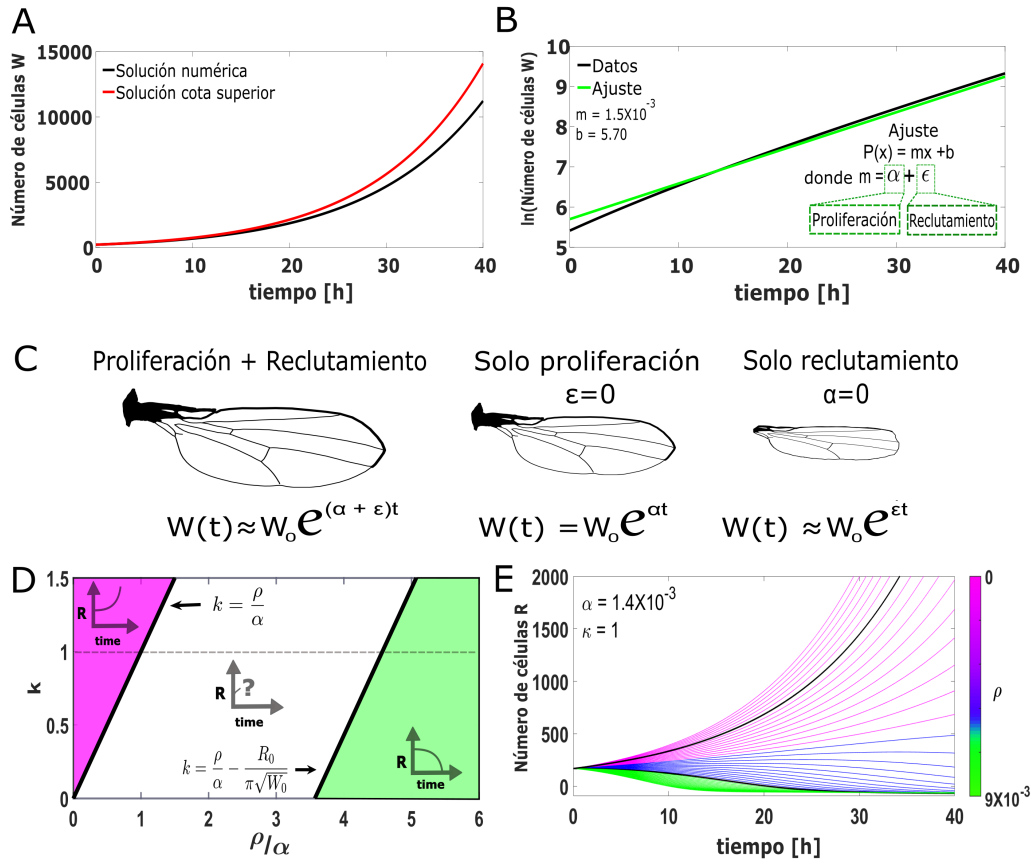


Figura 2.4: Contribución del reclutamiento al crecimiento de las alas de *Drosophila*. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022).

es una función creciente del tiempo $k > \frac{\rho}{\alpha}$ (región rosa en la figura 2.4D), tanto W como R crecen indefinidamente, una condición que no es consistente con el desarrollo normal del disco, porque sabemos que la población R eventualmente se extingue. Segundo, R es una función decreciente del tiempo cuando $k < \frac{\rho}{\alpha}$ (región verde en la figura 2.4D). No fue posible demostrar analíticamente el comportamiento dinámico de R en la región $\frac{\rho}{\alpha} > k > \frac{\rho}{\alpha} - \frac{R_0}{\pi\sqrt{W_0}}$ (región blanca en figura 2.4D), sin embargo se demostró que inicialmente $(\frac{dR}{dt}|_{t=0})$, R es una función creciente del tiempo. Finalmente exploramos numéricamente la dinámica del parámetro ρ fijando $k = 1$ (línea punteada en figura 2.4D); encontramos que

para algunos valores de ρ , R es una función creciente del tiempo para todo t, mientras que para otros aumenta durante algún tiempo y luego disminuye (figura 2.4E, curvas azules).

Experimentalmente la dinámica de W y R se ajusta a las predicciones de nuestro modelo (ver figura 2.5). Observamos que W aumenta exponencialmente durante gran parte del desarrollo, pero su tasa de crecimiento disminuye al final del tercer estadio. Por el contrario, el número de células R aumenta ligeramente o permanece constante durante las primeras etapas del reclutamiento antes de que comiencen a disminuir, un comportamiento que es consistente con los resultados de nuestro modelo para la región blanca del espacio de parámetros en la figura 2.4 y curvas azules en la figura 2.4. La disminución en la tasa de crecimiento de la población W corresponde con la disminución en el número de células R, lo que sugiere que la tasa de proliferación de células W y la tasa de reclutamiento podrían estar relacionadas.

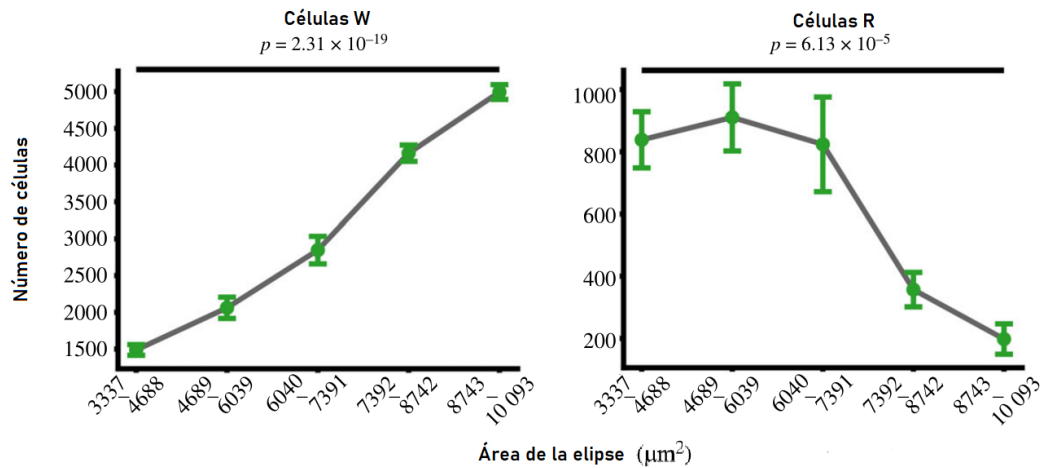


Figura 2.5: Curso temporal de población de células W y R. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022).

2.3. Optimización del modelo

Puesto que observamos que a medida que la población de células W aumenta exponencialmente al mismo tiempo que la población de células R disminuye, propusimos que quizás la duración del reclutamiento depende de la tasa de proliferación de las células W. Para evaluar esta hipótesis realizamos un proceso de optimización en los parámetros del modelo en el cual el número de células W que habrá al final del reclutamiento se mantenga aproximadamente constante ante perturbaciones en la tasas de proliferación de W. Para esto consideramos parejas ordenadas (ρ, k) en el espacio de parámetros correspondientes a un rango de tiempo de 24 a 36 horas, tiempo en el que sabemos que las células R se extinguen debido al reclutamiento (Muñoz-Nava et al., 2020), (ver figura 2.6).

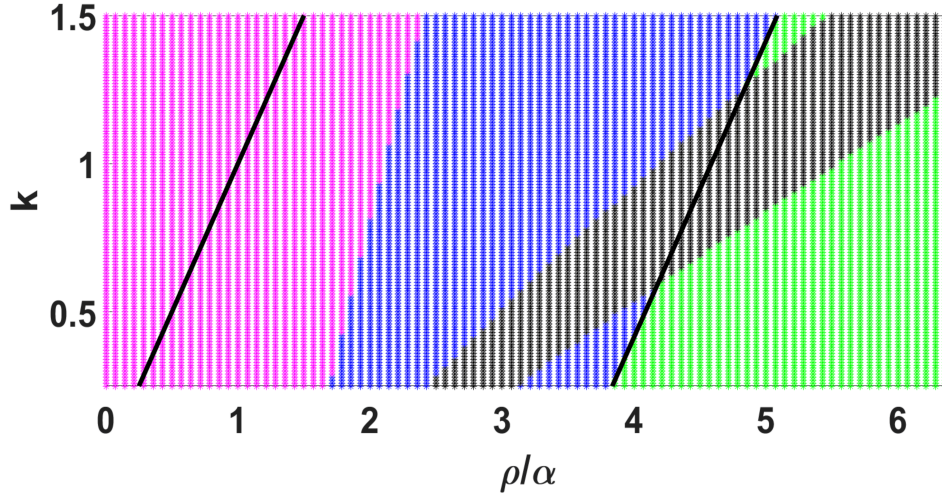


Figura 2.6: Espacio de parámetros. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022)

Para cada pareja (ρ, k) variamos numéricamente la tasa de proliferación de células W dentro del intervalo $[0.75\alpha_0, 1.25\alpha_0]$, es decir, 25 % por abajo y arriba del valor silvestre de la tasa de proliferación α_{W0} . Este intervalo de perturbaciones es similar a la variabilidad normal reportada experimentalmente (Mao et al., 2013). Luego, resolvimos el sistema de ecuaciones 2.8 y 2.9 y calculamos el tiempo en el que se termina el reclutamiento (t_R)

definido como el tiempo en el que la población de células R prácticamente desaparece ($R < 1$), la tasa de reclutamiento (ϵ) y posteriormente calculamos el tiempo necesario para que el número de células W al final del reclutamiento ($W(t_R)$) se mantenga aproximadamente invariante ($t_R^* = \frac{C}{\alpha_W + \epsilon}$), donde α_W es la proliferación perturbada de W y C es una contante en la que el tiempo de reclutamiento coincide con el valor del tiempo no perturbado (t_{R0}), luego calculamos la diferencia entre estos valores $|t_R - t_R^*|$ para cada perturbación (ver figura 2.7) y definimos el conjunto de parámetros óptimo que minimiza esta diferencia.

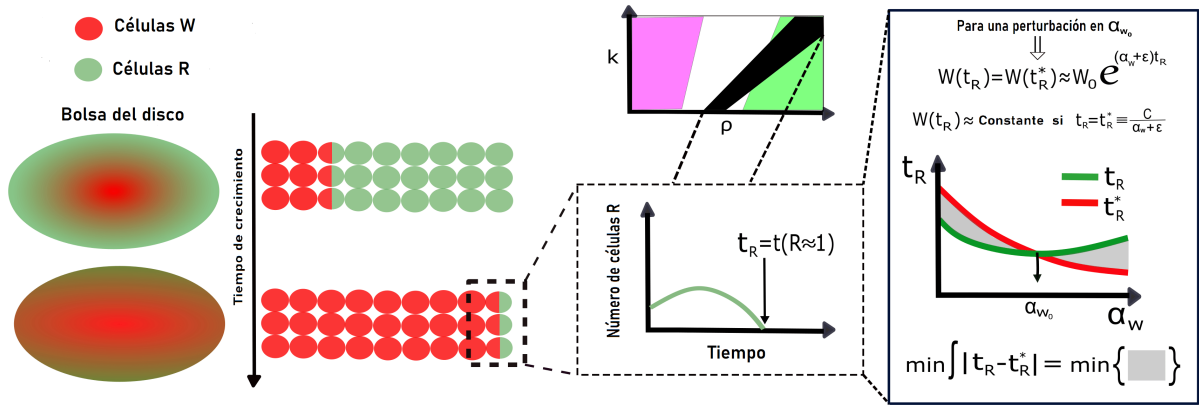


Figura 2.7: Optimización. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022)

2.4. Análisis de perturbaciones

El proceso de optimización arrojó los parámetros: $\rho_{op} = 3,5 \times 10^{-3}$ y $k_{op} = 0,25$. Con estos valores fijos, se realizaron perturbaciones sobre la tasa de proliferación α_W del modelo para investigar como es el comportamiento de t_R y $W(t_R)$ ante estas perturbaciones. En particular cuando se perturba α_W por encima de su valor silvestre las células R se terminan más rápido en comparación con las perturbaciones que se realizan por debajo del valor silvestre (ver figura 2.8).

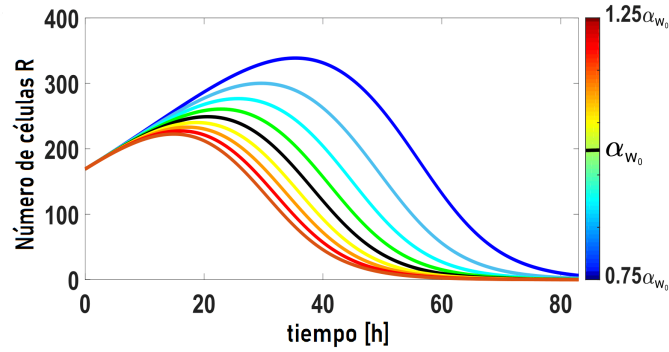


Figura 2.8: Perturbaciones en α_W . Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022)

Este comportamiento se ve reflejado en el tiempo de duración del reclutamiento t_R , como se observa en la figura 2.9A. Por otro lado observamos que $W(t_R)$ se mantiene aproximadamente invariante ante las perturbaciones en α_W (ver figura 2.9B). Lo anterior se puede interpretar como un mecanismo de control de tamaño de la población W, que regula el tamaño final del ala de la mosca, a través de la modulación de la duración del tiempo de proliferación.

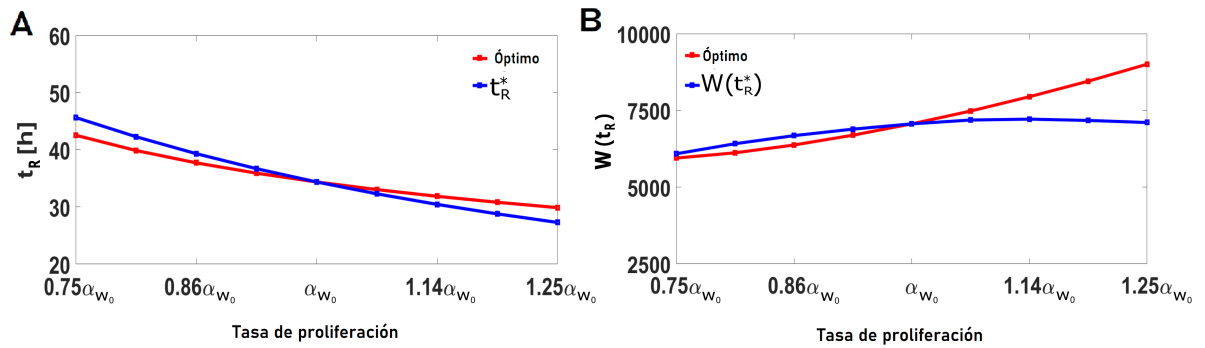


Figura 2.9: Dinámica bajo perturbaciones en α_W . Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022)

Es importante señalar que los resultados anteriores fueron obtenidos al perturbar únicamente la proliferación de la población de células W y fijando el valor de α_R en el valor

silvestre. Sin embargo cuando se perturban simultáneamente las tasas α_W y α_R encontramos que el control de tamaño se pierde, ya que a diferencia del caso anterior no ocurre una compensación del tiempo de reclutamiento (ver figura 2.10). Esta observación numérica ofrece una forma para validar experimentalmente el mecanismo propuesto, ya que bajo estas condiciones siempre se esperaría tener discos de tamaño mayor comparados con los silvestres (ver figura 2.10B, la línea punteada representa el tamaño final esperado para discos silvestres W_{f0}).

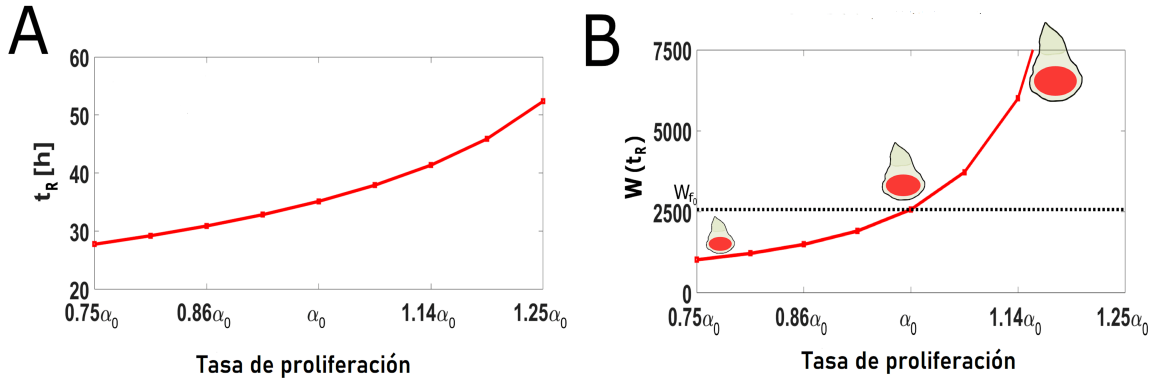


Figura 2.10: Dinámica bajo perturbaciones simultáneas. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022).

2.5. Modelo modificado

Una desventaja importante del modelo descrito por las ecuaciones 2.8 y 2.9 es que la función W no está acotada, es decir, no alcanza un tamaño final, sino que este es definido por t_R . Para proponer una explicación biológica del mecanismo que podría detener el crecimiento modificamos el termino que describe a la proliferación de las células W de la ecuación 2.8, introduciendo una función que supone que el crecimiento proliferativo de W depende del número de células R , de tal forma que se desacelera después de cruzar cierto

umbral μ y conforme disminuye el número de células R:

$$\alpha_W(R) = \frac{\alpha_W R}{\mu + R} \quad (2.11)$$

El parámetro umbral $\mu = 72$, se obtuvo del curso temporal descrito en la figura 2.5, en donde se observa que la pendiente de la línea que conecta al tercer y al cuarto punto cae aproximadamente a la mitad con respecto a la pendiente que conecta el cuarto y el quinto punto. Entonces estimamos este parámetro como el número de células R en el cuarto punto en la figura 2.5 panel derecho, asumiendo nuestra condición inicial de $R_0 = 169$. La expresión 2.11 tiene la propiedad de que cuando $R \gg \mu$ entonces $\alpha_W(R) \approx \alpha_W$ y $\alpha_W(R) \rightarrow 0$ cuando $R \rightarrow 0$, es decir, W crece exponencialmente, como en nuestro modelo anterior, mientras haya células R para reclutar, pero se induce el arresto de la proliferación de W cuando empiezan a extinguirse las células R. Esto podría concebirse mecánicamente suponiendo que las células R secretan una Señal X necesaria para mantener la proliferación de las células W (ver figura 2.11A). Esta modificación nos permite explorar la hipótesis de que al modular la velocidad de reclutamiento bajo perturbaciones en la tasa de proliferación celular de W, se podría controlar el tamaño final del disco alar el cual sí existe en este modelo.

En nuestro primer modelo W era una función exponencial creciente del tiempo, en esta versión modificada W se aproxima a un valor final siempre que $R \rightarrow 0$ cuando $\alpha_W \in [0,75\alpha_0, 1,25\alpha_0]$, como se muestra en la figura 2.11B y C, comportamiento que es congruente con los resultados obtenidos del curso temporal de las células W y R (figura 2.5). Usando los parámetros obtenidos en la optimización del modelo observamos que es posible recuperar la propiedad de nuestro modelo original de que las perturbaciones en α_W son compensadas inversamente por la duración del reclutamiento (figura 2.12A), pero ahora el tiempo en el que finaliza el reclutamiento (t_R) es también el tiempo (t_f) en el que W alcanza su tamaño final (W_f). De hecho, notamos que permanece casi constante en un rango de perturbaciones en α_W (figura 2.12B, la línea punteada representa el tamaño final

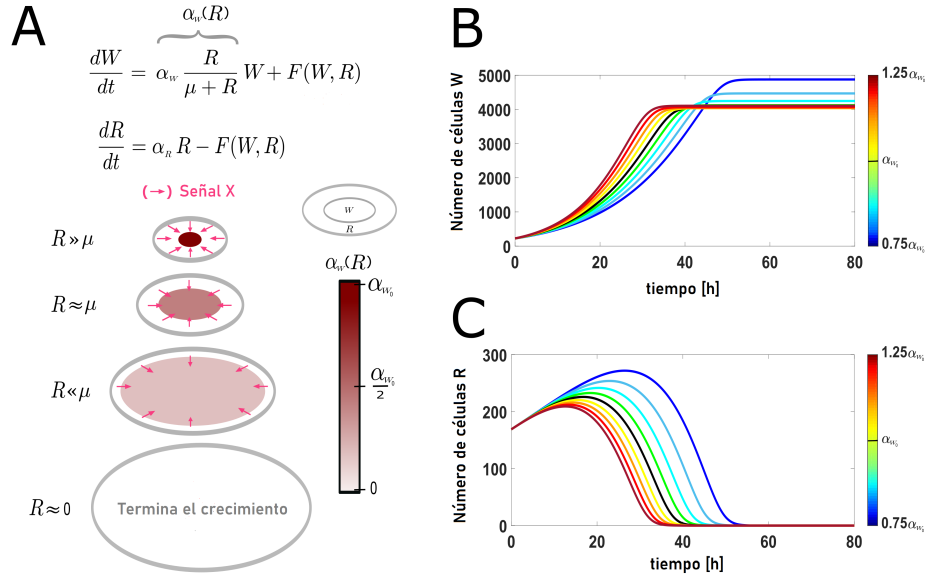


Figura 2.11: Modelo modificado. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022).

esperado para discos silvestres W_{f0}), lo que respalda nuestra hipótesis de que la dinámica entre la proliferación celular y el reclutamiento funciona como un mecanismo de control de crecimiento en el disco imagal alar.

Al igual que en nuestro primer modelo, cuando se realizan perturbaciones en el modelo modificado sobre las dos tasas de proliferación α_W y α_R , se observa que el mecanismo de control de tamaño se pierde, ya que en este escenario no ocurre una compensación del tiempo de reclutamiento (ver figura 2.13A). Esto resulta en un tamaño final W_f siempre mayor o menor dependiendo del sentido de la perturbación (ver figura 2.13B, la línea punteada representa el tamaño final esperado para discos silvestres W_{f0}).

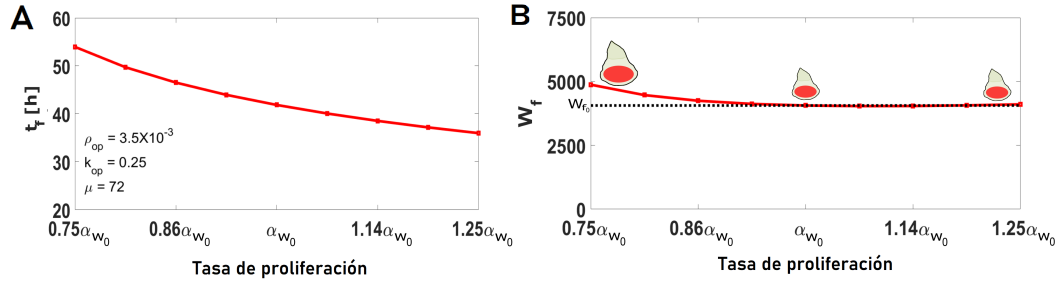


Figura 2.12: Dinámica bajo perturbaciones en α_W , modelo modificado. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022).

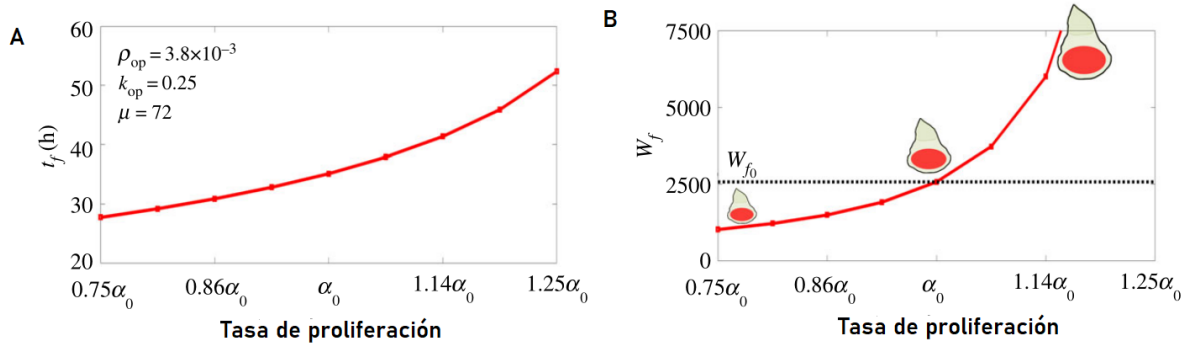


Figura 2.13: Dinámica bajo perturbaciones simultáneas del modelo modificado. Imagen adaptada de (Diaz-Torres et al., 2022).

2.6. Discusión

El reclutamiento celular es un mecanismo de crecimiento presente en diversos organismos en desarrollo (Muñoz-Nava et al., 2021), sin embargo, se desconoce si tiene un papel específico en el control de tamaño. En el ala de *Drosophila*, el reclutamiento celular tiene una contribución menor al crecimiento en comparación con la proliferación celular, lo que sugiere que quizás funciona como un mecanismo de control fino que brinda precisión al tamaño final del órgano, sin embargo no se ha explicado cómo podría funcionar me-

canísticamente. En este trabajo utilizamos un enfoque de modelado matemático, guiado por datos experimentales, para mostrar que la tasa de proliferación de las células comprometidas a ser de tipo ala está acoplada al tiempo de duración del reclutamiento de las células en la bolsa del disco alar. De tal forma que cuando la proliferación de las células W es más rápida o más lenta, el proceso de reclutamiento termina más tarde o más temprano que en la condición de desarrollo normal. Además, si el final del reclutamiento también induce el final del crecimiento, como se plantea en este trabajo, este acoplamiento daría como resultado un mecanismo intrínseco compensatorio subyacente al control robusto de tamaño que amortigua las perturbaciones en las tasas de proliferación celular, un hecho que se observó experimentalmente hace más de 20 años (Neufeld et al., 1998), pero aún no se ha explicado mecanísticamente.

Gran parte de la investigación sobre el mecanismo intrínseco de control de tamaño en el disco alar de *Drosophila* se ha centrado en el estudio de los gradientes de los morfógenos que coordinan el patrón de la proliferación celular durante el desarrollo en una amplia variedad de contextos (Rogers and Schier, 2011). Como se ha descrito en este trabajo, en el ala de *Drosophila*, Dpp y Wg establecen gradientes de señalización y orquestan el patrón de crecimiento del tejido (Restrepo et al., 2014; Matsuda and Affolter, 2017). La señalización de Dpp no solo promueve el crecimiento, sino que también garantiza que la proliferación celular sea espacialmente uniforme (Milán et al., 1996; Schwank et al., 2008; Wartlick et al., 2011) y está implicada en modelos de detención del crecimiento. Por ejemplo, el modelo de pendiente de morfógeno propuso que si la proliferación celular es promovida por diferencias en la concentración de Dpp, se expande a medida que el disco crece y el gradiente de Dpp se vuelve cada vez más plano, eventualmente se detiene el crecimiento cuando la pendiente cae por debajo de una concentración umbral (Lawrence and Struhl, 1996). Si bien los datos experimentales respaldan que la proliferación celular es promovida por diferencias en la expresión de Dpp y se inhibe cuando los niveles de

señalización de Dpp son espacialmente planos (Rogulja and Irvine, 2005), también se ha observado que el gradiente de Dpp parece crecer a medida que crece el disco (Fried and Iber, 2014; Ben-Zvi et al., 2011; Zhu et al., 2020), proceso que se conoce como escalamiento y que contradice al modelo de pendiente de morfógeno. Otros estudios experimentales y teóricos sugieren que el escalamiento del gradiente y la proliferación uniforme son consistentes con un modelo en el que un aumento temporal en los niveles de señalización de Dpp impulsa la proliferación celular (Wartlick and González-Gaitán, 2011; Hidalgo et al., 2017). Finalmente, otro trabajo ha considerado al gradiente de Dpp en un modelo de retroalimentación mecánico en el que las células que reciben al morfógeno proliferan hasta que se alcanza un umbral de tensión mecánica (Shraiman, 2005; Hufnagel et al., 2007; Aegerter-Wilmsen et al., 2007).

A pesar de que estos estudios muestran una posible explicación de la señal de paro en el control del crecimiento mediado por morfógenos, no está claro cómo el disco amortigua las fluctuaciones en las tasas de proliferación celular. Debido a que las células en el disco del ala se dividen cada 6 a 10 h durante un período de 4 días (Mao et al., 2013), perturbaciones relativamente pequeñas en las tasas de proliferación celular. Por ejemplo entre un 10% a 20% de sus valores normales, podrían generar diferencias relativamente grandes en el tamaño final del ala (Martín et al., 2009; Willecke et al., 2006). Nuestro trabajo propone una nueva estrategia de control del crecimiento en el que las perturbaciones en las tasas de proliferación celular de las células comprometidas a ser de tipo alar se acoplan a la duración del reclutamiento celular en el disco del ala de *Drosophila*. Además, se ha observado que el mecanismo de reclutamiento esta involucrado en procesos de regeneración, pues experimentos en los que se ha inducido daño sobre el epitelio de la bolsa del disco alar por medio de ablación láser (Smith-Bolton et al., 2009), muestran que el daño provoca una respuesta inmediata encaminada a mantener la integridad del epitelio y reparar la región ablacionada, incluyendo un aumento en la proliferación

celular para compensar la pérdida de células y el reemplazo de las células muertas por otras que son reclutadas de fuera del área dañada (Herrera et al., 2013). Por lo anterior proponemos que el reclutamiento de células podría ser un mecanismo general de respuesta a alteraciones en el crecimiento del disco, debidas a perturbaciones en la división celular.

Por otro lado, el planteamiento de nuestro modelo matemático se basa en algunos supuestos que merecen una discusión más detallada. Supusimos que el final del proceso de reclutamiento es también el final del crecimiento, partiendo de nuestra observación experimental de que el crecimiento del dominio de Vg se hace significativamente más lento cuando cae la disponibilidad de células reclutables. Sin embargo, podría argumentarse que la disminución en la tasa de crecimiento de W se debe a que W carece de nuevas células para reclutar y no a una disminución en las tasas de proliferación celular α_W . Por otra parte, estimamos que el reclutamiento contribuye alrededor de $1/10$ a la tasa de crecimiento de W , mientras que la disminución observada en la pendiente en los dos últimos puntos de datos en la figura 2.5 es al menos de $2/3$. Por lo tanto, la simple exclusión del reclutamiento celular en el crecimiento de las células W no puede explicar la disminución observada en su tasa de crecimiento. Un apoyo adicional a nuestra suposición proviene de un estudio experimental anterior, que muestra que cuando Vg es sobreexpresado, tanto en células W como en R simultáneamente, la proliferación celular se reduce drásticamente (Baena-Lopez and García-Bellido, 2006). ¿Cómo podría la ausencia de células R inducir mecanísticamente la terminación del crecimiento? Una explicación es que las células R proporcionan un factor de crecimiento no identificado (Señal X) que es necesario para la proliferación de las células W (figura 2.11A). De hecho, trabajos recientes han revelado que el arresto de la proliferación celular se basa en una disminución de la señalización de TORC1 (Strassburger et al., 2021), a través de una vía de señalización desconocida. Por lo tanto, una propuesta atractiva que es consistente con nuestro modelo es que la señal que mantiene la expresión de TORC1 autónoma proviene de las células reclutables y

disminuye a medida que el número de estas células desaparece con el reclutamiento celular.

Otro aspecto a tener en cuenta sobre nuestro modelo, es el rango de perturbaciones en el que funciona razonablemente el control de tamaño. Como se observa en la figura 2.12B, aunque cada perturbación en la tasa de proliferación de las células W se compensa con un efecto inverso en la duración del reclutamiento para el rango de perturbaciones silvestres, el control de tamaño final W_f ocurre en un rango limitado de perturbaciones en la tasa de proliferación α_W . Por lo tanto, este mecanismo de control temporal se limita a un rango de perturbaciones en α_W alrededor del 25 % por encima o por debajo de la tasa de proliferación silvestre, situación que debe ser probada experimentalmente. Además, notamos que las perturbaciones tienen un efecto asimétrico en el tamaño final; en particular, el efecto es mucho mayor cuando α_W se reduce que cuando se incrementa, figura 2.12B. En el modelo esto puede ser un efecto de la falta de linealidad, sin embargo, también se ha observado biológicamente. Por ejemplo, en ectotermos, como *Drosophila*, reducir la temperatura en la que se crían los animales, reduce las tasas generales de crecimiento, pero da como resultado animales con órganos más grandes (Ray, 1960; Von Bertalanffy, 1960), como predecimos en la figura 2.12B. En *Drosophila*, este efecto es asimétrico, cuando la temperatura de crianza varía por encima o por debajo de la condición estándar (25°C); por ejemplo, criar animales a 16,5°C da como resultado un aumento del 33 % en las alas adultas, mientras que un aumento a 29°C solo da como resultado alas ligeramente más pequeñas (alrededor del 5 %) (French et al., 1998).

Finalmente, nuestro modelo matemático asume una geometría circular tanto para la bolsa del disco como para las células que hay en él, que es esencial para aumentar el número de células reclutables y acelerar el proceso de reclutamiento. Dado que W crece exponencialmente, también lo hace la frontera de reclutamiento. ¿Cuánto afecta la geometría del sistema a las implicaciones del modelo? Encontramos que la función de re-

clutamiento $F(W,R)$ tiene la misma forma cuando se supone una geometría elíptica para la bolsa del disco (ver apéndice A). Sin embargo considerando distinto de uno a el número de contactos celulares que puede tener cada célula podría haber algún cambio en los valores permitidos de contactos celulares, lo que podría modificar el espacio paramétrico del modelo y por tanto la dinámica del mismo.

Capítulo 3

Conclusión

Estudiar el proceso de crecimiento y control del tamaño durante el desarrollo es una cuestión importante, no solo para entender la morfogénesis, sino también para el estudio de la etiología y los mecanismos que promueven algunas enfermedades tales como el cáncer, u otras propias del desarrollo, como defectos congénitos o los casos en los que ocurre la ausencia o atrofia de órganos vitales.

Nuestro trabajo se apoya de la modelación matemática para proponer que la dinámica entre la proliferación y el reclutamiento celular actúa como un mecanismo intrínseco de control de tamaño que ocurre a través de la modulación del tiempo en que se terminan las células disponibles para reclutarse. El modelo propone la existencia de una señal bioquímica emitida por las células R y recibida por las células W para seguir creciendo (por ejemplo un factor de crecimiento) de tal forma que cuando se extinguen las células R esta sustancia deja de producirse y por tanto se termina la señal de crecimiento para las células W.

Nuestros modelos predicen comportamientos diferentes cuando la proliferación celular es perturbada solo en las células W que cuando se ven afectadas ambas tasas de prolife-

ración de las células W y R. En ambos modelos, los resultados muestran que en el primer caso, perturbaciones sobre α_W fijando $\alpha_R = \alpha_{wt}$, hay control de tamaño independientemente de como se defina el tiempo final de crecimiento t_f , mientras que en el segundo caso, perturbaciones sobre $\alpha_W = \alpha_R$, se pierde el mecanismo de control de tamaño. Lo anterior permite un planteamiento experimental de nuestro trabajo, en el que se podrían realizar experimentos en los que se realicen las perturbaciones en los escenarios propuestos por los resultados de los modelos y se analice el tamaño final de las alas de las moscas adultas, esperando observar dos fenotipos diferente correspondientes a la presencia o ausencia del mecanismo de control de tamaño propuesto en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron publicados en la revista *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, con el título: *Coupling cell proliferation rates to the duration of recruitment controls final size of the *Drosophila* wing* (Diaz-Torres et al., 2022), el artículo publicado se encuentra en el apéndice E.

3.1. Perspectiva

El mecanismo de control de tamaño que proponemos podría estudiarse en otros escenarios relacionados con la biología del desarrollo o enfermedades. Por ejemplo, el mecanismo que se presenta en la figura 2.11A podría, en principio, implementarse en cultivos celulares utilizando enfoques de biología sintética. Tal implementación proporcionaría información sobre la viabilidad de este mecanismo en otros contextos de control del crecimiento, como por ejemplo detener el crecimiento tumoral (Lander, 2011). Además, dado que el reclutamiento celular es un mecanismo generalizado en los órganos en desarrollo (Muñoz-Nava et al., 2021), el mecanismo descrito aquí podría estudiarse teórica y experimentalmente en otros organismos.

Nuestro trabajo teórico también orienta sobre cómo nuestra hipótesis de control de ta-

maño podría probarse experimentalmente utilizando herramientas genéticas disponibles en *Drosophila* (Pan et al., 2009). Específicamente, nuestro modelo matemático predice dos resultados totalmente diferentes sobre las perturbaciones que se realizan en α_W y en $\alpha_W = \alpha_R$ simultáneamente, de tal forma que el modelo predice control solo en el primer escenario, por lo que se propone implementar una perturbación solo sobre la población de células W, después sobre W y R simultáneamente y comparar los resultados extrayendo y midiendo las alas de las moscas adultas. El resultado de los fenotipos contrastantes que se obtendrían con el planteamiento del experimento anterior proporcionaría una forma relativamente sencilla de probar la hipótesis de nuestro modelo.

El control de tamaño también ha sido objeto de estudio para las ciencias físico matemáticas, desde el trabajo de D'Arcy Thompson en donde describió procesos de desarrollo en términos matemáticos y Alan Turing quien introdujo procesos físico-químicos como la difusión para describir el crecimiento (Thompson, 1942; Turing, 1990). Desde entonces los modelos matemáticos han servido para explicar muchos de los mecanismos involucrados en el desarrollo, entre ellos el de control de tamaño (Tomlin and Axelrod, 2007; Green and Batterman, 2017; Sharpe, 2017). Por lo que se podría plantear teóricamente otro modelo matemático, extendiéndolo a ecuaciones diferenciales parciales, para tratar de explicar la dinámica entre la sustancia X que proponemos debe ser generada por las células R y las células W que la reciben, abordando el tema como un problema de ecuaciones de reacción-difusión.

Apéndices

Apéndice A

Geometría Elíptica

Nuestro modelo asume que la bolsa del disco imagal alar es un círculo y por tanto la frontera de reclutamiento es una circunferencia. Sin embargo, la geometría que se observa en el laboratorio es más parecida a la de una elipse; en este apéndice mostramos que la dinámica del modelo no se afecta cuando asumimos una geometría elíptica.

Supongamos que el área de la bolsa del disco es una elipse, con semi-eje mayor a y semi-eje menor b , luego el área y perímetro de la elipse están dados por:

$$A = \pi ab \tag{A.1}$$

$$P \approx 2\pi \sqrt{\frac{a^2 + b^2}{2}} \tag{A.2}$$

Consideremos además que las células W y R pueden tener múltiples contactos celulares entre ellas, de tal forma que pueden ser modeladas por polígonos idénticos de lado n inscritos en un círculo de radio r y área:

$$A_p = \frac{1}{2} nr^2 \sin\left(\frac{2\pi}{n}\right) \tag{A.3}$$

Definiendo el área de la elipse en términos de cada célula, tenemos:

$$A = W A_p = \frac{1}{2} n r^2 \sin\left(\frac{2\pi}{n}\right) \quad (\text{A.4})$$

De la ecuación A.4 podemos expresar el radio de cada célula como función del número total de células W , como sigue:

$$r = \sqrt{\frac{2\pi ab}{W(t)n \sin\left(\frac{2\pi}{n}\right)}} \quad (\text{A.5})$$

Ahora bien, para tomar en cuenta el número de células W que pueden reclutar, es necesario estimar el número de células W que están ubicadas en la frontera de reclutamiento W_p . Estimar esta cantidad es equivalente a dividir el perímetro de la elipse entre el diámetro de cada célula, como sigue:

$$\begin{aligned} W_p &= \sqrt{\frac{P}{2r}} \approx \frac{2\pi \sqrt{\frac{a^2+b^2}{2}}}{2 \sqrt{\frac{2\pi ab}{Wn \sin\left(\frac{2\pi}{n}\right)}}} \\ \Rightarrow W_p &\approx \pi \sqrt{W} \sqrt{\frac{(a^2 + b^2)n \sin\left(\frac{2\pi}{n}\right)}{4\pi ab}} \quad (\text{A.6}) \end{aligned}$$

Por lo tanto, la dinámica del modelo considerando una geometría elíptica es gobernada por el término $\pi\sqrt{W}$.

Apéndice B

Cota superior para $W(t)$

Con el fin de aproximar una función exponencial a las soluciones de $W(t)$, demostramos que si se considera crecimiento debido a la proliferación más el reclutamiento celular simultáneamente, en efecto, las soluciones del sistema muestran un comportamiento exponencial y existe una función cota superior de $W(t)$. Esto fue fundamental para poder realizar la optimización del sistema.

Consideremos el crecimiento de $W(t)$, a saber:

$$\frac{dW}{dt} = \alpha_W W + \rho\pi\sqrt{W} \frac{R}{k\pi\sqrt{W} + R} \quad (\text{B.1})$$

Sea $U = \sqrt{W}$, entonces $\frac{dU}{dt} = \frac{1}{2\sqrt{W}} \frac{dW}{dt}$. Apliquemos este cambio de variable sobre C.1, entonces:

$$2U \frac{dU}{dt} = \alpha_W U^2 + \rho\pi U \frac{R}{k\pi\sqrt{W} + R} \quad (\text{B.2})$$

$$\Rightarrow \frac{dU}{dt} = \frac{\alpha_W}{2} U + \frac{\rho\pi}{2} \frac{R}{k\pi\sqrt{W} + R} \quad (\text{B.3})$$

Note que U es una función creciente de t , por lo que $\frac{R}{k\pi U + R} \leq 1$. Entonces, una cota superior de $U_{sup}(t) \geq U(t)$ t debe satisfacer la ecuación lineal:

$$\frac{dU}{dt} = \frac{\alpha_W}{2}U + \frac{\rho\pi}{2} \quad (\text{B.4})$$

La solución de C.4 esta dada por:

$$U_{sup}(t) = U_0 e^{\frac{\alpha_W}{2}t} - \frac{\rho\pi}{\alpha_W} \quad (\text{B.5})$$

Donde U_0 es una constante de integración. Entonces $(U_{sup}(t))^2 \geq (U(t))^2 = W(t)$. Asumiendo que $(U_{sup}(0))^2 = W_0$ obtenemos $U_0 = \sqrt{W_0} - \frac{\rho\pi}{\alpha_W}$. Por lo tanto una función cota superior para $W(t)$ está dada por:

$$W_{sup}(t) = \left[\left(\sqrt{W_0} + \frac{\rho\pi}{\alpha_W} \right) e^{\frac{\alpha_W}{2}t} - \frac{\rho\pi}{\alpha_W} \right]^2 \quad (\text{B.6})$$

Apéndice C

Dinámica $R(t)$

La dinámica de la población de células R depende de los parámetros. Si la proliferación domina sobre el reclutamiento entonces se espera que las células R crezcan exponencialmente. Por otro lado, si el reclutamiento ocurre más rápido que la proliferación, entonces las células R se extinguirán debido a que eventualmente todas ellas serán reclutadas. Probamos matemáticamente estos comportamientos, bajo la condición $\alpha = \alpha_W = \alpha_R$ y con esto encontramos el espacio paramétrico que define la dinámica del sistema.

Caso 1: $k > \frac{\rho}{\alpha} \Rightarrow \frac{dR}{dt} > 0$.

Consideremos $k - \frac{\rho}{\alpha} > 0$, multiplicamos por $\frac{\alpha R}{k\pi\sqrt{W}+R} > 0$ y obtenemos:

$$\begin{aligned} [R + \pi\sqrt{W}(k - \frac{\rho}{\alpha})] \frac{\alpha R}{k\pi\sqrt{W} + R} &= \frac{\alpha R^2}{k\pi\sqrt{W} + R} + \frac{\pi\sqrt{W}(\alpha k - \rho)R}{k\pi\sqrt{W} + R} \\ &= \frac{\alpha R^2}{k\pi\sqrt{W} + R} + \frac{R\pi\sqrt{W}\alpha k}{k\pi\sqrt{W} + R} - \frac{\rho R\pi\sqrt{W}}{k\pi\sqrt{W} + R} \\ &= \frac{\alpha R^2}{k\pi\sqrt{W} + R} + \frac{(k\sqrt{W} + R)(R\pi\sqrt{W}\alpha k - \pi\sqrt{W}R\rho)}{(k\pi\sqrt{W} + R)^2} \\ &= \alpha R^2 + (R\pi\sqrt{W}\alpha k - \pi\sqrt{W}R\rho) = \alpha R^2 + R\pi\sqrt{W}(\alpha k - \rho) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= \alpha R(R + \pi\sqrt{W}k) - R\pi\sqrt{W}\rho = \alpha R - \frac{R\pi\sqrt{W}\rho}{k\pi\sqrt{W} + R} \\
&\therefore \alpha R - \frac{R\pi\sqrt{W}\rho}{k\pi\sqrt{W} + R} > 0
\end{aligned} \tag{C.1}$$

Para $t = 0$ el lado derecho de B.1 es igual a $\frac{dR}{dt}|_{(t=0)} \therefore \frac{dR}{dt}|_{(t=0)} > 0$

Consideremos ahora $t = \delta t > 0$ donde δt es un cambio infinitesimal en el tiempo. Ahora, como la derivada de R es positiva en $t = 0$ entonces $R_{\delta t} > R_0$ y como la expresión B.1 es válida para $t = \delta t$, obtenemos:

$$\frac{dR}{dt}|_{(t=\delta t)} = \alpha R_{\delta t} - \rho\pi\sqrt{W_{\delta t}} \frac{R_{\delta t}}{k\pi\sqrt{W_{\delta t}} + R_{\delta t}} > 0 \tag{C.2}$$

Iterando este proceso obtenemos una prueba inductiva de que $\frac{dR}{dt} > 0 \forall t$. ■

Caso 2: $k < \frac{\rho}{\alpha} - \frac{R_0}{\pi\sqrt{W_0}} \Rightarrow \frac{dR}{dt} < 0$.

Consideremos: $k < \frac{\rho}{\alpha} - \frac{R_0}{\pi\sqrt{W_0}}$, multiplicando por $\pi\sqrt{W} > 0$ y sumando R_0 obtenemos:

$$k\pi\sqrt{W} + R_0 < \frac{\rho}{\alpha}\pi\sqrt{W_0} - \frac{R_0\pi\sqrt{W_0}}{\pi\sqrt{W_0}} + R_0$$

Multiplicamos la expresión anterior por $\frac{\alpha R_0}{k\pi\sqrt{W_0} + R_0} > 0$.

$$\begin{aligned}
&\Rightarrow (k\pi\sqrt{W} + R_0 - \frac{\rho}{\alpha}\pi\sqrt{W_0}) \left(\frac{\alpha R_0}{k\pi\sqrt{W_0} + R_0} \right) < 0 \\
&\Rightarrow \frac{\alpha R_0^2}{k\pi\sqrt{W_0} + R_0} + (k\pi\sqrt{W_0} - \frac{\rho}{\alpha}\pi\sqrt{W_0}) \left(\frac{\alpha R_0}{k\pi\sqrt{W_0} + R_0} \right) < 0 \\
&\Rightarrow \alpha R_0^2 + R_0\pi\sqrt{W_0}(\alpha k - \rho) = \alpha R_0(R + \pi\sqrt{W_0}k) - R_0\rho\pi\sqrt{W_0} < 0
\end{aligned}$$

$$\Rightarrow \alpha R_0 - \rho\pi\sqrt{W_0} \frac{R_0}{k\pi\sqrt{W_0} + R} < 0 \quad (\text{C.3})$$

Para $t = 0$, el lado izquierdo de la expresión B.3 es exactamente $\frac{dR}{dt}|_{t=0}$ por lo tanto $\frac{dR}{dt}|_{t=0} < 0$.

Consideremos ahora $t = \delta t > 0$ como un cambio infinitesimal en el tiempo, ahora bien, puesto que la derivada de R en $t = 0$ es negativa entonces: $R_{\delta t} < R_0$, además $W_0 > 1$ y $\frac{dW}{dt} > 0 \forall t$ entonces $\sqrt{W_0} < \sqrt{W_{\delta t}}$ y puesto que la expresión B.3 es válida para $t = \delta t$ se tiene:

$$\frac{dR}{dt}|_{(t=\delta t)} = \alpha R_{\delta t} - \rho\pi\sqrt{W_{\delta t}} \frac{R_{\delta t}}{k\pi\sqrt{W_{\delta t}} + R_{\delta t}} < 0 \quad (\text{C.4})$$

Iterando este proceso obtenemos una prueba inductiva de que $\frac{dR}{dt} < 0 \forall t$. ■

Caso 3: $\frac{\rho}{\alpha} > k > \frac{\rho}{\alpha} - \frac{R_0}{\pi\sqrt{W_0}}$.

Para este caso particular no fue posible demostrar analíticamente la dinámica del sistema por lo que se realizó la exploración numérica del espacio paramétrico.

Apéndice D

Códigos

Las simulaciones se realizaron en MATLAB R2016a. Los archivos .m deben seguir el siguiente orden para poder ejecutarse sin problemas.

Sistema de ecuaciones diferenciales del modelo 1.

```
function dz = ODE.system(T,z)
global k
global q
global p
global q2

% Parámetros
% k := Cantidad de células que están disponibles para ser reclutadas
% q := Tasa de proliferación de células W
% q2 := Tasa de proliferación de células R, cuándo las perturbaciones NO
      son simultáneas se fija este parámetro en el valor silvestre
% p := Fracción de células en la frontera de reclutamiento que se
      reclutarán por unidad de tiempo

q2=0.0014
dz=zeros(2,1);
```

```

dz (1) = q*z(1)+pi*p*sqrt(z(1))*((z(2))/(k*pi*sqrt(z(1))+z(2)));
dz (2) = 0.0014*z(2) pi*p*sqrt(z(1))*((z(2))/(k*pi*sqrt(z(1))+z(2)));
end

```

Sistema de ecuaciones diferenciales del modelo 2.

```

function dz = ODE_system(T, z)
global k
global q
global p
global g
global q2

%g := Mitad del valor máximo de las células R necesarias para reducir la
    tasa de crecimiento de W a la mitad

q2=0.0014
dz=zeros(2,1);
dz (1) = q*z(1)*(z(2)/(g+z(2)))+pi*p*sqrt(z(1))*((z(2))/(k*pi*sqrt(z(1))+z
    (2)));
dz (2) = q2*z(2) pi*p*sqrt(z(1))*((z(2))/(k*pi*sqrt(z(1))+z(2)));
end

```

Exploración del espacio paramétrico de los sistemas de ecuaciones.

```

clear all; clc; close all;
global k
global q
global p
global g
global q2

%Se fijan q y q2 en el valor silvestre
s=0; x=0; y=0; q=0.0014; q2=0.0014; g=72;
for j=0.25:0.001:1.5;

```



```

    k = j;
for f=0.0000:0.0001:0.0050;
    p = f;
    [T,Z] = ode45(@ODE_system,[0: 0.1 :5000],[225 169]);
hold on
    T = T/60;
    m1 = find(Z(:,2)>=0 & Z(:,2)<=1,1,'first');
    tf = T(m1,1);
    [mr mp]=max(Z(:,2));
    tm = T(mp,1);
    rf=Z(end,2);
    ri=Z(1,2);

    % Se almacenan las parejas de parámetros (p,k) que cumplen los criterios
    % impuestos para R(t)
    % Se definen las gráficas correspondientes al espacio de parámetros
    if mr == rf;
        s = s+1;
        plot(p/0.0014,k,'m*')
        plot(T,Z(:,2),'m','LineWidth',0.7)
        rhom(s,1:4) = [k,q,p,tm];
    elseif ri == mr;
        x=x+1;
        plot(p/0.0014,k,'g*')
            if tf >= 24 & tf <= 36;
                rhog(x,1:4) = [k,q,p,tf];
            end
        plot(T,Z(:,2),'g','LineWidth',0.7)
    else
        y=y+1;
        plot(p/0.0014,k,'b*')
            if tf >= 24 & tf <= 36;
                rhob(y,1:4) = [k,q,p,tf];
            end
    end

```

```

        end
        plot(T,Z(:,2) , 'b' , 'LineWidth' ,0.7)
    end
end
end

% Se guarda el espacio de trabajo que servirá de insumo para el siguiente c
ódigo
save('RhoSubset.mat' , 'rhob');

```

Análisis de perturbaciones en las tasas de proliferación.

```

clear all; clc; close all;
global k
global q
global p
global g

% Se perturba el parámetro q del sistema (perturbaciones sobre alpha W), o
se hace q=q2 para las perturbaciones simultáneas
% Se almacenan los valores de: Wf, tf, k, p y q
s=0; x=0; y=0; g=72; q2=0.0014; load('RhoSubset.mat');
F=find(RhoSubset(:,4));
M = [RhoSubset(F,1) RhoSubset(F,2) RhoSubset(F,3) RhoSubset(F,4)];
for j=1:length(M);
    k = M(j,1);
    p = M(j,4);
for f=0.0010:0.0001:0.0018;
    q = f;
[T,Z] = ode45(@ODE_system,[0: 0.1 :5000],[225 169]);
hold on
T = T/60;
m1 = find(Z(:,2)>=0 & Z(:,2)<=1,1,'first');
tf = T(m1,1);

```

```

[mr mp]=max(Z(:,2));
tm = T(mp,1);
rf=Z(end,2); ri=Z(1,2); wf=Z(m1,1);
    if mr == rf;
        s = s+1;
        rhom(s,1:3) = [k,q,tm];
    elseif ri == mr;
        x=x+1;
        rhog(x,1:3) = [k,q,p];
        if tf >= 24 & tf <= 36;
            rhog(x,1:3) = [k,q,tf];
        end
    else
        y=y+1;
        if tf <= 60;
            rhob(y,1:4) = [k,p,q,tf];
        end
    end
end
end
end
% Se guarda el espacio de trabajo
save('EndTimes.mat','rhob');

```

Optimización del modelo 1.

```

clear all; clc; close all;
global k
global q
global p

load('RhoSubset.mat.mat'); load('EndTimes.mat'); F=EndTimes;

% Extracción de los valores silvestres
for i=1:length(F);

```

```

    if F(i,3) == 0.0014;
        pr(i,1:4) = [F(i,1) F(i,2) F(i,3) F(i,4)];
    end
end
pr1=find(pr(:,1));
pares = [pr(pr1,1) pr(pr1,2) pr(pr1,3) pr(pr1,4)];

% Ajuste logarítmico
for i=1:length(pares);
    k=pares(i,1); p=pares(i,2); q=pares(i,3);
    [T,Z] = ode45(@ODE_system,[0: 0.1 :5000],[225 169]);
    zv=log(Z(:,1)); t1=T/60;
ajuste = polyfit(t1,zv,1);
pol = polyval(ajuste,t1);
coef(i,1:2) = [ajuste(1,1) ajuste(1,2)];
end
gammawt = [(coef(:,1)/60) 0.0014];

% Ajuste logarítmico de las perturbaciones
for i=1:length(F);
    k=F(i,1); p=F(i,2); q=F(i,3);
    [T,Z] = ode45(@ec_kqdn,[0: 0.1 :5000],[225 169]);
    zv=log(Z(:,1)); t1=T/60;
ajuste2 = polyfit(t1,zv,1);
pol = polyval(ajuste2,t1);
coef2(i,1:2) = [ajuste2(1,1) ajuste2(1,2)];
gamma(i,1) = [abs((coef2(i,1)/60) F(i,3))];
end

% Polinomio tf
j=1; alpha=[0.0010:0.0001:0.0018]';
for i=1:length(pares);
    A(i) = pares(i,4)*(0.0014+gammawt(i));
end

```

```

    vet(i,1:9) = [A(i)./(alpha+gamma(j:j+8))];
    j=j+9;
end

% Minimización de la distancia entre los puntos de los polinomios tf y la
% obtenida al perturbar el sistema, se obtiene el tf óptimo
h=0; g=0; j=1;
for i=9:9:length(F);
    h=h+1;
    yv=F(j:i,4)';
    suma = sum((yv - vet(h,:)).^2);
    sigma=sqrt(suma/(9-1));
    S(h,1:5) = [suma sigma F(i,1) F(i,2) F(i,3)];
    j=j+9;
end
[v ps] = sort(S);

pmin=F((ps(1,2)*9) - 8:ps(1,2)*9,:); vetmin=vet(ps(1,2),:);
pmax=F((ps(end,2)*9) - 8:ps(end,2)*9,:); vetmax=vet(ps(end,2),:);
pm=length(ps)/2; pmed=F((ps(pm,2)*9) - 8:ps(pm,2)*9,:); vetmed=vet(ps(pm,2),:);

hold on
plot(alpha, pmin(:,4), 'sr', alpha, vetmin, 'sr', 'LineWidth', 4)
plot(alpha, pmed(:,4), 'ok', alpha, vetmed, 'ok', 'LineWidth', 4)
plot(alpha, pmax(:,4), 'dg', alpha, vetmax, 'dg', 'LineWidth', 4)

```

Optimización del modelo 2.

```

clear all; clc; close all;
global k
global q
global p

```

```

load('RhoSubset.mat.mat'); load('EndTimes.mat'); F=EndTimes;

% Extracción de valores silvestres
for i=1:length(F);
    if F(i,3) == 0.0014;
        pr(i,1:5) = [F(i,1) F(i,2) F(i,3) F(i,4) F(i,5)];
    end
end
pr1=find(pr(:,1));
pares = [pr(pr1,1) pr(pr1,2) pr(pr1,3) pr(pr1,4) pr(pr1,5)];

% Se crean los vectores con el valor final de W
alpha=[0.0010:0.0001:0.0018]'; j=1;
for i=1:length(pares);
    vew(i,1:9) = pares(i,5);
    j=j+9;
end

% Minimización del polinomio Wf
h=0; j=1;
for i=9:9:length(F);
    h=h+1;
    wmod=F(j:i,5)';
    suma = sum((wmod vew(h,:)).^2);
    sigma=sqrt(suma/(9-1));
    S(h,1:5) = [suma sigma F(i,1) F(i,2) F(i,3)];
    j=j+9;
end
[v ps] = sort(S);
pmin=F((ps(1,2)*9) : ps(1,2)*9,:); vetmin=vew(ps(1,2),:);
pmax=F((ps(end,2)*9) : ps(end,2)*9,:); vetmax=vew(ps(end,2),:);
pm=length(ps)/2; pmed=F((ps(pm,2)*9) : ps(pm,2)*9,:); vetmed=vew(ps(pm,2),:);

```

```

hold on
plot(alpha , pmin (: ,5) , ' : sr ' , alpha , vetmin , ' sk ' , 'LineWidth' ,4)
plot(alpha , pmed (: ,5) , ' : ok ' , alpha , vetmed , ' ok ' , 'LineWidth' ,4)
plot(alpha , pmax (: ,5) , ' : dg ' , alpha , vetmax , ' dg ' , 'LineWidth' ,4)

```

Cota superior.

```

clear all; clc; close all;
global k
global q
global p

% Solución numérica
k=1; p=0.0039; q=0.0014
[t , z] = ode45(@ODE_system , [0: 0.1 :5000] , [225 169]);
t1=t/60;

% Implementación de la solución analítica
w0=225; r0=169; k=1; rho=0.0039; a=0.0014;
u=((sqrt(w0)+(rho*pi/a))*exp((a/2)*t) (rho*pi/a)).^2;
u2=log(u);

figure
hold on;
plot(t1 , z (: ,1) , 'k' , 'LineWidth' ,4)
x1=log(z (: ,1));
plot(t1 , u , 'r' , 'LineWidth' ,4)

figure
hold on;
plot(t1 , x1 , 'k' , 'LineWidth' ,4)
pp = polyfit(t1 , x1 ,1)
f = polyval(pp , t1);
plot(t1 , f , 'g' , 'LineWidth' ,4)

```

Dinámica de la función $F(W,R)$.

```

clear all; clc; close all;
global k
global q
global p

s=0; x=0; y=0; load('EndTimes.mat.mat');
M = [EndTimes];
for j=length(M):length(M);
    k = M(j,1)
    p = M(j,2);
for i=0.0010:0.0001:0.0018;
    q = i;
[T,Z] = ode45(@ODE_system,[0: 0.1 :5000],[225 169]);
T = T/60;
f = pi*p*sqrt(Z(:,1)).*((d+Z(:,2))./(k*pi*sqrt(Z(:,1))+Z(:,2)))*60;
%To graph figure 4A
hold on
colorbar
if q < 0.0014
    plot(T,f,'b','LineWidth',1.5);
else
    plot(T,f,'r','LineWidth',1.5);
end
end
end
end

```

El siguiente código fue escrito por el Dr. Luis Manuel Muñoz Nava, para cuantificar las células W o vestigial positivas (*vg+*) y las células R o vestigial negativas (*vg-*) en la bolsa del disco alar de *Drosophila* como función del tiempo. Para implementarlo es necesario contar con una versión de Python 3 o superior.

```
import pandas as pd
```



```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from PIL import Image, ImageOps
from pathlib import Path

def x_y_coor_min_max(x_y_coor):
    x_range = [np.min(x_y_coor["X"]), np.max(x_y_coor["X"])]
    y_range = [np.min(x_y_coor["Y"]), np.max(x_y_coor["Y"])]
    return x_range, y_range

def list_of_ellipse_pixels(xy_coor):
    n = 0
    list_of_pixels = []
    y_pixel = xy_coor["Y"][0]
    list_for_y = []
    for_last_y = []
    x_min = np.min(xy_coor["X"])

    for i in xy_coor["Y"]:
        if i == y_pixel:
            list_for_y.append(xy_coor["X"][n] - x_min)
            for_last_y.append(xy_coor["X"][n] - x_min)
            y_pixel = i
        else:
            list_of_pixels.append(list_for_y)
            list_for_y = [xy_coor["X"][n] - x_min]
            y_pixel = i
        n += 1
    list_of_pixels.append(for_last_y)
    return list_of_pixels

# Para obtener el número total de píxeles W, R y estimar células
count_r_pixels = []

```

```

count_w_pixels = []
count_r_cells = []
count_w_cells = []
DV_length_list = []
ellipse_area_list = []
ellipse_area_pixels_list = []

## Imagen binarizada (en RGB)
bin_image = plt.imread("/path/mask_image.png") # Write the path to the file
instead of "path"
xy_coor = pd.read_csv("/path/xy_coor_ellipse.csv") # Write the path to the
file instead of "path"
x_coor, y_coor = x_y_coor_min_max(xy_coor)
list_of_pixels = list_of_ellipse_pixels(xy_coor)
count_vg_pos = 0
count_vg_neg = 0
non_ellipse_pixels = 0

to_test_region = np.zeros(((len(range(y_coor[0], y_coor[1]+1)), len(range(
    x_coor[0], x_coor[1]+1))))))
l = 0
for i in bin_image:
    c = 0
    for n in i:
        if c in list_of_pixels[l]:
            ## If the RGB array is white with (1,1,1), the sum
            is 3 and is a pixel with no Vg
            if np.sum(np.array(n)) == 3:
                to_test_region[l][c] = 0
                count_vg_neg += 1
            ## All the pixels in black are Vg pixels
            else :
                to_test_region[l][c] = 1

```

```

                                count_vg_pos += 1
                    else:
                                non_ellipse_pixels += 1
                    c += 1
            l += 1

r_pixels = count_vg_neg
count_r_pixels.append(r_pixels)
w_pixels = count_vg_pos
count_w_pixels.append(w_pixels)
estimated for a nucleus, this was calculated by hand using the ImageJ
software)
r_cells = count_vg_neg / 70
count_r_cells.append(r_cells)

w_cells = count_vg_pos / 70
count_w_cells.append(w_cells)

micron contains 5.5440 pixels in the images obtained with our microscopy)
DV_length = (y-coor[1] - y-coor[0]) / 5.5440
DV_length_list.append(DV_length)

ellipse_area = (((y-coor[1] - y-coor[0])/2) / 5.5440) * (((x-coor[1]
x-coor[0])/2) / 5.5440) * np.pi
ellipse_area_list.append(ellipse_area)

ellipse_area_pixels = ((y-coor[1] - y-coor[0])/2) * ((x-coor[1] - x-coor
[0])/2) * np.pi
ellipse_area_pixels_list.append(ellipse_area_pixels)

dict_data = {"DV_length" : DV_length_list, "Ellipse_Area_no_pixels" :
ellipse_area_list, "Ellipse_Area" : ellipse_area_pixels_list, "W_cells"
: count_w_cells, "R_cells" : count_r_cells, "W_pixels" : count_w_pixels,

```

```
    "R_pixels" : count_r_pixels}
data_df = pd.DataFrame(dict_data)
print(data_df)
## Se guarda el archivo de trabajo
pd.DataFrame.to_csv(data_df, main_root + "r_w_pixels_and_cells.csv")
```

Apéndice E

Artículo

Research



Cite this article: Diaz-Torres E, Muñoz-Nava LM, Nahmad M. 2022 Coupling cell proliferation rates to the duration of recruitment controls final size of the *Drosophila* wing. *Proc. R. Soc. B* **289**: 20221167. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1167>

Received: 15 June 2022

Accepted: 15 September 2022

Subject Category:

Development and physiology

Subject Areas:

developmental biology, systems biology, theoretical biology

Keywords:

growth control, robustness, cell recruitment, cell proliferation, mathematical modelling, *Drosophila* wing disc

Author for correspondence:

Marcos Nahmad

e-mail: mnahmad@fisio.cinvestav.mx

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.6214778>.

Coupling cell proliferation rates to the duration of recruitment controls final size of the *Drosophila* wing

Elizabeth Diaz-Torres, Luis Manuel Muñoz-Nava and Marcos Nahmad

Department of Physiology, Biophysics, and Neurosciences, Centre for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN), Av. Instituto Politecnico Nacional 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Mexico City 07360, Mexico

MN, 0000-0001-6300-5608

Organ growth driven by cell proliferation is an exponential process. As a result, even small variations in proliferation rates, when integrated over a relatively long developmental time, will lead to large differences in size. How organs robustly control their final size despite perturbations in cell proliferation rates throughout development is a long-standing question in biology. Using a mathematical model, we show that in the developing wing of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, variations in proliferation rates of wing-committed cells are inversely proportional to the duration of cell recruitment, a differentiation process in which a population of undifferentiated cells adopt the wing fate by expressing the selector gene, *vestigial*. A time-course experiment shows that *vestigial*-expressing cells increase exponentially while recruitment takes place, but slows down when recruitable cells start to vanish, suggesting that undifferentiated cells may be driving proliferation of wing-committed cells. When this observation is incorporated in our model, we show that the duration of cell recruitment robustly determines a final wing size even when cell proliferation rates of wing-committed cells are perturbed. Finally, we show that this control mechanism fails when perturbations in proliferation rates affect both wing-committed and recruitable cells, providing an experimentally testable hypothesis of our model.

1. Introduction

During animal development, both extrinsic and intrinsic cues contribute to the final size of organs [1]. Extrinsic cues such as nutrition, hormones and temperature drive changes in overall body size, allowing organisms to adapt to different environmental conditions and energetic resources, while maintaining functional organs [2]. While size adaptation to genetic fluctuations and changing environments is an important driver of phenotypic evolution, organisms also require a robust control of organ size in order to ensure their proper function. Understanding how body plans are designed to permit variability under certain perturbations while robustly reaching a constant organ size under other perturbations is a fundamental problem in developmental biology [3].

The *Drosophila* wing disc is a useful model to investigate the mechanisms underlying developmental patterning and organ growth [4–8]. Previous studies suggest that chemical gradients, nutrition, hormones, and mechanical interactions contribute to extrinsic and intrinsic growth, but how all these signals are integrated to result in a wing of a specific size and shape is little understood [9–13]. While extrinsic factors determine the ultimate size of the wing, transplantation experiments of wing discs into the abdomen of an adult fly or experiments in which pupation is halted and the duration of larval development is increased, show that discs are able to stop growing when a particular size is reached [14–16]. Moreover, wing discs stop growing at the pre-determined size even when cell proliferation or cell sizes are perturbed [17], suggesting the presence of intrinsic mechanisms that robustly control the final size of the organ.

Much of the work on intrinsic organ growth has been driven by the study of morphogen gradients that coordinate patterning and cell proliferation during development in a wide variety of contexts [18]. In the *Drosophila* wing, Decapentaplegic (Dpp) and Wingless (Wg) establish signalling gradients along orthogonal axes of the wing disc [19,–24] and orchestrate tissue patterning and growth [25,–30]. Dpp signalling not only promotes growth but also ensures that cell proliferation is spatially uniform [31–33], and is implicated in models of growth arrest. For instance, the morphogen slope model proposed that if cell proliferation is promoted by spatial differences in Dpp concentrations, as the disc grows and the Dpp gradient becomes increasingly flatter, it eventually arrests growth when the slope drops below a threshold [34]. While experimental data support that cell proliferation is promoted by sharp differences in Dpp expression and proliferation is inhibited when Dpp signalling levels are spatially flat [35], the Dpp gradient seems to scale as the disc grows [33,36–38], arguing against the morphogen slope model. Further experimental and theoretical studies suggested that gradient scaling and uniform proliferation are consistent with a model in which a temporal increase in Dpp signalling levels drives cell proliferation [33,39,40]. Finally, other work has implicated the Dpp morphogen gradient in a mechanical feedback model in which cells that receive the morphogen proliferate until a threshold of mechanical tension is reached [41–43]. On the other hand, the role of the Wg gradient in proliferative growth is more controversial [44,45], perhaps due to the presence of other Wnt ligands in the system [30]. Despite all the literature implicated in morphogen-mediated growth control, it remains unclear how the *Drosophila* wing disc buffers fluctuations in cell proliferation rates. Because cells in the wing disc divide every 6–10 h over a period of 4 days [31,46], relatively small perturbations in cell proliferation rates (e.g. 10–20% of their normal values) could result in relatively large differences in the final size of the wing [47,48].

In addition to cell proliferation, the *Drosophila* wing disc grows through cell recruitment, a patterning-driven growth process by which undifferentiated neighbouring cells are incorporated into the wing tissue by the induction of the wing selector gene, *vestigial* (*vg*) [49–52]. Cell recruitment occurs during the third larval instar and contributes to about 20% of adult wing size [53]. Moreover, neither of cell proliferation nor recruitment rescues normal wing size in the absence of the other, suggesting that they both contribute additively to growth [53]. However, it is unclear whether cell recruitment and proliferation act as independent mechanisms, or if there is a relationship between their rates in order to achieve a specific developmental goal. Here, we provide support that a crosstalk between cell proliferation and recruitment exists, solely based on prior experimental knowledge about the nature of the recruitment signal and the geometry of the system. Moreover, we propose that this interplay may work as a temporal controller of growth. Particularly, we first used our mathematical model to investigate the dynamics of wing-committed versus *recruitable* cells and found parameter sets in which the model reproduces experimental observations. With these parameter values, we then show that the population of recruitable cells extinguishes at a time that is inversely proportional to variations in cell proliferation rates. Furthermore, we provide experimental evidence that exponential wing growth slows down as the number of recruitable cells begins to reduce. By updating

our model to incorporate this observation, we are able to propose that cell recruitment acts as a temporal controller that allows wings to attain a robust final size despite perturbations in proliferation rates of wing cells, but not when the proliferation of both wing-committed and recruitable cells are simultaneously affected.

2. Results

(a) Construction of a mathematical model of cell proliferation and recruitment based in the geometry and growth properties of the *Drosophila* wing primordium

We built a non-spatial dynamical model of the populations of wing-committed, Vg-expressing cells (referred as *W* cells) versus recruitable, pre-wing cells (referred as *R* cells), defined as the cells located within the wing pouch that do not express Vg at the moment, but are primed by Dpp and Wg signalling to express it upon reception of the recruitment signal [51] (figure 1*a*). We start our simulations at the beginning of the third instar (about 80 h after egg laying) where we estimated $W_0 = 225$ and $R_0 = 169$ cells (see Methods). The model takes into account cell proliferation in each cell population (at rates α_W and α_R) and cell recruitment ($F(W,R)$; figure 1*b*), which positively contributes to the number of *W* cells, but at the same rate reduces the number of *R* cells. As supported by experimental evidence [52], we assume that cell recruitment is a radial and contact-dependent process. Therefore, $F(W,R)$ is a function that depends on the geometry of the system and the number of cells located at the recruitment front ($\pi\sqrt{W}$; see electronic supplementary material, figure S1, appendix S1). Since cell death is negligible in wild-type wing discs [54], we do not consider apoptosis in our model. Under these assumptions, the dynamics of $W(t)$ and $R(t)$ are given by the following equations (figure 1*b*; referred as Model 1):

$$\frac{dW}{dt} = \alpha_W W + \rho\pi\sqrt{W} \frac{R}{k\pi\sqrt{W} + R} \quad (2.1)$$

and

$$\frac{dR}{dt} = \alpha_R R - \rho\pi\sqrt{W} \frac{R}{k\pi\sqrt{W} + R}, \quad (2.2)$$

where ρ (rate units) and k (dimensionless) are constants of proportionality (table 1). Since cell proliferation is nearly homogeneous throughout the disc (except at the DV border), we assume that $\alpha_W = \alpha_R$, except when proliferation is perturbed in a particular population of cells (see sections below). Parameter values are either extracted from previous experimental studies or explored numerically (table 1).

(b) Growth by cell proliferation and cell recruitment of the *W* population is approximately exponential

We used our mathematical model to explore the dynamics of cell proliferation and cell recruitment during wing growth. Although the system of equations is nonlinear, it is possible to show analytically that *W* is bounded by an exponential function of time (figure 2*a*; see electronic supplementary material, appendix S2). Thus, we wonder what would the

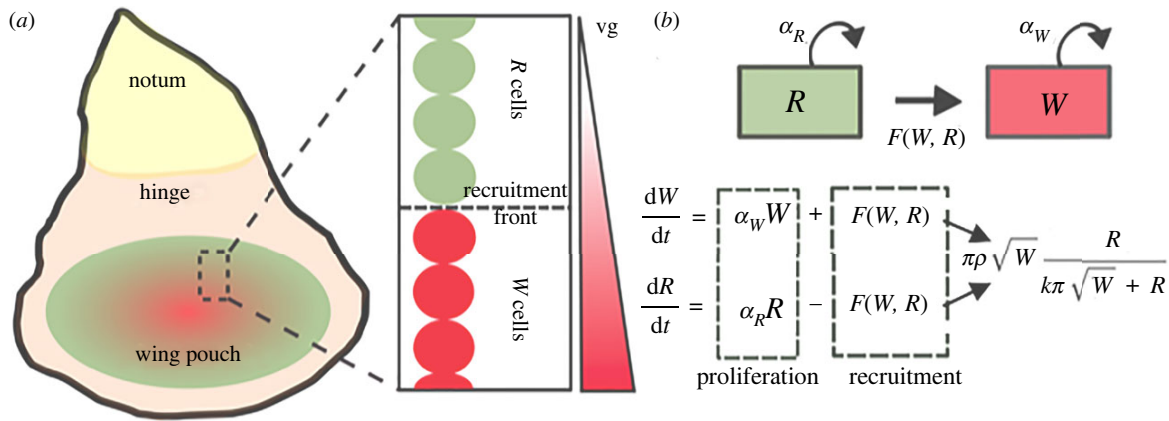


Figure 1. Scheme of the *Drosophila* wing disc and mathematical model of wing and recruitable cells. (a) Cartoon of a *Drosophila* wing disc, subdivided in three regions (notum, hinge and wing pouch) that correspond to different structures in the adult. The wing blade derives from the wing pouch domain and may be subdivided into wing-committed (W) and pre-wing recruitable (R) cells. W cells are defined by the expression of Vg (red); as the disc grows, the Vg domain expands at the expense of reducing the R domain (green). (b) Dynamic model for the populations of W and R cells. Note that in addition to cell proliferation of W and R cells, the W population grows at the expense of the R population through a recruitment rate function $F(W, R)$; see electronic supplementary material, appendix S1.

Table 1. Parameters used in the mathematical models of this study.

parameter symbol	meaning	value	justification
α_{W0}, α_{R0}	proliferation rates of W and R cells, respectively	0.0014 min^{-1}	in 72–96 h old, wild-type wing discs, cells divide homogeneously twice every day [46]
k	proportionality constant for half-maximal contribution of R cells to the recruitment rate	1	starting value; we then vary it when we explored parameter space
ρ	maximum percentage of cells from the recruitment boundary that will be recruited per unit of time	0.0039 min^{-1}	starting value; we then vary it when we explored parameter space
μ	half-maximal value of R cells necessary to reduce the growth rate of W in half (equation 2.6)	72 cells	in figure 3d, the slope of the line that connects the third and the fourth point drops to about half with respect to the slope that connects the fourth and the fifth points; thus, we estimate this parameter as the number of R cells in the fourth point in figure 3e, assuming our initial condition of $R_0 = 169$ cells in the first point

exponential contribution of cell recruitment be relative to the cell proliferation rate, α_W . In a semi-log plot, the slope of the best-fit line corresponds to an approximate exponential growth rate of the W population (figure 2b)

$$m = \alpha_W + \varepsilon, \quad (2.3)$$

where ε is approximately the exponential grow rate due to cell recruitment. Thus, the size of the W population is approximately given by (figure 2c)

$$W(t) \approx W_0 e^{(\alpha_W + \varepsilon)t}. \quad (2.4)$$

A numerical estimate of ε (using the parameter values reported in table 1) is $1.0 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, which is about 1/10 of the proliferation rate. This relative growth rate when integrated over the expected duration of the recruitment process

during the third larval instar (36 h) is consistent with a previously reported relative contribution of cell recruitment of about 20% [53].

(c) Analytical and numerical exploration of parameter space reveal the dynamics of R cells

While W is always an increasing function of time in our model, the dynamics of R depends on the parameters of the model. In particular, if cell proliferation of the R population dominates recruitment, we would expect R to be a continuously increasing function of time, a situation that is inconsistent with wild-type development as Vg eventually covers the whole wing pouch at the end of the third larval instar ([53], figure 3). Conversely however, if recruitment dominates cell proliferation in R cells, then the R population

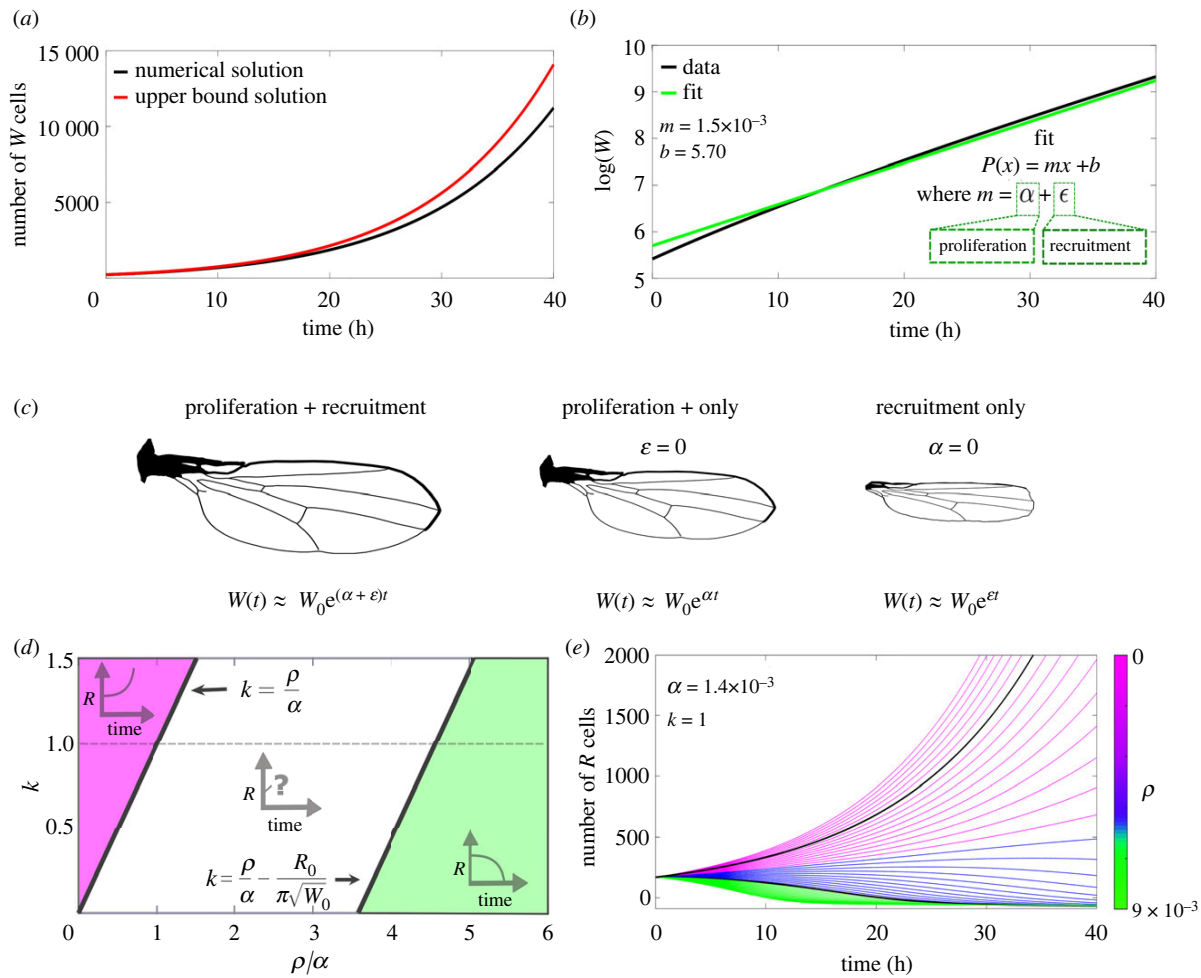


Figure 2. Dependence of W and R dynamics on system parameters. (a) Numerical solution of W from equations (2.1) to (2.2) using the parameters in table 1 (black curve), compared with an analytical upper bound function (red curve); see electronic supplementary material, appendix 2. (b) Semi-log representation of the numerical solution in *a* (black curve) compared with the best-fit solution of the linear function $P(x) = mx + b$. Note that because this is a semi-log plot, m represents the exponential rate of growth that has a contribution of proliferation (α_W) and recruitment (ϵ). (c) Under the approximation in *b*, proliferation and recruitment rates additively contribute to exponential wing growth. (d) The dynamics of R can be studied analytically in three different regions of parameter space; see electronic supplementary material, appendix S3. The region in pink corresponds to parameter values in which R is an increasing function of time (cell proliferation of R cells dominates over recruitment). Conversely, the region in green corresponds to parameter values in which R is a decreasing function of time (recruitment dominates over cell proliferation of R cells). The full dynamics of R in the white region cannot be defined analytically, but R is initially increasing. The dotted line represents a subset of parameters defined by $k = 1$. (e) Numerical solutions for the population of R cells when k and α are fixed, and ρ is varied (colour bar) along the dotted line in *d*. The dynamic behaviours found in *d* are reproduced numerically (black curves correspond to parameter values on the black lines in *d*). Note that within the white region, some solutions are increasing (as in the pink region), but some only increase transiently and then start to decrease (blue curves). The value of ρ reported in table 1 corresponds to the middle value of line segment defined by the dotted line intersected by the two black lines in *d*.

will eventually vanish. We explored analytically the specific dependence of this dynamics on parameter values and initial conditions for the particular case in which $\alpha = \alpha_W = \alpha_R$, a case that appears to be a good approximation in wild-type conditions ([46], see electronic supplementary material, appendix S3). We found three different behaviours for the dynamics of R in parameter space (figure 2*d*). First, when $k > \rho/\alpha$, R is an increasing function of time (pink region in figure 2*d*); in this case, both W and R grow indefinitely, a condition that does not recapitulate the wild-type scenario. Second, when $k < \rho/\alpha - R_0/\pi\sqrt{W_0}$ we found that R is a decreasing function of time (green region in figure 2*d*). Finally, if $\rho/\alpha > k > \rho/\alpha - R_0/\pi\sqrt{W_0}$, we were not able to demonstrate analytically the full dynamic behaviour of R , but we show that $(dR/dt)(t=0) > 0$, i.e. R is initially an

increasing function of time (white region in figure 2*d*). We then explore numerically the dynamics in this region of parameter space by fixing $k = 1$ and $\alpha = 0.0014 \text{ min}^{-1}$ and varying ρ (dotted line in figure 2*d*). We found that for some parameter values R is an increasing function of time for all t , while for others it increases for some time and then it decreases (figure 2*e*, blue lines).

(d) Time-course analysis of Vg-expressing cells in the wing disc reveals that growth of W slows down while the population of R cells vanishes

In order to compare the dynamics of W and R in our model with experimental data, we approximated the number of

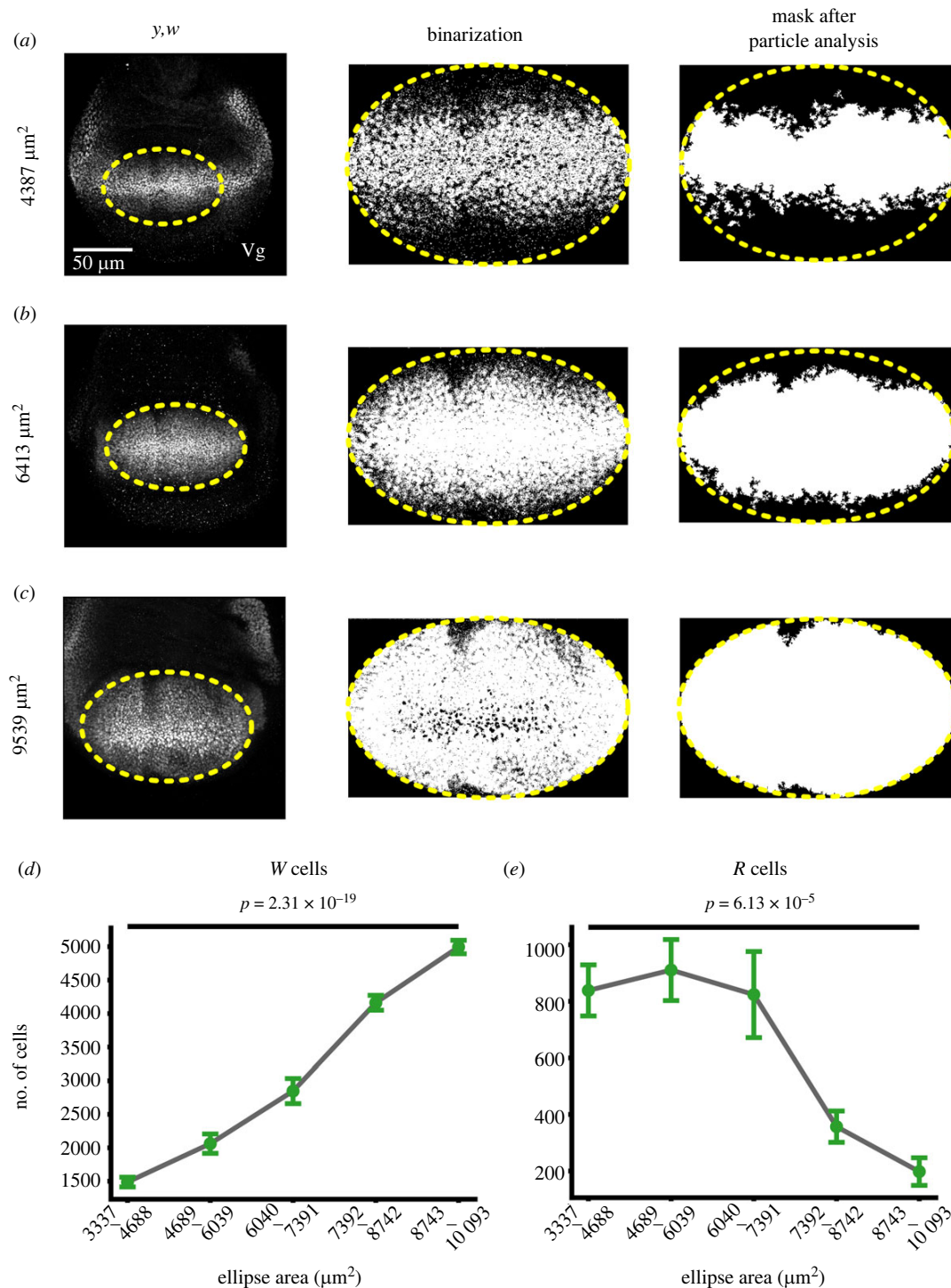


Figure 3. Quantification of *W* and *R* cells in third instar wing discs. (a–c, left) Vg antibody staining in *y,w* (considered as wild-type in this study) discs of representative discs of increasing sizes. The yellow dotted line delineates the contour of an ellipse that is chosen as the wing pouch area (see Methods). The areas of the ellipses are shown on the left of each image. (a–c, middle) Binarization of the pixels with or without Vg staining located within the wing pouch area (see Methods). (a–c, right) Noise reduction of the Vg+ isolated pixels (error of the technique) using a particle analysis algorithm (see Methods). (d,e) Quantification of pixels representing *W* (d) and *R* (e) cells in discs grouped by wing pouch (ellipse) areas (denoted by a range in μm²), which indirectly correspond to increasing developmental times. The number of discs *n* used in each group (from left to right) is: 8, 12, 9, 11 and 5. Error bars correspond to the standard error of the mean. Scale bar is shown only in the first image, but it is the same for all images in the first column. Statistical test is an ANOVA one-way test; ns, not statistically significant.

cells at different times during the third instar of wild-type discs (figure 3a–c). While *W* cells are defined by Vg expression, there is no molecular marker of *R* cells. Therefore, we used the absence of Vg expression in cells within the pouch to quantify *R* cells (see Methods). We observe that *W*

increases exponentially for much of development, but its growth rate slows down by the end of the third instar (compare the slope of the third to fourth versus the fourth to fifth data points in figure 3d). Conversely, the number of *R* cells slightly increases or remains constant during the early

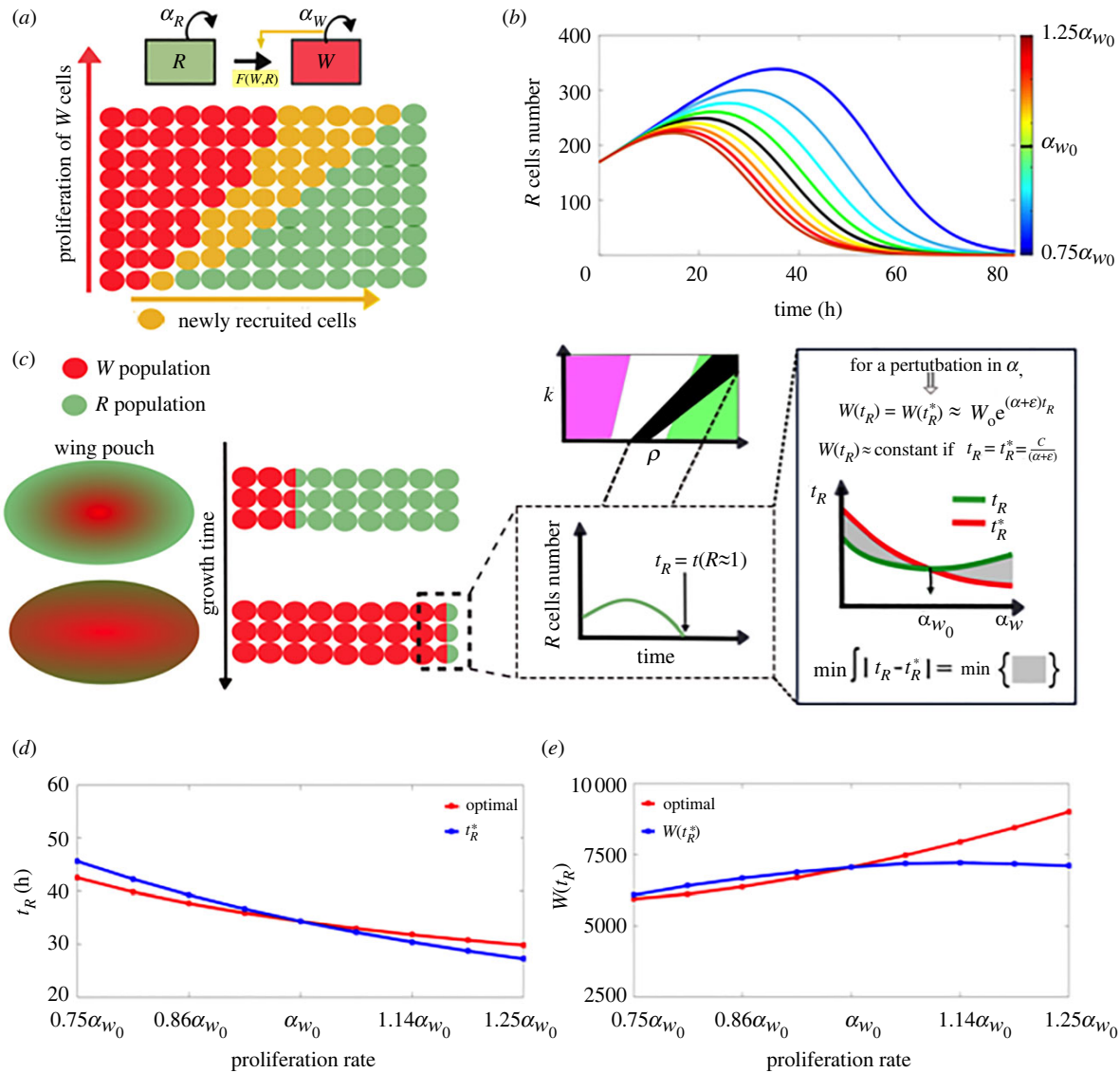


Figure 4. Cell proliferation rates are inversely proportional to the duration of recruitment. (a) Diagram representing that the recruitment of new cells (yellow) increases as the proliferation rate of W cells increase. Prior W cells are represented in red and R cells represented in green. (b) Numerical examination of $R(t)$ with the parameters reported in table 1, but when α_W is perturbed 25% above and below the wild-type value α_{W0} . (c, left) Diagram illustrates that the propagation of the recruitment front is accelerated with developmental time. (c, centre) There is a range of parameters in which R cells are extinguished ($R \approx 1$) within 24–36 h from the beginning of recruitment (black region). We define this extinction time as t_R . (c, right) Optimization scheme compares how t_R compensates to perturbations in α_W in ideal conditions (red curve) versus the compensation offered by the model (green curve). Assuming the exponential approximation of figure 2b, the t_R that leaves the final size $W(t_R^*)$ invariant is such that is inversely proportional to the growth rate $\alpha_W + \varepsilon$ (see Methods for details). (d) Plots of the optimal t_R (red curve) and t_R^* (blue curve; defined in c) versus perturbations in α_W . (e) Plots of $W(t_R)$, versus perturbations in α_W corresponding to optimal t_R (using the numerical solution of equations (2.1)–(2.2); red curve) and t_R^* (using the equation for $W(t_R^*)$ in c; blue curve).

stages of recruitment before it starts to decrease (figure 3e), a behaviour that is consistent with the results of our model for a specific region of parameter space (white region in figure 2d, blue curves in figure 2e). Note that the decrease in the rate of growth of the W population follows from a dramatic drop in the number of R cells (figure 3d,e), suggesting that the rates of proliferation of W cells and recruitment may be cross-regulated (see Discussion).

(e) Perturbations in cell proliferation rates of the W population modulate the duration of recruitment

In order to investigate a potential crosstalk between proliferation and recruitment, we examined further the dynamics of

our model. We noted that as the population of W cells increases exponentially, the number of recruiter cells, i.e. the W cells located at the recruitment boundary, which for a circular geometry is given by $\pi\sqrt{W}$ (see electronic supplementary material, appendix S1) also increases exponentially, resulting in the acceleration of the recruitment process (figure 4a). As the population of R cells eventually vanishes (figure 3e), the duration of recruitment depends on the proliferation rate of W cells. Indeed, when α_W is perturbed above its wild-type value, α_{W0} , the duration of recruitment (t_R), defined as the extinction time of the R population ($R < 1$) is reduced (warm colours in figure 4b); conversely, when α_W is perturbed below wild-type levels, t_R increases (cold colours in figure 4b). From equation (2.4), we ask

what is the condition such that the number of W cells at the end of recruitment, $W(t_R)$, is maintained approximately constant to perturbations in α_{W0} . Wing size at the end of recruitment can be controlled by modulating t_R in a way that is inversely proportional to the perturbation (figure 4c). We then asked if such relationship exists for a set of parameters within those that match the dynamical behaviour in figure 3e (black region in figure 4c). To test this, we performed an optimization procedure that finds the parameter pair (ρ, k) that minimizes the error with the following control function (figure 4c, right; Methods):

$$t_R^* = \frac{C}{\alpha_W + \varepsilon}, \quad (2.5)$$

where α_W is the new (perturbed) proliferation rate of W cells, ε is the value obtained by fitting the numerical solution with the perturbed α_W to an exponential as in figure 2b and $C = (\alpha_{W0} + \varepsilon_0)t_{R0}$ is a constant such that the function coincides at the unperturbed value of α_W (figure 4c, right; unperturbed values are denoted with the sub-index 0). Remarkably, for the optimal parameter values, the numerical value of t_R for different perturbations in α_W fits well the function defined by equation (2.5) (figure 4d). This result suggests that cell recruitment is a compensatory mechanism in which the size of W at the end of recruitment is largely invariant to perturbations in cell proliferation rates (figure 4e).

(f) Final size invariance is achieved when recruitment temporarily limits cell proliferation rates

So far, our model reveals a relationship between cell proliferation of W cells and the duration of recruitment. Since growth of the W population slows down as R starts to decrease (figure 3d,e), we considered the possibility that the end of recruitment could also be the overall halt of growth. With the aim to explore this possibility, we modified our original model by replacing the parameter α_W in equation (2.1) of Model 1 with a function that assumes that the proliferative growth of W cells slows down to about half its rate when the number of R cells reaches a certain threshold, μ (table 1 and figure 5a)

$$\alpha_W(R) = \frac{\alpha_W R}{\mu + R}. \quad (2.6)$$

This function has the property that $\alpha_W(R) \approx \alpha_W$ when $R \gg \mu$, and $\alpha_W(R) \rightarrow 0$ when $R \rightarrow 0$, i.e. W grows exponentially as in Model 1 when R cells are available but induces growth arrest of W when recruitment is terminated (figure 5a,b). One way in which this assumption could work mechanistically is if R cells produce a secreted signal X that is necessary for growth of W cells (figure 5a; see Discussion). For clarity, we will refer to equations (2.1–2.2) but with α_W replaced by equation (2.6) as Model 2. In Model 1 (§2 (a)), W was always an exponentially increasing function of time (figure 2a,b), whereas in Model 2, W approaches a final value whenever $R \rightarrow 0$ (figure 5b). This update in the model permits us to consider the hypothesis that by modulating the speed of recruitment upon perturbations in cell proliferation rates of W cells, wing size could be controlled.

Using the parameters obtained in figure 4, we found that the dynamics of W and R are similar to those observed experimentally (figure 5b,c; compare to figure 3d,e). Moreover, we recovered the property of our original model that perturbations

in α_W are inversely compensated by the duration of recruitment (figure 5c,d), but now the time in which recruitment is terminated, t_R , is also the time (t_f) in which W reaches its final size (W_f). Indeed, we note that W_f remains nearly constant over a range of perturbations in α_W (figure 5e), providing support that the relationship between cell proliferation and recruitment works as a growth control mechanism.

(g) Growth control is lost when cell proliferation rates in both W and R cells are simultaneously perturbed

Experimental testing of our size control hypothesis may be challenging because impairing cell recruitment in R cells and, at the same time, introducing cell proliferation perturbations is not an easy task, even in a widely used genetic model such as the *Drosophila* wing disc. In order to test our hypothesis, it would be useful to find a perturbation in which the proposed growth control mechanism fails in a way not expected by prior models. In our perturbation simulations, we noted that the compensatory mechanism in which the duration of recruitment is modulated only works when perturbations in cell proliferation affect W cells, but not R cells. Indeed, when perturbations affect both α_W and α_R simultaneously (simply referring to both of the perturbed parameters as α and the unperturbed ones as α_0) in Model 2 (figure 5a), we obtained the opposite behaviour of t_f , compared to the case in which only α_W was affected and α_R was maintained at its unperturbed value of table 1 (compare figure 6a and figure 5d). This is because increasing α_R produce more R cells, so it would take longer to extinguish them by cell recruitment; and the opposite occurs when α_R decreases. As a result of this, W_f is very sensitive to simultaneous perturbations in proliferation rates (figure 6b). This dynamic behaviour occurs independently of the specific choice of parameters (see electronic supplementary material, figure S2). Thus, our model predicts very different behaviours when cell proliferation is perturbed only in W cells than when cell proliferation rates of both W and R cells are affected.

Importantly, the prediction of this experiment is different to what would be expected by prior growth control models since they do not distinguish between W and R cells, and therefore, affecting both α_W and α_R simultaneously should not be any different than perturbing α_W alone (see Discussion).

3. Discussion

Cell recruitment operates as a patterning-driven growth mechanism in a plethora of systems [55], but whether there is a specific role in developmental growth control is unknown. What advantages would cell recruitment offer as a growth mechanism during development when growth can potentially reach any target size by modulating cell proliferation, cell growth or apoptosis? Recent work in the *Drosophila* wing shows that cell recruitment has a minor contribution to wing growth compared to cell proliferation, suggesting that perhaps cell recruitment works as a fine-tuning mechanism that provides precision to the final size of the organ [53], but no insights about how such a mechanism could work have been reported. Here, we used an experimentally guided mathematical-modelling approach to show that the rate of cell proliferation of wing-committed cells is coupled to the recruitment of cells into the wing domain. This dynamic interplay

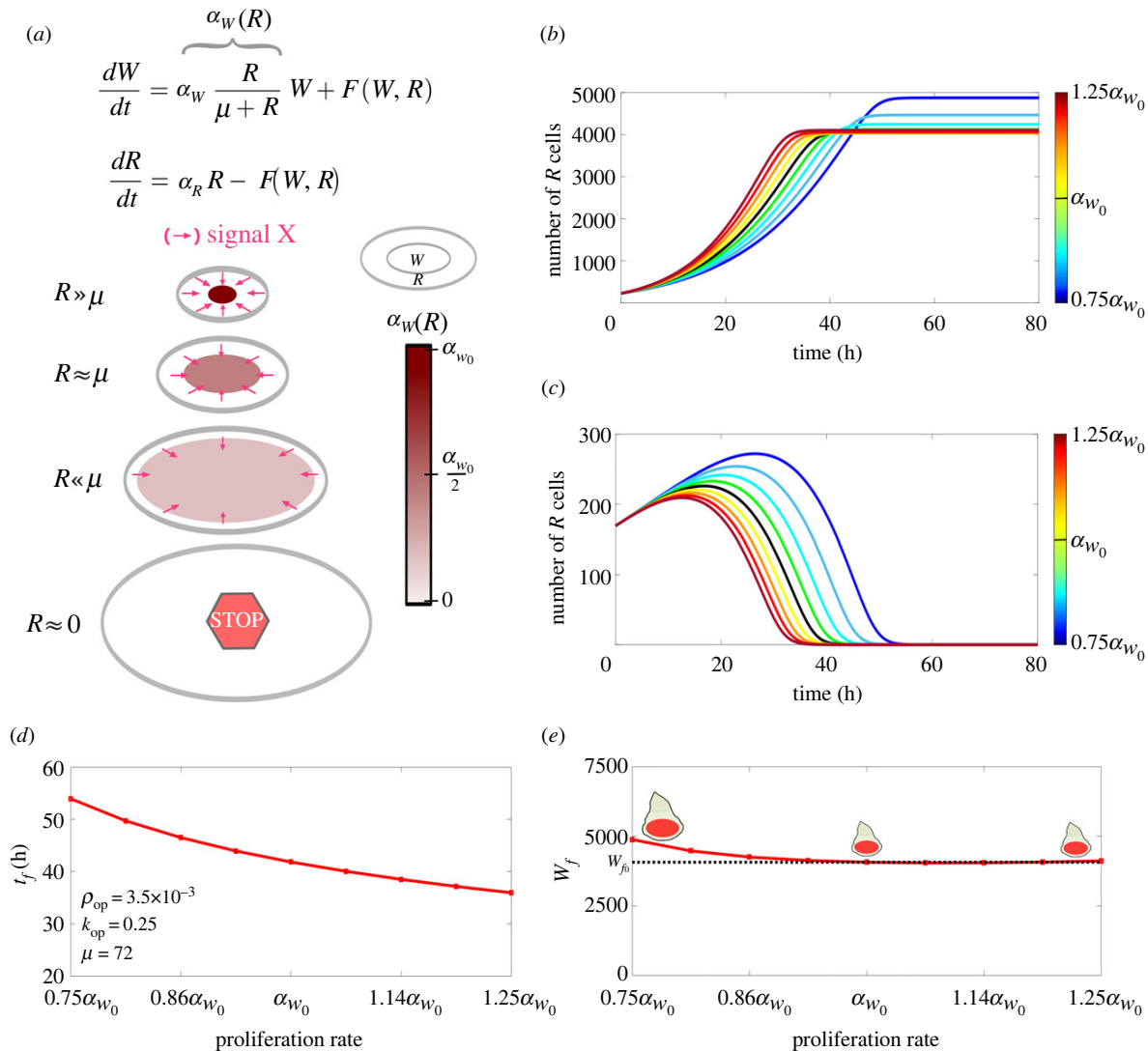


Figure 5. A modified model in which growth is assumed to stop at the end of recruitment explains size invariance with respect to changes in cell proliferation rates. (a) Equations of an alternative model (Model 2) in which the proliferation rate of W cells is no longer a constant, but rather a Hill function of the number of R cells: $\alpha_W(R) = \alpha_{W0}R/(\mu + R)$. This function implies that $\alpha_W(R)$ varies continuously (colour bar) of from nearly α_{W0} (the wild-type value of this parameter, table 1; darkest colour) when $R \gg \mu$ to zero (white) when $R \ll \mu$. A plausible mechanistic realization of this model in which R cells secrete a growth factor (signal X, pink arrows) that is received in W cells. When the population of R cells vanishes, no signal X is produced and growth is arrested (STOP sign). (b,c) Temporal dynamics of W (b) and R (c) cells, using the equations in a and the parameter values reported in table 1, when α_W is varied (rainbow colour map) around its wild-type value (α_{W0} , black curve). (d) Extinction time as defined in figure 4c (which in this case, is also the final time, t_f) obtained from numerically solving the equations in A (using the optimal parameter values from figure 4d,e) as a function of perturbations in α_W . (e) Final size of the W population $W_f = W(t_f)$ as a function of perturbations in α_W (obtained as in d). Perfect control occurs when final size W_0 is invariant to perturbations in α_W (dotted horizontal line). Wing disc cartoons represent the disc size variations within this range of perturbations in α_W .

between cell proliferation and recruitment has a direct consequence on the duration of the recruitment process. In particular, when cell proliferation of wing-committed cells is faster or slower, the recruitment process terminates sooner or later than in the wild-type condition, respectively (figure 4d). In addition, if termination of recruitment also induces termination of growth, as may be the case in this system (figure 5a; see below), this coupling results in a compensatory mechanism underlying robust size control despite perturbations in cell proliferation rates, a fact that was observed experimentally more than 20 years ago [17], but has not yet been explained mechanistically.

The model relies on some assumptions that deserve further discussion. The assumption that the end of the recruitment process is also the end of overall growth in our updated model is key for our hypothesis that recruitment

works as a temporal controller of size in this system. Our experimental observation that growth of the Vg domain significantly slows down when the availability of recruiter cells drops is consistent with this assumption. It could be argued that the drop in the growth rate of W is because there are no more cells to recruit and not because an actual decrease in cell proliferation rates. However, we estimated that recruitment only contributes about 1/10 of the growth rate of W [53], while the observed decrease in the slope in the last two data points in figure 3d is at least two-thirds. Thus, simply excluding cell recruitment in the growth of W cells cannot explain the observed decrease in its growth rate. Further support of this assumption comes from a prior experimental study, which shows that when Vg is broadly overexpressed (i.e. in both W and R cells simultaneously) cell

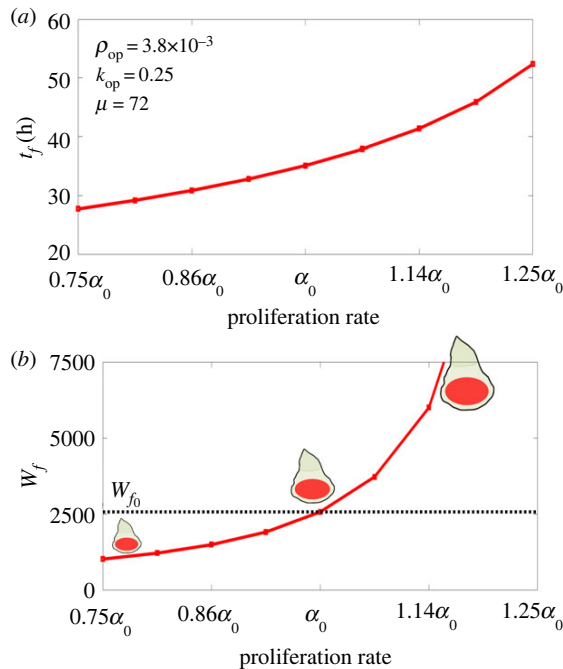


Figure 6. Size invariance is lost when both α_W and α_R are perturbed simultaneously. (a) Final time t_f (as defined as in figure 5d) versus simultaneous perturbations in α_W and α_R (indistinctly referred as α) around their unperturbed value (α_0) using the parameter values that result from the optimization procedure described in figure 4c. (b) Final size of the W population W_f as a function of perturbations in α_0 using the parameter values obtained in a. Dotted line and wing disc cartoons are as in figure 5e. Note that growth control is completely lost under these simultaneous perturbations. (Online version in colour.)

proliferation is dramatically reduced [56]. How could the absence of R cells induce termination of overall growth mechanistically? One explanation is that R cells provide an unidentified growth factor (signal X) that is necessary for proliferation of W cells (figure 5a). In fact, recent work has revealed that termination of cell proliferation relies on a decrease in TORC1 signalling [57], through an unknown signalling pathway. Therefore, an attractive proposal that is consistent with our model is that the signal that sustains cell-autonomous TORC1 expression emanates from recruitable cells and it drops as the number of these cells vanishes with cell recruitment. Finally, our mathematical model assumes a circular geometry, which is essential for increasing the number of recruitable cells and accelerating the recruitment process. Since W grows exponentially, so does the recruitment boundary (see electronic supplementary material, figure S1). How much does the geometry of the system affect the implications of the model? We found that the recruitment function $F(W,R)$ has the same form when the geometry of the system is assumed to be elliptical which resembles more closely the geometry of the wing pouch (see electronic supplementary material, appendix S4).

Our study proposes that cell recruitment not only works as a mechanism to expand the number of Vg -expressing cells, but also, as a time controller of cell proliferation. Thus, our model predicts that upon a proliferation perturbation in the absence of recruitment, the duration of growth will not be tuned by cell proliferation perturbations and final size may be significantly affected. While perturbing proliferation rates and impairing cell recruitment simultaneously could be experimentally challenging, we can estimate analytically the

difference in size that would be predicted in a model with versus without recruitment. Under a cell proliferation perturbation $\alpha_W \rightarrow \Delta\alpha_{W0}$, with Δ a number that is slightly greater than 1 (the same argument applies if Δ is slightly less than 1), the adjustment for perfect control would be t_{f0}/Δ . Therefore, without recruitment-dependent temporal control, the error in final size is approximately given by the additional growth of W that will occur at the unperturbed rate $\alpha_{W0} + \varepsilon$ for the additional time $(1-1/\Delta)t_{f0}$ is given by

$$W_{f0} \exp\left((\alpha_{W0} + \varepsilon)\left(1 - \frac{1}{\Delta}\right)t_{f0}\right),$$

which could be a significant difference if t_{f0} is relatively long (i.e. 35–50 h).

What is the range of perturbations in which our size-invariance model works reasonably? Although t_f is a decreasing function of α_{W0} for a broad range of perturbations (see electronic supplementary material, figure S3A), a fair control of final size occurs in a limited range (see electronic supplementary material, figure S3B). Particularly, we find that within the range examined in figure 5 (25% above or below the wild-type proliferation rate, α_{W0} , our model (Model 2) predicts less than 20% difference in final size between these bottom and top perturbations (red and blue curves in figure 5b). Thus, a 50% perturbation in the proliferation rate of W cells results in less than 20% difference in final size (under no control conditions, i.e. exponential growth, the difference would have been $\exp(0.5\alpha_{W0}t_f)$ which for $\alpha_{W0} = 0.0014 \text{ min}^{-1}$ and $t_f \approx 36 \text{ h} = 2160 \text{ min}$ gives a 411% difference!). In addition, we note that perturbations have an asymmetric effect on final size; in particular, the effect is much larger when α_{W0} is reduced than when it is increased (figure 5e). While in the model this is an effect of nonlinearities, biologically, this also has been observed. For instance, in ectotherms, such as *Drosophila*, reducing the temperature at which animals are reared also reduces overall growth rates, but results in animals with larger organs [58,59], such as we predict in figure 5e. In *Drosophila*, this effect is asymmetric when rearing temperature is varied above or below the standard condition (25°C); for instance, rearing animals at 16.5°C results in a 33% increase of adult wings, whereas an increase to 29°C only results in slightly smaller wings (about 5%) [60].

Finally, our theoretical work provides guidance into how our hypothesis can be tested experimentally using genetic tools available in *Drosophila* [61]. Specifically, our mathematical model predicts two totally different outcomes upon perturbations in α_W versus simultaneous perturbations in both α_W and α_R (compare figure 6 with figure 5d,e). These contrasting phenotypes provide a relatively simple way to test our hypothesis versus prior growth control models. For instance, in the morphogen slope model [34,35], the gradient gets flatter with tissue growth and would be predicted to stop when the slope gets sufficiently flat, irrespectively which populations of cells grow faster or slower. A similar argument applies for mechanical feedback models [41–43]. This prediction does not mean, however, that these other models or mechanisms may be simultaneously or independently at work to ensure final size invariance under other genetic and environmental perturbations in this system.

In summary, our work proposes a novel growth control strategy where perturbations in cell proliferation rates of wing-committed cells are coupled to the duration of cell

recruitment in the *Drosophila* wing disc. This strategy could be extended to other developmental or disease-related scenarios. For example, the mechanistic scenario presented in figure 5a could be, in principle, implemented in cell culture using synthetic-biology approaches. Such an implementation may provide insights into the feasibility of this mechanism in other growth control contexts such as in stopping tumour growth [62]. Furthermore, given that cell recruitment is a widespread mechanism in developing organs [55], the mechanism described here provides a previously unidentified role for cell recruitment in the robust determination of size to variations in cell proliferation rates, a long-standing problem in developmental biology.

4. Methods

(a) Image processing and visualization

All the images were processed and analysed using IMAGEJ/Fiji software (<https://imagej.net/>), and the MATPLOTLIB (<https://matplotlib.org/>), PANDAS (<https://pandas.pydata.org/>), NUMPY (<http://www.numpy.org/>), SciPY (<https://www.scipy.org/>) Python packages.

(b) Quantification of *W* and *R* cells

To quantify the number of *W* and *R* cells within the wing pouch, we used maximum projection images from a previous publication [53] of mid-to-late third-instar wing discs immunostained with Vg and Wg antibodies, and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; a fluorescent marker of nuclear DNA). Vg staining was used as a marker of *W* cells, whereas the absence of Vg within a region of recruitment competence (the wing pouch) indirectly marked *R* cells (unfortunately, we do not have a direct marker of *R* cells).

(i) Region of interest

The wing pouch region was determined in the DAPI channel using the ellipse selection tool in ImageJ/Fiji, taking as reference for the minor axis the distance between the epithelial folds that delimit the pouch from the hinge region (since only cells within these limits are competent to become recruited and express Vg). As these folds have a curved shape, we manually adjusted an ellipse to fit these curved lines.

(ii) Binarization

To remove pixels with unspecific Vg antibody binding, we selected a rectangular region of the wing discs outside our region of interest (ROI), where this protein is not expected to be present and made an average of the intensities within this area to define a threshold value corresponding to background noise in the Vg channel. We then binarized all the pixels within the wing pouch as having (above this threshold) or not having (below this threshold) Vg protein.

(iii) Particle analysis

Since Vg expression has a nuclear pattern, the absence of Vg does not necessarily mean that a pixel is associated with an *R* cell. To solve this problem, we masked pixels without Vg (in the binarized image) using the particle analysis tool in ImageJ/Fiji using the following parameters:

- The *size* parameter was set to greater than 50 pixels. By manually examining several individual nuclei in the Vg channel, we found that the minimal size of a clearly distinguished nucleus is about 50 pixels;
- The *circularity* parameter was allowed to vary between 0 and 1 to admit different nuclear shapes.

- We selected the *include holes* option to generate a mask of the total region that corresponds to Vg expressing cells (figure 3a–c, third column).

After this masking procedure, positive pixels within the wing pouch are counted towards *W* cells and the negative pixels towards *R* cells.

(iv) Conversion from pixels to number of cells

We estimated the number of *W* and *R* cells within the ROI of every image as follows: (i) Using the binarized image prior to the masking procedure, we counted the number of ‘particles’ in the Vg channel from the particle analysis outlined above; this is the number of *W* cells. (ii) We then found the number of pixels that would correspond to a single cell in the masked image by dividing the total number of positive pixels by the number of *W* cells obtained in the previous step. (iii) Finally, the number of *R* cells is given by the number of negative pixels divided by the number of pixels that corresponds to a single cell in the previous step.

To estimate the initial conditions (W_0 and R_0) that we used in our models, we first manually counted Vg-expressing nuclei in early third-instar wing disc images to obtain W_0 . To estimate R_0 , we then subtracted the total number of nuclei (marked with DAPI) within the inner ring of Wg expression (since epithelial folds that delimit the pouch from the hinge regions do not appear until the middle of the third instar) to W_0 .

(c) Optimization procedure

For the optimization procedure in figure 4c, we considered parameter pairs (ρ , k) that correspond to a t_R within the range of 24 and 36 h (see electronic supplementary material, figure S4), which is the range of time when we expect recruited cell to be extinguished [53]. For each parameter pair (ρ , k), we perturbed α_W within the range of $[0.75\alpha_{W0}, 1.25\alpha_{W0}]$, where α_{W0} is the wild-type value reported in table 1. This interval of perturbation is under the normal variability observed in experimental measurements [46]. For each perturbation, we then solved equations (2.1)–(2.2) and computed the duration of recruitment t_R and the recruitment rate ϵ , as described in figure 2b. We then compared t_R with the time (t_R^*) that would leave the size of *W* at the end of recruitment, referred as $W(t_R)$, approximately invariant (figure 4c, right) and computed the difference between these values for each perturbed α_W (see electronic supplementary material, figure S5). We defined the optimal parameter set, such that it minimizes this difference (figure 4d,f). We noted that this control works well for the range of perturbations $[0.75\alpha_{W0}, 1.25\alpha_{W0}]$, but when this range is expanded, there are significant variations in $t_R - t_R^*$ (electronic supplementary material, figure S3). The worst fit case (i.e. the set that maximizes this difference) is shown in electronic supplementary material, figure S6.

Data accessibility. This manuscript includes an electronic supplementary material file. The codes to generate the files and simulations can be obtained from <https://github.com/mnahmadb/Interplay-between-cell-proliferation-and-recruitment-controls-the-duration-of-growth-and-final-size-git> or <https://doi.org/10.5061/dryad.8w9ghx3q5> [63].

The data are provided in electronic supplementary material [64].

Authors' contributions. E.D.-T.: conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, software, validation, visualization, writing—original draft; L.M.M.-N.: methodology, visualization, writing—review and editing; M.N.: conceptualization, formal analysis, funding acquisition, investigation, project administration, supervision, writing—original draft.

All authors gave final approval for publication and agreed to be held accountable for the work performed therein.

Conflict of interest declaration. We declare we have no competing interests.

Funding. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) of Mexico (grant no. CB-2014-01-236685). E.D.-T. and L.M.M.-N. were recipients of PhD scholarships from Conacyt.

Acknowledgements. We thank José Luis Fernández-López and Damián Jacinto-Méndez for technical assistance; and Pablo Padilla-Longoria, Yuriria Cortez-Poza and Eduard De La Cruz-Burelo for discussions and comments on the manuscript.

References

- Bryant PJ, Simpson P. 1984 Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q. Rev. Biol.* **59**, 387–415. (doi:10.1086/414040)
- Shingleton AW. 2010 The regulation of organ size in *Drosophila*: physiology, plasticity, patterning and physical force. *Organogenesis* **6**, 76–87. (doi:10.4161/org.6.2.10375)
- Barkai N, Shilo BZ. 2007 Variability and robustness in biomolecular systems. *Mol. Cell* **28**, 755–760. (doi:10.1016/j.molcel.2007.11.013)
- Day SJ, Lawrence PA. 2000 Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* **127**, 2977–2987. (doi:10.1242/dev.127.14.2977)
- Hariharan IK. 2015 Organ size control: lessons from *Drosophila*. *Dev. Cell* **34**, 255–265. (doi:10.1016/j.devcel.2015.07.012)
- Beira JV, Paro R. 2016 The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma* **125**, 573–592. (doi:10.1007/s00412-016-0595-4)
- de Celis JF. 2003 Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. *Bioessays* **25**, 443–451. (doi:10.1002/bies.10258)
- Vollmer J, Casares F, Iber D. 2017 Growth and size control during development. *Open Biol.* **7**, 170190. (doi:10.1098/rsob.170190)
- Lei J, Wan FY, Lander AD, Nie Q. 2011 Robustness of signalling gradient in *Drosophila* wing imaginal disc. *Discrete Contin. Dyn. Syst. B* **16**, 835. (doi:10.3934/dcdsb.2011.16.835)
- Gou J, Stotsky JA, Othmer HG. 2020 Growth control in the *Drosophila* wing disk. *WIREs Syst. Biol. Med.* **12**, e1478. (doi:10.1002/wsbm.1478)
- Nijhout HF, Riddiford LM, Mirth C, Shingleton AW, Suzuki Y, Callier V. 2014 The developmental control of size in insects. *WIREs Dev. Biol.* **3**, 113–134. (doi:10.1002/wdev.124)
- Yamanaka N, Rewitz KF, O'Connor MB. 2013 Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 497–516. (doi:10.1146/annurev-ento-120811-153608)
- Gokhale RH, Hayashi T, Mirque CD, Shingleton AW. 2016 Intra-organ growth coordination in *Drosophila* is mediated by systemic ecdysone signaling. *Dev. Biol.* **418**, 135–145. (doi:10.1016/j.ydbio.2016.07.016)
- Jursnich VA, Fraser SE, Held Jr LI, Ryerse J, Bryant PJ. 1990 Defective gap-junctional communication associated with imaginal disc overgrowth and degeneration caused by mutations of the *dco* gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **140**, 413–429. (doi:10.1016/0012-1606(90)90090-6)
- Bryant PJ, Levinson P. 1985 Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev. Biol.* **107**, 355–363. (doi:10.1016/0012-1606(85)90317-3)
- Parker J, Struhl G. 2020 Control of *Drosophila* wing size by morphogen range and hormonal gating. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 31 935–31 944. (doi:10.1073/pnas.2018196117)
- Neufeld TP, De La Cruz AFA, Johnston LA, Edgar BA. 1998 Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93**, 1183–1193. (doi:10.1016/S0092-8674(00)81462-2)
- Rogers KW, Schier AF. 2011 Morphogen gradients: from generation to interpretation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 377–407. (doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154148)
- Lecuit T, Brook WJ, Ng M, Calleja M, Sun H, Cohen SM. 1996 Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387–393. (doi:10.1038/381387a0)
- Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K. 1996 Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357–368. (doi:10.1016/S0092-8674(00)81114-9)
- O'Connor MB, Umulis D, Othmer HG, Blair SS. 2006 Shaping BMP morphogen gradients in the *Drosophila* embryo and pupal wing. *Development* **133**, 183–193. (doi:10.1242/dev.02214)
- Ng M, Diaz-Benjumea FJ, Vincent JP, Wu J, Cohen SM. 1996 Specification of the wing by localized expression of Wingless protein. *Nature* **381**, 316–318. (doi:10.1038/381316a0)
- Zecca M, Basler K, Struhl G. 1996 Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833–844. (doi:10.1016/S0092-8674(00)81991-1)
- Neumann CJ, Cohen SM. 1997 Long-range action of Wingless organizes the dorsal–ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 871–880. (doi:10.1242/dev.124.4.871)
- Affolter M, Basler K. 2007 The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 663–674. (doi:10.1038/nrg2166)
- Baker RE, Maini PKA. 2007 Mechanism for morphogen-controlled domain growth. *J. Math. Biol.* **54**, 597–622. (doi:10.1007/s00285-006-0060-8)
- Restrepo S, Zartman JJ, Basler K. 2014 Coordination of patterning and growth by the morphogen DPP. *Curr. Biol.* **24**, R245–R255. (doi:10.1016/j.cub.2014.01.055)
- Matsuda S, Affolter M. 2017 Dpp from the anterior stripe of cells is crucial for the growth of the *Drosophila* wing disc. *Elife* **6**, e22319. (doi:10.7554/eLife.22319.001)
- Wartlick O, Mumcu P, Jülicher F, Gonzalez-Gaitan M. 2011 Understanding morphogenetic growth control—lessons from flies. *Nat. Rev. Mol.* **12**, 594–604. (doi:10.1038/nrm3169)
- Barrio L, Milán M. 2020 Regulation of anisotropic tissue growth by two orthogonal signalling centers. *Dev. Cell* **52**, 659–672. (doi:10.1016/j.devcel.2020.01.017)
- Milán M, Campuzano S, García-Bellido A. 1996 Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 640–645. (doi:10.1073/pnas.93.2.640)
- Schwank G, Restrepo S, Basler K. 2008 Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Development* **135**, 4003–4013. (doi:10.1242/dev.025635)
- Wartlick O, Mumcu P, Kicheva A, Bittig T, Seum C, Jülicher F, Gonzalez-Gaitan M. 2011 Dynamics of Dpp signaling and proliferation control. *Science* **331**, 1154–1159. (doi:10.1126/science.1200037)
- Lawrence PA, Struhl G. 1996 Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*? *Cell* **85**, 951–961. (doi:10.1016/S0092-8674(00)81297-0)
- Rogulja D, Irvine KD. 2005 Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* **123**, 449–461. (doi:10.1016/j.cell.2005.08.030)
- Fried P, Iber D. 2014 Dynamic scaling of morphogen gradients on growing domains. *Nat. Commun.* **5**, 5077. (doi:10.1038/ncomms6077)
- Ben-Zvi D, Shilo BZ, Barkai N. 2011 Scaling of morphogen gradients. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 704–710. (doi:10.1016/j.gde.2011.07.011)
- Zhu Y, Qiu Y, Chen W, Nie Q, Lander AD. 2020 Scaling a Dpp morphogen gradient through feedback control of receptors and co-receptors. *Dev. Cell* **53**, 724–739. (doi:10.1016/j.devcel.2020.05.029)
- Wartlick O, González-Gaitán M. 2011 The missing link: implementation of morphogenetic growth control on the cellular and molecular level. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 690–695. (doi:10.1016/j.gde.2011.09.002)
- Aguilar-Hidalgo D, Werner S, Wartlick O, González-Gaitán M, Friedrich BM, Jülicher F. 2018 Critical point in self-organized tissue growth. *Phys. Rev. Lett.* **120**, 198102. (doi:10.1103/PhysRevLett.120.198102)
- Shraiman BI. 2005 Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 3318–3323. (doi:10.1073/pnas.0404782102)

42. Hufnagel L, Teleman AA, Rouault H, Cohen SM, Shraiman BI. 2007 On the mechanism of wing size determination in fly development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 3835–3840. (doi:10.1073/pnas.0607134104)
43. Aegerter-Wilmsen T, Aegerter CM, Hafen E, Basler K. 2007 Model for the regulation of size in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **124**, 318–326. (doi:10.1016/j.mod.2006.12.005)
44. Baena-López LA, Franch-Marro X, Vincent JP. 2009 Wingless promotes proliferative growth in a gradient-independent manner. *Sci. Signal.* **2**, ra60. (doi:10.1126/scisignal.2000360)
45. Alexandre C, Baena-López A, Vincent JP. 2014 Patterning and growth control by membrane-thethered Wingless. *Nature* **505**, 180–185. (doi:10.1038/nature12879)
46. Mao Y, Tournier AL, Hoppe A, Kester L, Thompson BJ, Tapon N. 2013 Differential proliferation rates generate patterns of mechanical tension that orient tissue growth. *EMBO J.* **32**, 2790–2803. (doi:10.1038/emboj.2013.197)
47. Martín FA, Herrera SC, Morata G. 2009 Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **136**, 3747–3756. (doi:10.1242/dev.038406)
48. Willecke M, Hamaratoglu F, Kango-Singh M, Udan R, Chen CL, Tao C, Zhang X, Halder G. 2006 The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size. *Curr. Biol.* **16**, 2090–2100. (doi:10.1016/j.cub.2006.09.005)
49. Baena-López LA, García-Bellido A. 2003 Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development* **130**, 197–208. (doi:10.1242/dev.00187)
50. Zecca M, Struhl G. 2007 Control of *Drosophila* wing growth by the vestigial quadrant enhancer. *Development* **134**, 3011–3020. (doi:10.1242/dev.006445)
51. Zecca M, Struhl G. 2007 Recruitment of cells into the *Drosophila* wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation. *Development* **134**, 3001–3010. (doi:10.1242/dev.006411)
52. Zecca M, Struhl G. 2010 A feed-forward circuit linking Wingless, Fat-Dachsous signaling, and the Warts-Hippo pathway to *Drosophila* wing growth. *PLoS Biol.* **8**, e1000386. (doi:10.1371/journal.pbio.1000386)
53. Muñoz-Nava LM, Alvarez HA, Flores-Flores M, Chara O, Nahmad M. 2020 A dynamic cell recruitment process drives growth of the *Drosophila* wing by overscaling the vestigial expression pattern. *Dev. Biol.* **462**, 141–151. (doi:10.1016/j.ydbio.2020.03.009)
54. Milán M, Campuzano S, García-Bellido A. 1997 Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 5691–5696. (doi:10.1073/pnas.94.11.5691)
55. Muñoz-Nava LM, Flores-Flores M, Nahmad M. 2021 Inducing your neighbors to become like you: cell recruitment in developmental patterning and growth. *Int. J. Dev. Biol.* **65**, 357–364. (doi:10.1387/ijdb.200127mn)
56. Baena-Lopez LA, García-Bellido A. 2006 Control of growth and positional information by the graded vestigial expression pattern in the wing of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 13 734–13 739. (doi:10.1073/pnas.0606092103)
57. Strassburger K, Lutz M, Müller S, Teleman AA. 2021 Ecdysone regulates *Drosophila* wing disc size via a TORC1 dependent mechanism. *Nat. Commun.* **12**, 6684. (doi:10.1038/s41467-021-26780-0)
58. Ray C. 1960 The application of Bergmann's and Allen's Rules to the poikilotherms. *J. Morphol.* **106**, 85–108. (doi:10.1002/jmor.1051060104)
59. von Bertalanffy L. 1960 Principles and theory of growth. In *Fundamental aspects of normal and malignant growth* (ed. WN Nowinski), pp. 137–259. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.
60. French V, Feast M, Partridge L. 1998 Body size and cell size in *Drosophila*: the developmental response to temperature. *J. Insect Physiol.* **44**, 1081–1089. (doi:10.1016/S0022-1910(98)00061-4)
61. Brand AH, Perrimon N. 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415. (doi:10.1101/lm.1331809)
62. Lander AD. 2011 Pattern, growth, and control. *Cell* **144**, 955–969. (doi:10.1016/j.cell.2011.03.009)
63. Diaz-Torres E, Muñoz-Nava LM, Nahmad M. 2022 Data from: Coupling cell proliferation rates to the duration of recruitment controls final size of the *Drosophila* wing. Dryad Digital Repository. (doi:10.5061/dryad.8w9ghx3q5)
64. Diaz-Torres E, Muñoz-Nava LM, Nahmad M. 2022 Coupling cell proliferation rates to the duration of recruitment controls final size of the *Drosophila* wing. Figshare. (doi:10.6084/m9.figshare.c.6214778)

Bibliografía

- Aegerter-Wilmsen, T., Aegerter, C. M., Hafen, E., and Basler, K. (2007). Model for the regulation of size in the wing imaginal disc of drosophila. *Mechanisms of development*, 124(4):318–326.
- Alfano, D., Altomonte, A., Cortes, C., Bilio, M., Kelly, R. G., and Baldini, A. (2019). Tbx1 regulates extracellular matrix-cell interactions in the second heart field. *Human molecular genetics*, 28(14):2295–2308.
- Baena-Lopez, L. and García-Bellido, A. (2006). Control of growth and positional information by the graded vestigial expression pattern in the wing of drosophilamelanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37):13734–13739.
- Ben-Zvi, D., Shilo, B.-Z., and Barkai, N. (2011). Scaling of morphogen gradients. *Current opinion in genetics & development*, 21(6):704–710.
- Bradley, G. L. and Leever, S. J. (2003). Amino acids and the humoral regulation of growth: fat bodies use slimfast. *Cell*, 114(6):656–658.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *development*, 118(2):401–415.
- Brittle, A. L., Repiso, A., Casal, J., Lawrence, P. A., and Strutt, D. (2010). Four-jointed modulates growth and planar polarity by reducing the affinity of dachsous for fat. *Current Biology*, 20(9):803–810.

- Bryant, P. J. and Levinson, P. (1985). Intrinsic growth control in the imaginal primordia of drosophila, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Developmental biology*, 107(2):355–363.
- Bryant, P. J. and Simpson, P. (1984). Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *The Quarterly review of biology*, 59(4):387–415.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Léopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls drosophila growth. *Cell*, 114(6):739–749.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M., and de Celis, J. F. (2009). A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the drosophila melanogaster wing. *Genetics*, 183(3):1005–1026.
- Cutforth, T. and Gaul, U. (1999). A methionine aminopeptidase and putative regulator of translation initiation is required for cell growth and patterning in drosophila. *Mechanisms of development*, 82(1-2):23–28.
- de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., and Johnston, L. A. (2004). Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell*, 117(1):107–116.
- Diaz-Torres, E., Muñoz-Nava, L. M., and Nahmad, M. (2022). Coupling cell proliferation rates to the duration of recruitment controls final size of the drosophila wing. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1984):20221167.
- Doumpas, N., Ruiz-Romero, M., Blanco, E., Edgar, B., Corominas, M., and Teleman, A. A. (2013). Brk regulates wing disc growth in part via repression of myc expression. *EMBO reports*, 14(3):261–268.
- Duffy, J. B. (2002). Gal4 system in drosophila: a fly geneticist’s swiss army knife. *genesis*, 34(1-2):1–15.

- Duman-Scheel, M., Johnston, L. A., and Du, W. (2004). Repression of *dmyc* expression by *wingless* promotes *rbf*-induced *g1* arrest in the presumptive *drosophila* wing margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(11):3857–3862.
- Fagman, H., Andersson, L., and Nilsson, M. (2006). The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(2):444–455.
- French, V., Feast, M., and Partridge, L. (1998). Body size and cell size in *drosophila*: the developmental response to temperature. *Journal of insect physiology*, 44(11):1081–1089.
- Fried, P. and Iber, D. (2014). Dynamic scaling of morphogen gradients on growing domains. *Nature communications*, 5(1):1–12.
- Gallant, P. (2013). *Myc* function in *drosophila*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(10):a014324.
- Garcia-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *drosophila*. *Cell patterning*, 29:161–182.
- Gokhale, R. H., Hayashi, T., Mirque, C. D., and Shingleton, A. W. (2016). Intra-organ growth coordination in *drosophila* is mediated by systemic ecdysone signaling. *Developmental biology*, 418(1):135–145.
- Goulev, Y., Fauny, J. D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., and Zider, A. (2008). *Scalloped* interacts with *yorkie*, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *drosophila*. *Current Biology*, 18(6):435–441.
- Green, S. and Batterman, R. (2017). Biology meets physics: Reductionism and multi-scale modeling of morphogenesis. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 61:20–34.

- Guo, Y., Flegel, K., Kumar, J., McKay, D. J., and Buttitta, L. A. (2016). Ecdysone signaling induces two phases of cell cycle exit in drosophila cells. *Biology open*, 5(11):1648–1661.
- Halder, G. and Carroll, S. B. (2001). Binding of the vestigial co-factor switches the dna-target selectivity of the scalloped selector protein.
- Harrison, R. G. (1924). Some unexpected results of the heteroplastic transplantation of limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10(2):69.
- Henriksson, M. and Lüscher, B. (1996). Proteins of the myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Advances in cancer research*, 68:109–182.
- Herboso, L., Oliveira, M. M., Talamillo, A., Pérez, C., González, M., Martín, D., Sutherland, J. D., Shingleton, A. W., Mirth, C. K., and Barrio, R. (2015). Ecdysone promotes growth of imaginal discs through the regulation of thor in d. melanogaster. *Scientific reports*, 5(1):1–14.
- Herranz, H., Perez, L., Martín, F. A., and Milan, M. (2008). A wingless and notch double-repression mechanism regulates g1-s transition in the drosophila wing. *The EMBO journal*, 27(11):1633–1645.
- Herrera, S. C., Martin, R., and Morata, G. (2013). Tissue homeostasis in the wing disc of drosophila melanogaster: immediate response to massive damage during development. *PLoS genetics*, 9(4):e1003446.
- Hidalgo, D. A., Werner, S., Wartlick, O., González-Gaitán, M., Friedrich, B., and Jülicher, F. (2017). Critical point in self-organized tissue growth. *arXiv preprint arXiv:1711.02021*.

- Hietakangas, V. and Cohen, S. M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annual review of genetics*, 43:389–410.
- Hufnagel, L., Teleman, A. A., Rouault, H., Cohen, S. M., and Shraiman, B. I. (2007). On the mechanism of wing size determination in fly development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10):3835–3840.
- Irvine, K. D. and Vogt, T. F. (1997). Dorsal—ventral signaling in limb development. *Current opinion in cell biology*, 9(6):867–876.
- Ishikawa, H. O., Takeuchi, H., Haltiwanger, R. S., and Irvine, K. D. (2008). Four-jointed is a golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science*, 321(5887):401–404.
- Johnston, L. A. and Gallant, P. (2002). Control of growth and organ size in drosophila. *Bioessays*, 24(1):54–64.
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N., and Gallant, P. (1999). Drosophila myc regulates cellular growth during development. *Cell*, 98(6):779–790.
- Kiernan, A. E., Xu, J., and Gridley, T. (2006). The notch ligand jag1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS genetics*, 2(1):e4.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J., and Carroll, S. B. (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by drosophila vestigial gene. *Nature*, 382(6587):133–138.
- Lander, A. (2011). Pattern, growth, and control. *Cell*, 144(6):955–969.
- Lania, G., Zhang, Z., Huynh, T., Caprio, C., Moon, A. M., Vitelli, F., and Baldini, A. (2009). Early thyroid development requires a tbx1–fgf8 pathway. *Developmental biology*, 328(1):109–117.

- Lawrence, P. A. et al. (1992). *The making of a fly: the genetics of animal design*. Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Lawrence, P. A. and Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from drosophila? *Cell*, 85(7):951–961.
- Lindström, N. O., Brandine, G. D. S., Tran, T., Ransick, A., Suh, G., Guo, J., Kim, A. D., Parvez, R. K., Ruffins, S. W., Rutledge, E. A., et al. (2018). Progressive recruitment of mesenchymal progenitors reveals a time-dependent process of cell fate acquisition in mouse and human nephrogenesis. *Developmental cell*, 45(5):651–660.
- Mao, Y., Tournier, A. L., Hoppe, A., Kester, L., Thompson, B. J., and Tapon, N. (2013). Differential proliferation rates generate patterns of mechanical tension that orient tissue growth. *The EMBO journal*, 32(21):2790–2803.
- Martín, F. A., Herrera, S. C., and Morata, G. (2009). Cell competition, growth and size control in the drosophila wing imaginal disc. *Development*, 136(22):3747–3756.
- Matamoro-Vidal, A., Huang, Y., Salazar-Ciudad, I., Shimmi, O., and Houle, D. (2018). Quantitative morphological variation in the developing drosophila wing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(7):2399–2409.
- Matsuda, S. and Affolter, M. (2017). Dpp from the anterior stripe of cells is crucial for the growth of the drosophila wing disc. *Elife*, 6:e22319.
- McGuire, S. E., Roman, G., and Davis, R. L. (2004). Gene expression systems in drosophila: a synthesis of time and space. *TRENDS in Genetics*, 20(8):384–391.
- Metcalf, D. (1963). The autonomous behaviour of normal thymus grafts. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 41:437–447.

- Milán, M., Campuzano, S., and García-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2):640–645.
- Mirth, C., Truman, J. W., and Riddiford, L. M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in drosophila melanogaster. *Current Biology*, 15(20):1796–1807.
- Mirth, C. K. and Riddiford, L. M. (2007). Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays*, 29(4):344–355.
- Mirth, C. K., Truman, J. W., and Riddiford, L. M. (2009). The ecdysone receptor controls the post-critical weight switch to nutrition-independent differentiation in drosophila wing imaginal discs.
- Misra, J. R. and Irvine, K. D. (2016). Vamana couples fat signaling to the hippo pathway. *Developmental cell*, 39(2):254–266.
- Morales, R. et al. (1993). Manual de laboratorio de genética para drosophila melanogaster. Technical report.
- Morgan, T. H. (1917). The theory of the gene. *The American Naturalist*, 51(609):513–544.
- Morrison, A., Hodgetts, C., Gossler, A., de Angelis, M. H., and Lewis, J. (1999). Expression of delta1 and serrate1 (jagged1) in the mouse inner ear. *Mechanisms of development*, 84(1-2):169–172.
- Muñoz-Nava, L. M., Alvarez, H. A., Flores-Flores, M., Chara, O., and Nahmad, M. (2020). A dynamic cell recruitment process drives growth of the drosophila wing by overscaling the vestigial expression pattern. *Developmental biology*, 462(2):141–151.

- Muñoz-Nava, L. M., Flores-Flores, M., and Nahmad, M. (2021). Inducing your neighbors to become like you: Cell recruitment and its contribution to developmental patterning and growth. *The International Journal of Developmental Biology*.
- Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F. A., Johnston, L. A., and Edgar, B. A. (1998). Coordination of growth and cell division in the drosophila wing. *Cell*, 93(7):1183–1193.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M. (1996). A hierarchy of cross-regulation involving notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the drosophila wing. *Development*, 122(11):3477–3485.
- Otero-Moreno, D., Peña-Rangel, M. T., and Riesgo-Escovar, J. R. (2016). Crecimiento y metabolismo: La regulación y la vía de la insulina desde la mosca de la fruta, drosophila melanogaster. *TIP*, 19(2):116–126.
- Ouattara, A., Cooke, D., Gopalakrishnan, R., Huang, T.-h., and Ables, G. P. (2016). Methionine restriction alters bone morphology and affects osteoblast differentiation. *Bone reports*, 5:33–42.
- Pan, Y., Zhou, Y., Guo, C., Gong, H., Gong, Z., and Liu, L. (2009). Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in drosophila visual pattern memory. *Learning & Memory*, 16(5):289–295.
- Parisi, F., Riccardo, S., Daniel, M., Saqcena, M., Kundu, N., Pession, A., Grifoni, D., Stocker, H., Tabak, E., and Bellosta, P. (2011). Drosophila insulin and target of rapamycin (tor) pathways regulate gsk3 beta activity to control myc stability and determine myc expression in vivo. *BMC biology*, 9(1):1–13.
- Parker, J. and Struhl, G. (2015). Scaling the drosophila wing: Tor-dependent target gene access by the hippo pathway transducer yorkie. *PLoS biology*, 13(10):e1002274.

- Parker, J. and Struhl, G. (2020). Control of drosophila wing size by morphogen range and hormonal gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(50):31935–31944.
- Parker, N. F. and Shingleton, A. W. (2011). The coordination of growth among drosophila organs in response to localized growth-perturbation. *Developmental biology*, 357(2):318–325.
- Prober, D. A. and Edgar, B. A. (2000). Ras1 promotes cellular growth in the drosophila wing. *Cell*, 100(4):435–446.
- Ray, C. (1960). The application of bergmann’s and allen’s rules to the poikilotherms. *Journal of morphology*, 106(1):85–108.
- Restrepo, S., Zartman, J. J., and Basler, K. (2014). Coordination of patterning and growth by the morphogen dpp. *Current Biology*, 24(6):R245–R255.
- Rogers, K. W. and Schier, A. F. (2011). Morphogen gradients: from generation to interpretation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27(1):377–407.
- Rogulja, D. and Irvine, K. D. (2005). Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell*, 123(3):449–461.
- Romero-Pozuelo, J., Demetriades, C., Schroeder, P., and Teleman, A. A. (2017). Cyc-d/cdk4 and discontinuities in dpp signaling activate torc1 in the drosophila wing disc. *Developmental cell*, 42(4):376–387.
- Schwank, G., Restrepo, S., and Basler, K. (2008). Growth regulation by dpp: an essential role for brinker and a non-essential role for graded signaling levels.
- Scott F. Gilbert, M. J. B. (2016). *Developmental biology*. eleventh edition.
- Sharpe, J. (2017). Computer modeling in developmental biology: growing today, essential tomorrow. *Development*, 144(23):4214–4225.

- Shraiman, B. I. (2005). Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9):3318–3323.
- Smith-Bolton, R. K., Worley, M. I., Kanda, H., and Hariharan, I. K. (2009). Regenerative growth in drosophila imaginal discs is regulated by wingless and myc. *Developmental cell*, 16(6):797–809.
- Stevens, B., Alvarez, C. M., Bohman, R., and O'Connor, J. D. (1980). An ecdysteroid-induced alteration in the cell cycle of cultured drosophila cells. *Cell*, 22(3):675–682.
- Strassburger, K., Lutz, M., Müller, S., and Teleman, A. A. (2020). Autonomous termination of proliferation in the drosophila wing disc is torc1 dependent. *bioRxiv*.
- Strassburger, K., Lutz, M., Müller, S., and Teleman, A. A. (2021). Ecdysone regulates drosophila wing disc size via a torc1 dependent mechanism. *Nature communications*, 12(1):1–12.
- Tabata, T. and Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation.
- Thompson, D. W. (1942). *On growth and form*, volume 2. Cambridge university press Cambridge.
- Tomlin, C. J. and Axelrod, J. D. (2007). Biology by numbers: mathematical modelling in developmental biology. *Nature reviews genetics*, 8(5):331–340.
- Turing, A. M. (1990). The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of mathematical biology*, 52(1):153–197.
- Twitty, V. C. and Schwind, J. L. (1931). The growth of eyes and limbs transplanted heteroplastically between two species of amblystoma. *Journal of Experimental Zoology*, 59(1):61–86.
- Von Bertalanffy, L. (1960). Fundamental aspects of normal and malignant growth. *Principles and Theory of Growth*, pages 137–259.

- Wanson, G. J. and Lewis, J. (1982). The timetable of innervation and its control in the chick wing bud.
- Wartlick, O. and González-Gaitán, M. (2011). The missing link: implementation of morphogenetic growth control on the cellular and molecular level. *Current opinion in genetics & development*, 21(6):690–695.
- Wartlick, O., Mumcu, P., Kicheva, A., Bittig, T., Seum, C., Jülicher, F., and Gonzalez-Gaitan, M. (2011). Dynamics of dpp signaling and proliferation control. *science*, 331(6021):1154–1159.
- Willecke, M., Hamaratoglu, F., Kango-Singh, M., Udan, R., Chen, C.-l., Tao, C., Zhang, X., and Halder, G. (2006). The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size. *Current Biology*, 16(21):2090–2100.
- Williams, J. A., Bell, J. B., and Carroll, S. B. (1991). Control of drosophila wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes & development*, 5(12b):2481–2495.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2007). Control of drosophila wing growth by the vestigial quadrant enhancer.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2010). A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to drosophila wing growth. *PLoS biology*, 8(6):e1000386.
- Zhu, Y., Qiu, Y., Chen, W., Nie, Q., and Lander, A. D. (2020). Scaling a dpp morphogen gradient through feedback control of receptors and co-receptors. *Developmental cell*, 53(6):724–739.