



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la dinámica de agregación de la mixobacteria
Myxococcus xanthus en medios con partículas virtuales,
mediante simulaciones computacionales**

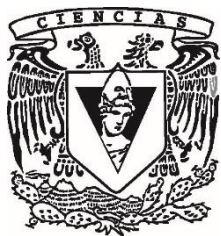
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

EDNA PATRICIA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARIANA BENÍTEZ KEINRAD**

CIUDAD DE MÉXICO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos académicos

A Mariana Benítez por todas sus valiosas enseñanzas, así como su asesoramiento, diálogo, orientación, apoyo y tiempo para lograr construir, desarrollar y finalizar esta tesis.

A Juan Arias del Angel por todas sus valiosas enseñanzas, las recomendaciones bibliográficas y el continuo intercambio de información e ideas que enriquecieron este trabajo, así como la asesoría con la plataforma CC3D, la proporción de un código para obtener el número y tamaño de los agregados virtuales, y el apoyo para correr las simulaciones extensas.

A Julio Belmonte por la proporción de un código que añade células de forma aleatoria, así como los organizadores del Workshop de CompuCell 3D, por apoyarme y permitirme tomar esta curso que enriqueció mi trabajo.

A Karla Hernández, Natsuko Rivera, Alejandro Arzola y Alessio Franci por el constante intercambio de ideas para complementar y mejorar este trabajo. Y al resto del comité sinodal por sus valiosos comentarios y observaciones: Dra. Ana Elena Escalante y Dr. Marco Herrera.

A los integrantes del grupo *La parcela* por la retroalimentación en el trabajo.

Agradecimientos personales

A mi familia por su amor y apoyo incondicional en cada uno de los días de este largo, imponente, sorprendente y maravilloso camino de mi vida académica y personal. Por inspirarme y enseñarme con su ejemplo las cualidades de la responsabilidad, el compromiso, y a siempre disfrutar y esforzarme para sentirme satisfecha de mi trabajo.

A Mariana Benítez, no solo por aceptarme como su estudiante y apoyarme en todo el proceso de la elaboración de esta tesis. Sino también por su paciencia, interés, confianza, y la oportunidad de realizar un extraordinario proyecto -desde mi punto de vista- que representó un gran reto para mí. Finalmente, por impulsarme a estudiar cosas nuevas, y por todo lo que aprendí de ella a nivel académico y personal.

A Juan Arias por su increíble gentileza y apoyo, ya que, sin su ayuda esta tesis no sería lo que es hoy. Por transmitirme su gran interés y entusiasmo hacia las *myxos*, y por inspirarme y alentarme a realizar un notable trabajo. Por la oportunidad de conocerlo y todo lo aprendido a nivel académico y personal.

A los miembros de *La Parcela* por sus ideas, comentarios y sugerencias que ayudaron a construir y mejorar esta tesis.

Al Dr. Juan Núñez por la oportunidad de ser parte de su laboratorio, por su apoyo y sus enseñanzas, así como la proporción de una beca que me permitió terminar con mis estudios. A Laura Giraldo por ser una amiga que, no solo me dio la oportunidad de colaborar en su proyecto, sino que también me dio importantes enseñanzas académicas y personales. Así como al resto de los miembros del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución por su apoyo, el aprendizaje y las experiencias.

A mis amigos de toda la vida y aquellos que hice a lo largo de la carrera, por las experiencias, el humor, el apoyo mutuo, el cariño y la inspiración, que me ayudaron a sobrevivir en la carrera.

A mis profesores de la facultad, no solo por sus excelentes enseñanzas académicas, sino también por transmitirme su pasión por esta increíble carrera.

Índice

Resumen	5
Introducción	6
1. Multicelularidad	6
2. Mixobacterias	7
3. <i>Myxococcus xanthus</i>	8
4. Medios homogéneos y heterogéneos.....	11
5. Modelos computacionales	12
Justificación	13
Objetivos.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares	14
Hipótesis.....	14
Método.....	15
1. CompuCell 3D.....	15
2. Modelo de <i>M. xanthus</i>	17
A. Energía de elongación	18
B. Energía de curvatura	19
C. Energía de <i>slime</i>	20
D. Energía de adhesión	21
3. Simulaciones computacionales	22
4. Robustez del modelo.....	24
Resultados.....	25
1. Simulaciones cortas.....	25
2. Simulaciones extensas	36
3. Robustez del modelo.....	41
Discusión	48
Conclusión.....	52
Referencias.....	53
Anexo.....	58

Resumen

Myxococcus xanthus es una especie de mixobacterias que presenta células elongadas, y habita en la superficie de los suelos, en donde se desplaza por movimientos de *gliding*. Se ha establecido que el ciclo de vida de *M. xanthus* incluye una fase vegetativa, en la cual se presenta la depredación colectiva hacia otras bacterias. Y una fase de desarrollo, en donde se forman estructuras multicelulares denominadas cuerpos fructíferos, ante condiciones de inanición o falta de alimento. En este proceso de desarrollo multicelular, *M. xanthus* presenta un comportamiento social aparentemente coordinado temporal y espacialmente, que involucra el movimiento colectivo y la agregación de células independientes.

El desarrollo (agregación y diferenciación celular) de *M. xanthus* ha sido descrito ampliamente en medios de cultivo de agar (sólidos) en condiciones estándar de laboratorio. Sin embargo, estos medios suelen ignorar la heterogeneidad de los suelos en donde estas bacterias habitan de forma natural. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue explorar teóricamente con el apoyo de modelos computacionales, las dinámicas de agregación celular del proceso de desarrollo en medios heterogéneos (no estándar), que incluyeron partículas virtuales de diferente tamaño y densidad.

Se construyó un *Modelo de Potts (large-q)* de dos dimensiones, el cual se corrió en simulaciones cortas de medios heterogéneos para 100 condiciones diferentes, variando el tamaño y densidad de las partículas virtuales. Una vez obtenidos los resultados, se eligieron cuatro condiciones contrastantes, que posteriormente se corrieron en simulaciones extensas. Finalmente, para conocer los alcances y limitaciones del modelo, se modificaron ciertas características de este y se analizó la respuesta a dichos cambios.

El modelo computacional que se plantea es considerablemente robusto, y logra reproducir en cierta medida los comportamientos y fenotipos del movimiento colectivo y agregación de la mixobacteria. Por otro lado, en los medios heterogéneos se observaron modificaciones del fenotipo virtual tanto del comportamiento de agregación como de la forma de los agregados resultantes. La intensidad de estas modificaciones varía de acuerdo con la interacción entre el tamaño y densidad de las partículas virtuales, fungiendo en ciertas ocasiones como nucleadores o esparcidores. Esto sugiere que la dinámica de agregación de *M. xanthus*, podría verse modificada en los medios estructurados que habita. Resaltando a la vez la importancia de intentar estudiar y entender las dinámicas de los organismos en el contexto de su medio natural.

Introducción

1. Multicelularidad

La multicelularidad es uno de los acontecimientos más relevantes en la evolución de la vida en el planeta, el cual ha permitido la amplia exploración de formas posibles (morfoespacio) por parte de los organismos, modificando a su vez las interacciones con el medio y otros organismos, es decir, su ambiente (Bonner, 1998; Grosberg y Strathmann, 2007; Laland *et al.*, 2015; Payne y Wagner, 2019; Yuan *et al.*, 2013).

De acuerdo a varios autores (Furusawa y Kaneko, 2002; Grosberg y Strathmann, 2007; Knoll, 2011; Mora Van Cauwelaert *et al.*, 2015), se puede definir a la multicelularidad a partir de ciertas condiciones y características como:

- a) Diferenciación celular: Aparición de varios tipos celulares con diferentes funciones, cuyas células pueden tener el mismo genotipo, pero una expresión genética diferencial debido a mecanismos epigenéticos o a la dinámica de redes génicas.
- b) Adhesión celular: Presencia de moléculas adhesivas como proteínas membranales o matrices extracelulares, que mantienen unidas a las células. Esta adhesión suele ser selectiva entre los distintos tipos celulares.
- c) Comunicación celular: Involucra la transmisión de señales entre células y la posterior respuesta a dichos estímulos, permitiendo la interacción y coordinación celular.
- d) Proliferación celular: La constante producción de células (antes o durante la fase multicelular) contribuyen a la construcción *de novo* y el mantenimiento de estructuras multicelulares.
- e) Proceso de desarrollo robusto: Los procesos del desarrollo deben mantener en cierto grado el fenotipo multicelular en cada repetición del proceso, aún ante cambios ambientales o internos.
- f) Surgimiento de una línea germinal: Se refiere a la aparición de uno o pocos tipos celulares que dan paso a la siguiente generación, mientras que el resto de las células (somáticas) exhiben muerte celular. En algunos casos pueden ser gametos y en otros, esporas o alguna otra estructura de resistencia.

Actualmente prevalecen numerosas incógnitas en torno al origen de la multicelularidad. El registro fósil más antiguo que se conoce para organismos eucariontes, pertenece a algas macroscópicas de 635-550 millones de años (ma) de antigüedad. Aunque también deben considerarse a grupos de procariontes multicelulares como son las cianobacterias, cuyo registro se remonta a aproximadamente 3,600 ma (Grosberg y Strathmann, 2007; Yuan *et al.*, 2013). En este sentido, se considera que la multicelularidad no surgió una única vez, sino que apareció de forma independiente en varios linajes (convergencia), al menos en 25 ocasiones (Bonner, 1998; Yuan *et al.*, 2013).

Existen varias teorías de las causas de la aparición y preservación de esta característica, desde ventajas adaptativas hasta exaptaciones y efectos de autoorganización (Arias Del

Angel *et al.*, 2017; Bonner, 1998; Furusawa y Kaneko, 2002; Grosberg y Strathmann, 2007; Mora Van Cauwelaert *et al.*, 2015), aunque es probable que la multicelularidad sea el resultado de la interacción de varios factores y constricciones. A pesar de algunas controversias, se tienen caracterizados dos tipos de multicelularidad: el clonal, donde dos células producto de la división celular, se mantienen unidas; y el agregativo, en el cual células independientes se asocian y forman una estructura en un momento específico del ciclo de vida (Grosberg y Strathmann, 2007). Este último es el caso de las mixobacterias, un grupo de bacterias con comportamiento social, que forman agregaciones celulares llamadas cuerpos fructíferos (Arias Del Angel *et al.*, 2017).

2. Mixobacterias

Las mixobacterias conforman el orden Myxococcales, un grupo monofilético de las delta-proteobacterias, que en un principio fueron clasificadas como hongos (Kaiser, 2004; Whitworth, 2008). Su divergencia se ha calculado con relojes moleculares entre 2,000 y 800 ma (Arias Del Angel *et al.*, 2017). A la fecha se tienen registradas 58 especies en 29 géneros, sostenidos por evidencia morfológica y molecular de 16 rRNA, que posiblemente representa solo una pequeña parte de su diversidad (Mohr, 2018; Whitworth, 2008). Asimismo, se caracterizan, en general, por poseer largos genomas de más de 9 Mb, en comparación a otros grupos cercanos con genomas de aproximadamente 4.5 Mb (Arias Del Angel *et al.*, 2017).

Se han aislado mixobacterias de excremento, material vegetal vivo y en descomposición, ambientes marinos y dulceacuícolas, y principalmente de suelos de todos los ecosistemas y regiones del mundo. En estos ambientes, las mixobacterias depredan un gran número de especies de procariontas, cuyas células lisan con ayuda de enzimas digestivas y antibióticos, lo que sugiere que pueden llegar a ser importantes elementos en las cadenas tróficas del suelo y otros ambientes (Hartzell, 2016; Mohr, 2018; Whitworth, 2008).

Asimismo, las mixobacterias son organismos que fascinan por su comportamiento social, aparentemente coordinado temporal y espacialmente (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2012). Ante distintas condiciones adversas (dependiendo de la especie), las mixobacterias pueden formar estructuras multicelulares denominadas cuerpos fructíferos. En este proceso las células vegetativas (presentes en el resto del ciclo de vida) se diferencian en células con muerte programada, células periféricas que estructuran los cuerpos o bien, en mixosporas resistentes y reproductivas que pueden germinar en células vegetativas ante condiciones favorables (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Whitworth, 2008). Esta multicelularidad es transitoria, ya que en condiciones favorables el comportamiento social se pierde fácilmente. Incluso se ha documentado que se puede reducir permanentemente cuando se expone a condiciones asociales, por ejemplo, durante 1,000 generaciones (Velicer *et al.*, 1998). Cabe mencionar que estas bacterias pueden presentar otros comportamientos cooperativos como la depredación en grupo (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Whitworth, 2008).

Los cuerpos fructíferos muestran diversas formas que difieren entre especies de mixobacterias, que van desde simples montículos hasta formas ramificadas, dependiendo

del arreglo de las células vegetativas (Arias Del Angel *et al.*, 2017). Se ha hipotetizado que estas estructuras multicelulares, son el resultado de una co-opción o exaptación de elementos, procesos y sistemas regulatorios presentes en el ancestro unicelular, junto con otros fenómenos como duplicación y transferencia horizontal de genes. Ejemplo de esto es el fenómeno de dormancia ante la falta de alimento, que se presenta en varios grupos de bacterias no multicelulares, el cual pudo haber sido cooptado en la escala multicelular (Arias Del Angel *et al.*, 2017). Asimismo, se han propuesto algunas explicaciones adaptacionistas de la aparición de estos cuerpos, tales como su potencial para reducir la competencia local, la protección contra amenazas externas o el mantenimiento del estilo de vida depredador (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

De todas las especies de mixobacterias, *Myxococcus xanthus* es la más ampliamente estudiada, desde un contexto genético, metabólico, ecológico y evolutivo (Whitworth, 2008). Estos estudios se basan en ensayos con cepas silvestres y mutantes en medios estándar en condiciones de laboratorio, los cuales, entre otras cuestiones, han permitido determinar numerosos componentes celulares implicados en el desarrollo multicelular (Kim y Kaiser, 1990; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

3. *Myxococcus xanthus*

M. xanthus es una bacteria con células de forma elongada, que habita en la superficie de los suelos, desplazándose principalmente por movimientos de *gliding* (movimientos suaves en dirección del eje más largo; Kaiser, 2003; Pathak *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Además, esta mixobacteria posee polaridad celular, es decir que presenta diferentes componentes moleculares y celulares en los distintos polos de la célula. Un ejemplo de ello, son los elementos involucrados en el movimiento de reversa. Cada determinado tiempo las células en movimiento se detienen y revierten su dirección, no girando, sino que durante la pausa se intercambian elementos moleculares entre los extremos terminales, causando la inversión de la polaridad (Kaiser, 2003; Zhang *et al.*, 2012).

Otros componentes celulares con polaridad son los involucrados en los dos sistemas de movimiento descritos en *M. xanthus* (Fig. 1), el social (*S-motility*) y el aventurero (*A-motility*). El primer sistema involucra la participación de un pili tipo IV, ubicado en la parte delantera de la célula. Uno o varios de estos pili se enganchan a una célula vecina y se retraen, jalando la célula hacia adelante. En el segundo sistema, se excreta un rastro de polisacáridos (*slime*) en la región posterior de la célula, que más bien empuja la bacteria hacia adelante (Kaiser, 2003; Mauriello *et al.*, 2010; Pathak *et al.*, 2012; Whitworth, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

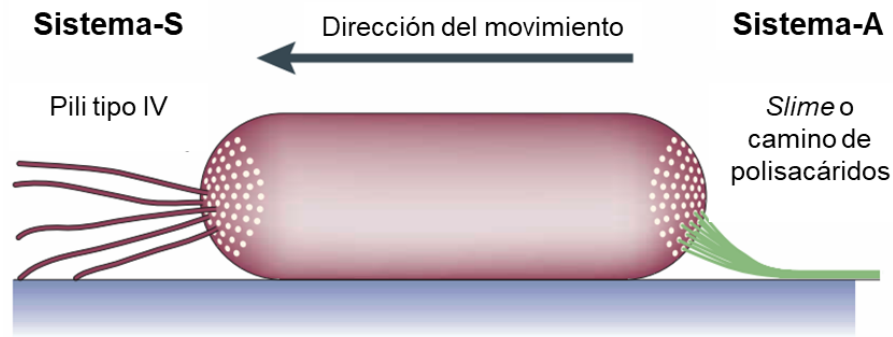


Figura 1. Sistemas de movimiento en *M. xanthus*: tipo A o aventurero, y tipo S o social. Modificado de Kaiser (2003).

Ambos sistemas de movimiento aparecen a lo largo del complejo ciclo de vida de *M. xanthus*, el cual ha sido ampliamente descrito en medios estándar en condiciones de laboratorio, y se menciona a continuación. Durante el crecimiento vegetativo, *M. xanthus* pueden formar masas multicelulares de células que depredan colectivamente (*swarms*). Los *swarms* dirigen su movimiento y penetran en colonias de otras bacterias, las cuales terminan por ser lisadas. Pero, al presentarse condiciones de inanición o falta de alimento, se da la formación de cuerpos fructíferos en forma de montículos, a través del movimiento colectivo celular (Fig. 2; Kaiser, 2003; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016). Estos cuerpos contienen alrededor de 10^5 - 10^6 células, aunque representan solo una porción del total inicial, ya que solo el 15-30% se diferencian en células periféricas, el 5% en mixosporas esféricas y dispersables que al germinar retoman el crecimiento vegetativo, y el resto exhiben muerte celular programada (Arias Del Angel *et al.*, 2018).

El desarrollo multicelular es un proceso costoso y selectivo, que además está acompañado por un conjunto de señales y elementos regulatorios intra e intercelulares (Pathak *et al.*, 2012). Tal es el caso de la señal A, una señal de *quorum sensing* que se difunde en etapas tempranas del desarrollo, y permite censar el estado de la población mediante su concentración. Una vez que se inicia el proceso de desarrollo, las células son coordinadas por la concentración de señal C, la cual se transmite por contacto del polo de una célula al polo de otra célula vecina, bajo una retroalimentación positiva. A pesar de la relevancia de estas señales químicas, es sabido que no son elementos conservados dentro de las mixobacterias y que se requieren de otras tantas señales para completar el ciclo de vida (B, D, E, por ejemplo), pero estas dos son las más estudiadas (Arias Del Angel *et al.*, 2017; Kaiser, 2003; Kim y Kaiser, 1990; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

Asimismo, los patrones de movimiento cambian a lo largo del desarrollo (Fig. 2). El movimiento colectivo inicia a las 3 h de inanición a una baja concentración de señal C, con lo cual se forman patrones de ondas o *rippling*, que avanzan y retroceden hacia a un frente de onda, mediante movimientos de reversa, ocasionando entonces la colisión de las células. Esto aumenta la densidad celular y permite la transmisión de la señal C, incrementando su concentración hasta un nivel medio. Lo que provoca la disminución de la frecuencia de reversas y el alineamiento de las células en grandes cadenas denominadas *traffic jams* o "atascamientos", en los cuales las mismas células bloquean sus movimientos

entre sí, ocasionando que se sigan unas a otras y formando entonces agregados. Estos agregados son temporales y tardan aproximadamente entre 4 y 6 horas para formarse. Pueden desaparecer, o bien, fusionarse con otros agregados, incrementando poco a poco su tamaño, hasta formar cuerpos fructíferos relativamente grandes aproximadamente a las 24 h de inanición. En los centros de estos cuerpos hay una gran cantidad de células con poco movimiento que chocan entre sí, aumentando entonces la transmisión y concentración de la señal C hasta un nivel máximo, lo que da paso a la esporulación. Mientras tanto, en la periferia de los cuerpos se mantienen niveles intermedios de señal C, siendo que las células se mueven libremente alrededor de estas estructuras, en ambos sentidos de las manecillas del reloj. El proceso finaliza con la maduración de las esporas, aproximadamente a las 72 h de inanición (Kaiser, 2003, 2004; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Fig. 2).

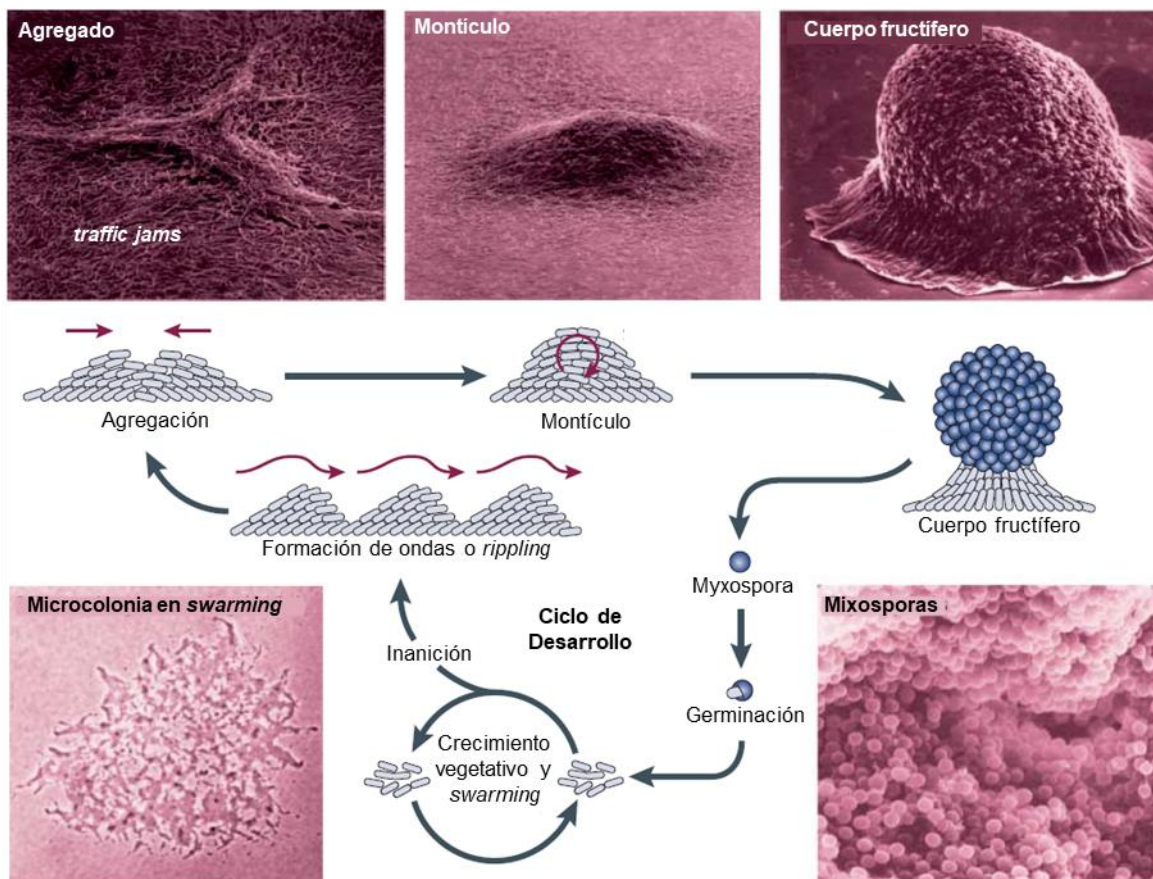


Figura 2. Ciclo de vida de *M. xanthus*. Modificada de Kaiser (2003).

La formación de cuerpos fructíferos requiere tanto de una regulación de los mecanismos de expresión génica como del movimiento colectivo (Zhang *et al.*, 2012). En este sentido se considera que más de 200 genes están involucrados en el desarrollo (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016), siendo que el genoma de *M. xanthus* tiene un tamaño de 9.14 Mb, y se calcula que contiene aproximadamente 7,400 genes (Pathak *et al.*, 2012; Whitworth, 2008). Por otro lado se ha caracterizado que ciertos procesos celulares se arreglan en rutas metabólicas redundantes, es decir, que diferentes procesos forman parte de una misma

ruta (Arias Del Angel *et al.*, 2018; Lancero *et al.*, 2004; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2012; Yu y Kaiser, 2007).

Aunque se menciona que la formación de cuerpos fructíferos de *M. xanthus* requiere de un medio sólido, alta densidad celular y una señal de inanición (Kaiser, 2003; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016), estos se pueden formar bajo una amplia variedad de condiciones (Zhang *et al.*, 2012), mostrando diferentes fenotipos. Por ejemplo, se ha observado que el tamaño de los agregados cambia de acuerdo con la tensión superficial del medio (Rivera-Yoshida *et al.*, 2018). O bien, que al efectuar compresión al agar del cultivo, las células se reorientan en dirección perpendicular a la compresión (elasticotaxis; Yu y Kaiser, 2007). Asimismo, se ha observado variación fenotípica en los cuerpos al aumentar la concentración de agar, lo cual modifica la interacción entre la célula y el sustrato. Siendo que las fuerzas mecánicas afectan de forma diferente a una microescala, y fungen como un agente integral y causal del desarrollo del fenotipo (Rivera-Yoshida *et al.*, 2018, 2019a). Por otra parte, se ha observado que cuando *M. xanthus* crece en glicerol líquido, no se desarrollan cuerpos fructíferos, sino que toda la población se diferencia en esferoblastos, estructuras de resistencia de apariencia similar a las mixosporas (Arias Del Angel *et al.*, 2017). O bien que se puede inhibir el desarrollo de los cuerpos en presencia de luz (Arias Del Angel *et al.*, 2017) o en medios líquidos (Velicer *et al.*, 1998). Además, se ha reportado la presencia de variación fenotípica en varios rasgos del desarrollo en cepas silvestres extraídas de suelos de diferentes regiones, e incluso dentro de una misma muestra de suelo (Kraemer *et al.*, 2010). Por todo esto, podemos pensar que a pesar de los amplios estudios en mixobacterias, sabemos poco sobre el comportamiento de estas, ya que nuestro entendimiento está limitado al estudio de organismos modelos como *M. xanthus*, bajo condiciones específicas y controladas de laboratorio, y no en su ambiente natural (Mohr, 2018; Rivera-Yoshida *et al.*, 2019a,b; Whitworth, 2008; Zhang *et al.*, 2012). (Rivera-Yoshida, Hernández-Terán, Escalante, & Benítez, 2019)

4. Medios homogéneos y heterogéneos

El origen, evolución y desarrollo de las mixobacterias responden a un conjunto de factores genéticos, dinámicas intra e intercelulares, interacciones mecánicas con el medio, relaciones simbióticas, y señales ambientales (Arias Del Angel *et al.*, 2017). Asimismo, sabemos que el fenotipo es el resultado de una compleja interacción entre organismo y ambiente, donde el organismo puede llegar a presentar cambios en respuesta a modificaciones ambientales, a lo cual se le denomina plasticidad fenotípica, una posible causa de cambios evolutivos (Laland *et al.*, 2015; Levins y Lewontin, 1985; Rivera-Yoshida *et al.*, 2019a).

Por mucho tiempo las bacterias han sido consideradas como organismos unicelulares, cuyos ambientes son medios de cultivo en condiciones estándar de laboratorio (Zhang *et al.*, 2012). Pues sus medios naturales son tan complejos, que hacen difícil observar, manipular y estudiar el fenotipo de los microorganismos (Whitworth, 2008). Sin embargo, se requieren nuevos estudios que consideren interacciones dinámicas entre fenotipos y variables ambientales, como las de su medio natural, buscando la aparición de fenotipos desconocidos (Rivera-Yoshida *et al.*, 2019a,b).

Uno de estos intentos es el de Vallespir y Ursell (2019), en el cual establecen modelos computacionales para simular interacciones de competencia entre especies de bacterias, cuyos resultados son ya bien conocidos en medios homogéneos o estándares. Sin embargo, al agregar a estas simulaciones partículas virtuales, las interacciones se modifican cualitativamente. Esto sugiere que un medio estructurado o heterogéneo, como el que encontramos en los ambientes naturales de las bacterias, puede modificar la dinámica del comportamiento típico en medios homogéneos.

Retomando el caso de *M. xanthus*, se sabe que esta mixobacteria es capaz de censar la topografía de su medio y modificar la dirección de su movimiento, en respuesta al encuentro con otras células u objetos situados en los medios de agar (Meel *et al.*, 2012; Yu y Kaiser, 2007). Por ello, es importante estudiar a este organismo en medios heterogéneos, por ejemplo, medios con partículas que introduzcan un grado de heterogeneidad espacial más similar al de las condiciones naturales de su medio.

5. Modelos computacionales

Existen varias dificultades y limitaciones al tratar de estudiar experimentalmente el movimiento celular y la agregación de *M. xanthus*, como son: la rápida modificación y desecación de los medios de agar; la manipulación de variables a una microescala; la resolución y sensibilidad de aparatos para obtener señales débiles; y la pérdida de la interacción célula-sustrato ante el uso de microscopía avanzada (Ducret *et al.*, 2013). Por ello, el uso de modelos computacionales es una buena opción para estudiar la agregación colectiva en medios homogéneos y heterogéneos.

Los modelos computacionales son herramientas que se incorporan dentro del trabajo teórico, y su objetivo es replicar el comportamiento de los sistemas. En general permiten: hacer pruebas de principio o que son difícil de hacer en laboratorio; realizar estudios exploratorios; generar y poner a prueba hipótesis; proponer e interpretar experimentos; e integrar conocimiento (Brodland, 2015; Sharpe, 2017). Existe un debate vigente sobre el valor informativo y la capacidad de proveer explicaciones causales, tanto de los modelos como del trabajo teórico, en comparación con el trabajo experimental (Brodland, 2015; Goldstein, 2018; Parke, 2014). Aunque, es cierto que en los últimos años se ha incrementado el uso de modelos en los sistemas biológicos, y han demostrado ser herramientas bastante útiles que proveen de información valiosa e hipótesis robustas, complementando el trabajo experimental (Brodland, 2015; Goldstein, 2018). Algunos ejemplo son: Arias Del Angel *et al.* (2018), Mora Van Cauwelaert *et al.* (2015), Vallespir Lowery y Ursell (2019).

Los modelos computacionales suelen construirse con base en información empírica de las propiedades elementales de los componentes de un sistema, haciendo uso de relaciones matemáticas y algoritmos computacionales (Brodland, 2015; Swat *et al.*, 2012). Específicamente, en biología celular existen tres tipos de modelos que permiten estudiar diferentes aspectos, como son (Glazier *et al.*, 2007; Sharpe, 2017; Swat *et al.*, 2012):

- a) Modelo continuo: Las células se representan como una densidad celular continua con propiedades mecánicas específicas, sin representar la individualidad de dichas células.
- b) Modelo puntillista (*pointillistic*): Caracteriza tejidos biológicos mediante puntos, cada punto representa el centroide de una célula, y estas solo pueden interactuar cuando se encuentran suficientemente cerca. Se ignoran varias características celulares como la forma celular y las interacciones de adhesión.
- c) Modelo orientado a células (*cell-oriented*): Representa células individualizadas y delimitadas por bordes. Permite implementar características e interacciones particulares, como formas celulares complejas. Por lo cual, es ideal para estudiar en detalle el movimiento colectivo celular y la agregación de *M. xanthus*.

Justificación

Hasta ahora se sabe que en la bacteria *M. xanthus* el movimiento y agregación celular, y la consecuente transmisión de señales químicas por contacto celular, son indispensables para la regulación de genes y la señalización de varios procesos asociados al desarrollo de cuerpos fructíferos multicelulares. Este proceso está bastante bien entendido en medios de cultivo en condiciones estándar de laboratorio, los cuales están lejos de asemejar un suelo compuesto por diversas partículas, el medio en el que *M. xanthus* se encuentra de forma natural.

Entonces, es importante comenzar a entender cómo ocurre la agregación celular de *M. xanthus* en medios heterogéneos, los cuales por sí mismos parecen modificar algunos de los comportamientos e interacciones bien entendidas en microorganismos, por ejemplo, alterar localmente la densidad celular.

Esta aproximación se puede realizar a través de un modelo computacional, el cual facilita el estudio de los sistemas a una microescala, en cuanto a tiempo, costos, y obtención y procesamiento de variables cualitativas y cuantitativas de, en este caso, la agregación celular. Asimismo, permite explorar y entender diferentes factores que intervienen e interactúan dentro de la migración colectiva de *M. xanthus*.

Objetivos

Objetivo general

Explorar con apoyo de modelos computacionales, las dinámicas de agregación celular en la formación de cuerpos fructíferos de *Myxococcus xanthus*, en medios homogéneos y con partículas virtuales.

Objetivos particulares

1. Integrar la evidencia empírica en un modelo computacional que contenga las características mínimas para reproducir un proceso de agregación celular similar al de *M. xanthus* en medios homogéneos.
2. Realizar simulaciones de células virtuales de *M. xanthus* en medios con partículas virtuales de diferente tamaño y densidad para explorar el efecto de las partículas en la agregación.
3. Explorar la robustez y limitaciones del modelo, modificando los valores de los diferentes parámetros empleados, así como otras propiedades celulares y del medio.

Hipótesis

Se espera que la introducción de partículas virtuales modifique el comportamiento de la dinámica de agregación celular, y con ello la proporción del total de células que se agregan y el número y tamaño de los agregados formados, respecto a medios homogéneos. Además, se espera que los efectos de las partículas sobre la agregación dependan no linealmente del tamaño y densidad de éstas.

Método

1. CompuCell 3D

Abordar los objetivos de este trabajo requieren de un modelo computacional orientado a células, como anteriormente se mencionó (véase Introducción: Modelos computacionales). Una plataforma que emplea este tipo de modelos y por tanto se eligió para construir las simulaciones, es CompuCell 3D (CC3D). CC3D emplea un formalismo específico denominado *Glazier-Graner-Hogeweg* o GGH. Este también se conoce como *Modelos de Potts*, aunque más bien es una extensión de los modelos *large-q Potts Model*. Muestra algunas particularidades como propiedades y condiciones iniciales que responden a una configuración biológica, mientras que otros modelos responden a propiedades más bien físicas. Por ejemplo, en ciertos casos las células biológicas requieren permanecer unidas unas a otras, mientras que las células virtuales de *Potts* no pueden mantener esta característica. Asimismo, los *Modelos de Potts* presentan condiciones iniciales aleatorias que no se observan en los sistemas biológicos, ya que las células generalmente se encuentran en un arreglo definido de acuerdo con el ciclo de vida o el tejido del que forman parte, lo cual se puede implementar mediante el formalismo GGH (Glazier *et al.*, 2007; Swat *et al.*, 2012).

La plataforma CC3D se representa con una cuadrícula o *lattice* (Fig. 3), la cual está formada por numerosos píxeles. Estos píxeles conforman células generalizadas (i) con determinados atributos, como una identidad celular o *cell index* (σ), que puede corresponder a una célula, o bien, a un compartimiento subcelular, un conjunto de células, o material no celular. Esta identidad también permite representar células con diferentes tipos celulares ($\tau(\sigma)$). Otros atributos son los estados internos celulares, como el volumen o el área superficial; y características auxiliares (*auxiliary fields*) como redes de interacción bioquímica o matrices extracelulares (Glazier *et al.*, 2007; Mora Van Cauwelaert *et al.*, 2015; Swat *et al.*, 2012).

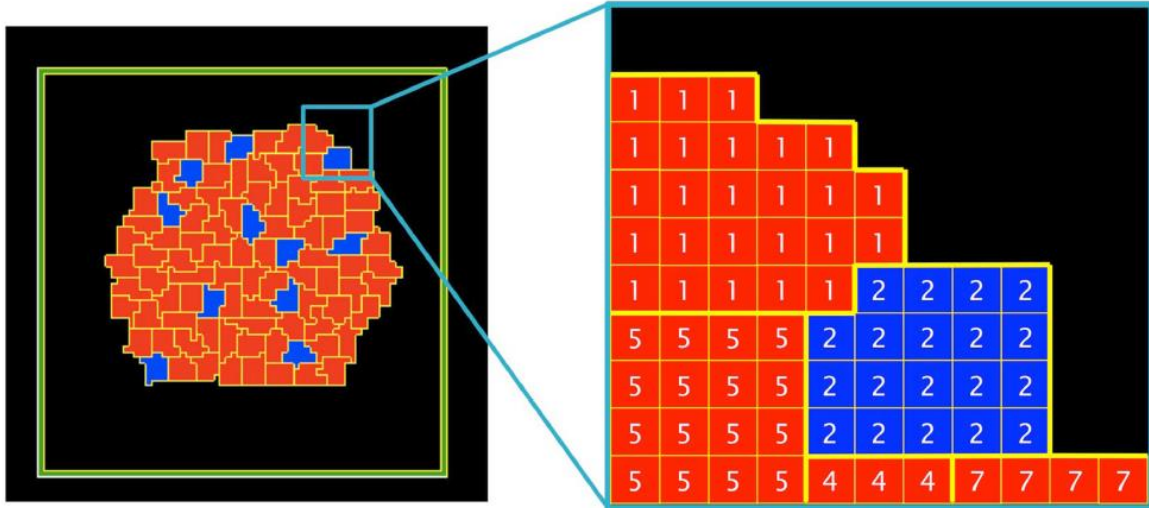


Figura 3. Representación visual de la plataforma CompuCell 3D. Se muestra la cuadrícula (*lattice*) compuesta por píxeles, en este caso, cada cuadrado representa un píxel. Estos píxeles conforman células generalizadas (i), es decir, células con bordes amarillos, o bien material no celular como el medio representado en negro. A la derecha se presenta un aumento, y se indican las diferentes células (σ) mediante distintos números, las cuales además pertenecen a diferentes tipos celulares ($\tau(\sigma)$) rojo o azul. Tomado de Mora Van Cauwelaert *et al.* (2015).

Asimismo, la plataforma CC3D hace uso de una función de energía efectiva o Halmitoniana, sobre la cual se implementan las diferentes propiedades, comportamientos e interacciones celulares, con ayuda de ecuaciones diferenciales ordinales o parciales, y parámetros adimensionales. El comportamiento celular dependerá del equilibrio entre las diferentes fuerzas (características) introducidas, mediante la minimización de la energía. Esto es efectuado por un algoritmo de simulación de Monte Carlo (Fig. 4), el cual en cada paso (MCS) elige de forma discreta y aleatoria un sitio blanco (*target site*, es decir un píxel objetivo) de la cuadrícula, cuyo estado cambia o mantiene, de acuerdo a una función de aceptación de Boltzmann (Glazier *et al.*, 2007; Hirashima *et al.*, 2017; Swat *et al.*, 2012)

$$P \begin{bmatrix} \text{transición} \\ \text{aceptada} \end{bmatrix} = \begin{cases} 1 & \text{sí } \Delta H \leq 0, \\ \exp(-\Delta H/T_m) & \text{sí } \Delta H > 0 \end{cases} \quad (1)$$

Donde ΔH es el cambio de energía, y T_m es un parámetro que describe la amplitud de las fluctuaciones en la membrana celular (fluctuaciones biológicas aleatorias). Esta función describe que, si el cambio de energía para un sitio es igual o menor a 0 (no se incrementa la energía), se tiene un valor de aceptación de 1. Pero si este cambio es mayor a 0, es decir, que incrementa la energía, el valor de aceptación es mucho menor, lo que implica que bien puede o no, darse un cambio en el estado del píxel (Fig. 4). Reiterando que, el cambio de un estado a otro, se basa en la minimización de la energía efectiva (Hirashima *et al.*, 2017).

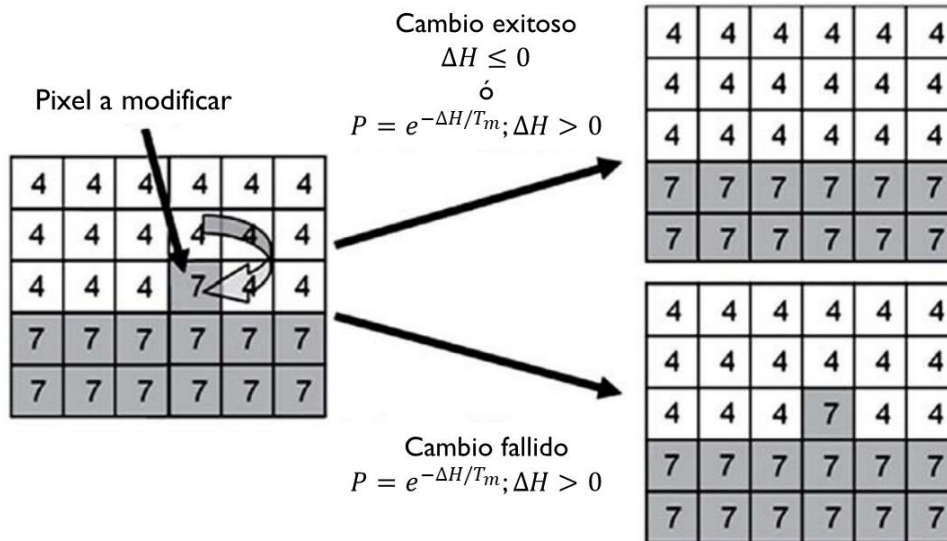


Figura 4. Representación de una simulación de Montecarlo, en la cual se elige un píxel aleatoriamente (izquierda), y su estado cambia (derecha-arriba) o se mantiene (derecha-abajo) de acuerdo con la función de aceptación de Boltzmann. Esta función responde a la minimización de la energía efectiva, es decir que, si el cambio de energía es menor a 0, entonces se acepta el cambio de estado del píxel (exitoso). Pero si este cambio es mayor a 0, entonces pueden ocurrir ambas situaciones, tanto que se dé este cambio de estado en el píxel (cambio exitoso) como que se rechace (cambio fallido). Modificado de Swat *et al.* (2012).

Una de las ventajas de usar la plataforma CCD3, es que la simplicidad del modelo GGH permite describir eficientemente un fenómeno biológico, así como el entendimiento de sus componentes. También permite incluir casi cualquier comportamiento celular, a través de los términos apropiados de la energía efectiva. En cuanto a practicidad, permite la simulación de agregados relativamente grandes en corridas rápidas, con el uso de una memoria moderada (Glazier y Graner, 1993; Glazier *et al.*, 2007; Hirashima *et al.*, 2017). Es por todo lo anterior, que la plataforma CompuCell 3D se empleó en su versión 3.7.8, para simular agregaciones celulares de *M. xanthus* en medios homogéneos y heterogéneos.

2. Modelo de *M. xanthus*

Existen varios modelos computacionales que intentan recrear la formación de cuerpos fructíferos de *M. xanthus*, empleando diferentes herramientas (Bahar *et al.*, 2014; Balagam e Igoshin, 2015; Balagam *et al.*, 2014; Cotter *et al.*, 2017; Holmes *et al.*, 2010; Igoshin *et al.*, 2004; Janulevicius *et al.*, 2010; Janulevicius *et al.*, 2015; Sozinova *et al.*, 2005; Starruß *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018). Estos se enfocan en distintas partes del proceso de desarrollo como la fase de *rippling*, formación de *traffic jams*, etapas tempranas o tardías de la agregación, o bien, la formación de montículos o cuerpos fructíferos. Asimismo, parten de diferentes supuestos que a veces se contradicen entre los diferentes modelos, aunque todos consideran medios homogéneos.

En este trabajo, se intentó modelar la agregación celular en medios heterogéneos, considerando tanto estudios experimentales como trabajos de modelación. Asimismo, hay que mencionar que, en concordancia con los objetivos del trabajo, no se buscó modelar el proceso completo de desarrollo, sino que se acotó al intervalo que involucra el movimiento colectivo durante la agregación, y que puede ser considerado desde la formación de *traffic jams*, hasta el establecimiento de los agregados. Es por esto que en este trabajo no se toma en consideración la participación del de la señal A, la cual es relevante en las primeras etapas y da inicio al desarrollo (Kaiser, 2003, 2004), y se da por supuesto que existen las condiciones requeridas para que se dé el proceso de desarrollo. Tampoco se incluye a la señal C, suponiendo que, en esta etapa del desarrollo las células ya cuentan con una determinada concentración de la señal, que ocasiona el seguimiento de unas células a otras dentro de los *traffic jams*, provocando posteriormente la formación de agregados. Otros eventos dependientes de la concentración de la señal C, y que por tanto no se incluyen en el modelo, son la formación de *rippings*, disminución de la frecuencia de reversas y la esporulación (Kaiser, 2003, 2004; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

Asimismo, se modificaron las condiciones iniciales a las ya reportadas para la agregación en *M. xanthus*, es decir una alta densidad celular como consecuencia del choque entre ondas de *rippling* (véase en la introducción). Esto porque, por cuestiones de simplicidad y estandarización se parte del arreglo aleatorio de células orientadas verticalmente (Fig. 5).

En síntesis, el modelo de *M. xanthus* que se presenta, considera aquellas características (sumados de la función de energía) que permiten el seguimiento de las células, y como resultado del modelo, se obtienen agregados multicelulares, bajo la energía Hamiltoniana

$$H_{GGH} = E_{elongación} + E_{curvatura} + E_{slime} + E_{adhesión}. \quad (2)$$

Las características del modelo se describen a continuación, los parámetros asociados se compilan en la Tabla 1 y los códigos respectivos se muestran en las Figuras 1-3 del anexo.

A. Energía de elongación

Las células de *M. xanthus* muestran una forma elongada, midiendo 0.5 x 5-7 μm en todos los tipos celulares, con excepción de las mixosporas esféricas (Kaiser, 2003). Para introducir esta característica, se emplearon 12 segmentos o píxeles continuos (siguiendo la proporción 1:12; Fig. 5) que representan una célula. Siendo que estas células mantienen su alargamiento mediante una energía de constricción (Merks *et al.*, 2006)

$$E_{elongación} = \lambda_L \sum_{\sigma} (l_{\sigma} - L_{\sigma})^2. \quad (3)$$

Donde l_{σ} es el largo de una célula cualquiera σ , L_{σ} es el largo que se busca que tengan las células y λ_L es la intensidad de la constricción de alargamiento. La energía de elongación puede causar la partición de las células, por lo cual se agregó una constricción de conectividad (Merks *et al.*, 2006). Esta constricción hace referencia a la continuidad y cohesión de las células, y no es una energía, sino que más bien es una condición de

penalización. Se basa en conocer la identidad celular (σ , *cell index*) de un conjunto de píxeles y como estos se arreglan, para entonces aprobar o rechazar el cambio de estado del píxel central \vec{x} . Esto se puede conocer contando el número de píxeles vecinos \vec{x}'_i alrededor de un píxel en particular \vec{x} , que tengan la misma identidad celular σ (es decir que forman parte de la misma célula). Pero, estos píxeles vecinos \vec{x}'_i solo pueden ser contados si además su píxel consecutivo ya sea \vec{x}'_{i+1} (en sentido a las manecillas del reloj) o \vec{x}'_{i-1} (en sentido inverso a las manecillas del reloj), presenta una identidad celular distinta, es decir,

$$\sum_i \delta_{\sigma(\vec{x}), \sigma(\vec{x}'_i)} \left(2 - \delta_{\sigma(\vec{x}), \sigma(\vec{x}'_{i+1})} - \delta_{\sigma(\vec{x}), \sigma(\vec{x}'_{i-1})} \right) > 2. \quad (4)$$

Donde δ es una distribución Dirac que puede tomar valor de 0 si el píxel vecino \vec{x}'_i presenta la misma identidad celular que el píxel central \vec{x} , pero distinta a su píxel consecutivo $\vec{x}'_{i\pm 1}$; o puede tomar valor de 1 si los píxeles no cuentan con estas dos características. Cuando el conteo de píxeles es mayor a 2, se podría romper la conectividad de la célula si existe un cambio de estado. Por lo cual, este cambio se rechaza mediante la adición de un alto valor de penalización de conectividad \mathcal{C} (Tabla 1).

Por otro lado, para probar la robustez del modelo (véase adelante en Robustez del modelo) se emplearon células compactas (en lugar de elongadas; Fig. 21) en algunas de las simulaciones. A estas células compactas no se les incorporó una energía de elongación (3) y por tanto, tampoco se integró una restricción de conectividad (4). Sino que estas células mantienen su forma mediante la energía (Swat *et al.*, 2012)

$$E_{volumen} = \lambda_V (v_\sigma - V_\sigma)^2, \quad (5)$$

donde el volumen hace referencia a la cantidad de píxeles de una célula, es decir, el área en lugar de un volumen real; v_σ es el volumen de una célula σ , V_σ es el volumen deseado o blanco, y λ_V es el valor de restricción del volumen.

B. Energía de curvatura

Las células elongadas de *M. xanthus* exhiben un movimiento semiflexible, en este caso se debe asegurar que el radio de curvatura de la célula no exceda un límite, evitando contorsiones anormales (Starruß *et al.*, 2007)

$$E_{curvatura}(\sigma) = \lambda_C \sum_{xi=1}^{xi+10} \left(1/R_{curva}(S_{\sigma(xi)}, S_{\sigma(xi+1)}, S_{\sigma(xi+2)}) \right)^2, \quad (6)$$

$$R_{curva}(S_{\sigma(xi)}, S_{\sigma(xi+1)}, S_{\sigma(xi+2)}) = \frac{|S_{\sigma(xi+2)} - S_{\sigma(xi)}|}{2 \sin(\angle(S_{\sigma(xi)}, S_{\sigma(xi+1)}, S_{\sigma(xi+2)}))}. \quad (7)$$

La energía es la suma de la curvatura ($1/R$) de los segmentos, multiplicada por un valor de constricción de curvatura λ_c . Este radio de curvatura se genera a partir de los centros de masa $S_{\sigma(x_i)}$ de tres segmentos consecutivos ($x_i, x_i + 1, x_i + 2$), que pertenecen a una célula σ .

C. Energía de *slime*

Las células de *M. xanthus* presentan una matriz extracelular, un componente heterogéneo que contiene principalmente exopolisacáridos, y otros elementos como proteínas, vesículas de lípidos, señales químicas, y ADN extracelular. Este es un importante elemento que participa en la motilidad, reconocimiento celular, coordinación del comportamiento social, transmisión de señales químicas, y en general en el desarrollo de la mixobacteria (Gloag *et al.*, 2016; Kaiser, 2003; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2012).

En relación al movimiento celular (Fig. 1), la matriz extracelular permite el anclaje de los pili tipo IV del movimiento social (*S-motility* o *twitching*), mediante una red de proteínas y polisacáridos denominados fibrilas, que están embebidas en la matriz (Gloag *et al.*, 2016; Kaiser, 2003; Mauriello *et al.*, 2010; Pathak *et al.*, 2012; Pelling *et al.*, 2005). Por su parte, en el aventurero (*A-motility*) la matriz facilita el movimiento de *gliding*. Sin embargo, se desconoce exactamente cómo se genera el empuje de las células, por lo que se han propuesto dos modelos: “rotor helicoidal” y “adhesión focal”. El primero postula que el citoesqueleto dispuesto en forma helicoidal a lo largo de la célula, funge como un motor que genera una fuerza de torsión. Mientras que el segundo, propone que ciertos componentes de la membrana se anclan al sustrato con ayuda de la matriz extracelular, formando así un sitio de adhesión (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012). Aunque es posible que el movimiento sea resultado de ambos elementos (Balagam *et al.*, 2014; Mauriello *et al.*, 2010; Pelling *et al.*, 2005). En este movimiento aventurero, las células forman caminos visibles o *slimes* de exopolisacáridos principalmente, que tienden a ser seguidos por otras células (Kaiser, 2003; Yu y Kaiser, 2007). La migración por estos *slimes* promueven la formación de regiones densas de células alineadas y favorece el contacto entre células, mientras que los movimientos en reversa renuevan o incrementan el tamaño de los caminos (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Yu y Kaiser, 2007). Aunque es posible o no que los *slimes* contribuyan como un mecanismo de propulsión, se piensa que proveen de un sustrato preferencial o un camino que guía a las células (Zhang *et al.*, 2012), ya que estos forman surcos que se vuelven más profundos conforme aumenta la concurrencia de estos caminos (Gloag *et al.*, 2016).

Esta serie de características se implementaron en el modelo mediante una función similar a la que se usa para modelar la quimiotaxis en CC3D. En este caso el *slime* es secretado por las células y decae bajo una determinada tasa. Sin embargo este *slime* no se difunde, y al ser encontrado por una célula, ésta última tiende a seguirlo (Swat *et al.*, 2012)

$$\Delta E_{slime} = -\lambda_s (c(\vec{x}_{i+1}) - c(\vec{x}_i)), \quad (8)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c + (-kc) + F. \quad (9)$$

Siendo λ_s un valor de atracción de las células hacia un gradiente de concentración de la sustancia secretada, en ese caso el *slime*. Mientras que $c(\vec{x}_{i+1})$, $c(\vec{x}_i)$ hacen referencia a la concentración de *slime* de un píxel fuente (actual) y un píxel blanco (objetivo), respectivamente. Por su parte D es la constante de difusión (en este caso se fija en 0), k una constante de decaimiento de una concentración c , y F la constante de secreción del *slime*. Estrictamente hablando, el modelo solo integra uno de los dos sistemas de movimiento, es decir, el aventurero. Sin embargo, se han reportado que este tipo de movimiento se favorece durante la agregación celular (Shi y Zusman, 1993). Por otro lado, se ha reportado experimentalmente que en cepas mutantes que presentan únicamente el movimiento aventurero, las células muestran cierto grado de alineación (Pelling *et al.*, 2006) debido posiblemente a la presencia de *slimes*. Asimismo, algunos modelos computacionales (Sozinova *et al.*, 2005; Starruß *et al.*, 2007) sugieren que la forma elongada facilita el alineamiento de las células, lo cual se asocia a la interacción célula-célula. En este caso, se observó que las células se alineaban unas con otras por sí misma, por lo cual no fue necesario implementar una energía que representara el alineamiento celular. Por su parte, la intensidad de propulsión de las células está dada por el valor de temperatura de la membrana.

D. Energía de adhesión

Como ya se mencionó, la matriz extracelular está asociada a varias funciones. Una de ellas es facilitar la adhesión celular, la cual permite a su vez sostener la multicelularidad de la bacteria (Muñoz-Dorado *et al.*, 2016), siendo en este caso (Mora Van Cauwelaert *et al.*, 2015; Swat *et al.*, 2012)

$$E_{adhesión} = \sum_{\vec{i}, \vec{j}, \text{vecinos}} J(\tau_{\sigma(\vec{i})}, \tau_{\sigma(\vec{j})})(1 - \delta_{\sigma(\vec{i}), \sigma(\vec{j})}), \quad (10)$$

donde J representa el valor de adhesión entre un par de píxeles continuos \vec{i}, \vec{j} , que pertenecen a diferentes células (σ, σ'), las cuales a su vez pertenecen a un determinado tipo celular τ . En este caso se ingresaron diferentes valores de adhesión J , para los diferentes tipos celulares (Tabla 1). Siendo que en CC3D un menor valor de J , representa una mayor adhesión. Como ya se mencionó, no todos los píxeles contribuyen a la energía de adhesión, solo lo hacen aquellos que se encuentran en una zona de interfaz o contacto entre dos células distintas \vec{i}, \vec{j} . Lo anterior se logra mediante $(1 - \delta_{\sigma(\vec{i}), \sigma(\vec{j})})$, donde δ es una distribución Dirac que puede tomar valores de 0 si los píxeles son parte de la zona de contacto, o 1 si los píxeles pertenecen a una misma célula.

Tabla 1. Parámetros empleados en el modelo computacional de *M. xanthus*. Estos valores en general se determinaron a través de comparaciones con las características fenotípicas de células reales de *M. xanthus* (Kaiser, 2003; Pelling *et al.*, 2005; Yu y Kaiser, 2007). Con excepción de kT_m , λ_V , λ_S y J , en los cuales se tomaron como referencia otros modelos de CC3D (Swat *et al.*, 2012). MCS se refiere al número de pasos de Monte-Carlo, en este caso corresponde a una unidad de tiempo.

Parámetro	Valor	Unidad	Descripción
λ_L	30	-	Constricción de alargamiento
L_σ	12	Píxel	Largo celular blanco o deseado
C	100000000000	-	Constricción de conectividad
λ_V	5	-	Constricción de volumen
V_σ	12	Píxel	Área blanco o deseado de la célula
λ_C	1000000	-	Constricción de curvatura
λ_S	10	-	Valor de atracción de las células por <i>slime</i>
F	0.9	Cantidad sustancia / MCS	Constante de secreción de <i>slime</i>
D	0	Distancia / MCS	Constante de difusión de <i>slime</i>
k	0.006	Cantidad sustancia / MCS	Constante de decaimiento de <i>slime</i>
T_m	10	-	Temperatura de la membrana
J_{mm}	0	Presión	Adhesión: Medio-Medio
J_{mc}	10		Medio-Célula
J_{cc}	3		Célula-Célula
J_{cp}	10		Célula-Partícula
J_{pp}	0		Partícula-Partícula
J_{pm}	0		Partícula-Medio

3. Simulaciones computacionales

Las simulaciones se efectuaron en dos dimensiones (2D) con condiciones de frontera periódicas (mundo circular). Una vez asegurada la formación de agregados virtuales en medios homogéneos, se procedió a realizar simulaciones con partículas virtuales. Debido a la capacidad de memoria y tiempo, se realizaron simulaciones cortas en una cuadrícula de 300 x 300 con 700 células virtuales y 2,000 pasos de Monte-Carlo (MCS). Este último se determinó mediante la disminución en la curvatura de la dinámica de diferentes variables en medios homogéneos (Anexo Fig. 4-6).

Los medios heterogéneos se construyeron con partículas virtuales cuadradas inmovilizadas o “congeladas”, la forma se eligió por su simplicidad. Las células no pueden ocupar el mismo espacio que una partícula virtual, ni pasar por encima de ésta, haciendo referencia a observaciones experimentales (Meel *et al.*, 2012). Las simulaciones se programaron con 100 condiciones iniciales diferentes, modificando el tamaño y la densidad de las partículas virtuales, es decir, cambiando en el número de píxeles de los lados del cuadrado y el espaciamiento de las partículas, respectivamente. En total, se simularon diez tamaños y diez densidades de partículas virtuales diferentes, aunque en algunos casos estos valores fueron modificados uno o dos unidades para hacer coincidir las métricas de la condición con el tamaño de la cuadrícula (Anexo Tabla 1). Una vez establecidas las partículas virtuales en la simulación, se añadían las células virtuales de forma aleatoria en los espacios

sobrantes (Fig. 5b). Se realizaron diez simulaciones por condición, siendo en total 1,000 simulaciones.

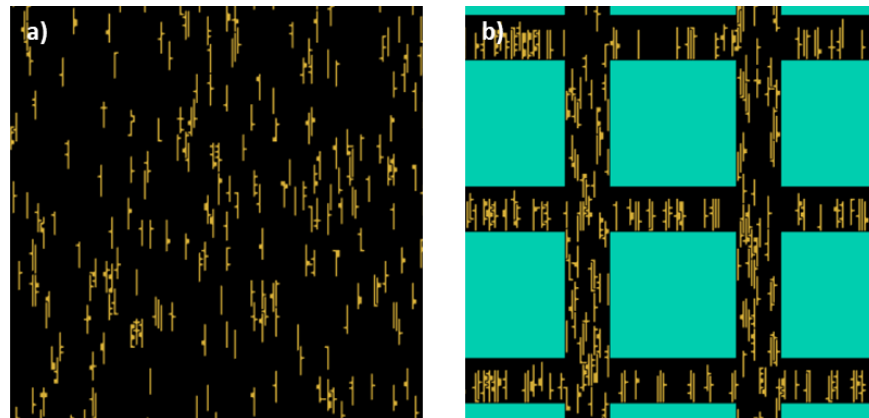


Figura 5. Se presentan las condiciones iniciales (0 MCS) de células virtuales en: a. Medio homogéneo; b. Medio heterogéneo con partículas virtuales de tamaño 46 y espaciadas cada 16 unidades (46, 1/16). En este caso las células virtuales no se muestran totalmente elongadas, lo cual se modifica conforme avanza la simulación y se efectúan las diferentes energías. Los elementos en amarillo y verde corresponden a células y partículas virtuales, respectivamente. Escala de imagen: 150 x 150.

Para comparar las dinámicas correspondientes a las distintas condiciones iniciales, se cuantificó la proporción del total de células que se agregaban (es decir, aquellas células que estaban unidas a al menos una célula vecina), el número de agregados y el tamaño promedio de los 5 agregados más grandes. Para lo cual, se programó un código que proporciona la identidad de las células virtuales y sus vecinos (código elaborado por Juan Arias del Angel) cada 50 pasos de Monte-Carlo (MCS). Es importante mencionar que se decidió emplear los 5 agregados más grandes en la comparación del tamaño, debido a que el promedio de todo el conjunto de agregados mostraba desviaciones de los datos bastante considerables, que a su vez diluía las diferencias que había entre las condiciones iniciales. Los datos se analizaron y se generaron gráficos con los softwares Spyder (Python 3.7; <https://www.spyder-ide.org/>) y R 3.6.0 (<https://www.r-project.org/>), con apoyo de las librerías “network”, “re”, “numpy”, “matplotlib.pyplot”, y “ggplot2”, “moments”, respectivamente. Los códigos tanto del modelo como del procesamiento de los datos, se encuentran disponibles en el siguiente enlace: https://github.com/laparcela/Myxo_heterogeneous_media_model.

Una vez obtenidos los resultados, se tomaron las condiciones de 4 casos contrastantes y se corrieron en simulaciones largas o extensas, para analizar con mayor detalle el movimiento colectivo y la agregación en cada caso. Estas simulaciones se corrieron en una cuadrícula de 1,100 x 1,100, con 10,000 células virtuales a lo largo de 10,000 pasos de Monte-Carlo (MCS) para 4-5 réplicas. De igual forma se cuantificaron cada 200 MCS las variables ya mencionadas para las simulaciones cortas.

4. Robustez del modelo

Para conocer la robustez y limitaciones del modelo, primeramente se efectuaron simulaciones en medios homogéneos en los cuales se modificó el valor de algunos de los parámetros incorporados, en este caso se eligió la densidad celular (número de células virtuales), constricción de curvatura (λ_c), atracción por *slime* (λ_s), decaimiento de *slime* (k), y adhesión entre células virtuales (J_{cc}). Para realizar las comparaciones, se cuantificó el número y el tamaño promedio y máximo de los agregados virtuales.

Asimismo, se corrieron simulaciones para medios virtuales heterogéneos. En estos se analizó tanto la forma de las células virtuales como la organización de las partículas virtuales. Cuantificando al igual que en las otras simulaciones de medios heterogéneos, la proporción de células agregadas y el número y tamaño de agregados (promedios de los 5 más grandes). Para analizar el papel de la forma celular (células compactas vs células alargadas), se corrieron simulaciones de medios heterogéneos añadiendo partículas virtuales de diferente tamaño y densidad (Anexo, Tabla 2), junto con células compactas. La energía asociada se describe en la subsección “A. Energía de elongación” (véase el Método). Por otra parte, se probó también la organización del medio, la cual se refiere a la adición de partículas virtuales de forma aleatoria. Ya que, hasta este momento en todas las simulaciones se habían añadido partículas virtuales con un arreglo ordenado, similar a una cuadrícula (Fig. 5b). Para este caso, las partículas virtuales añadidas cuentan con tamaños de 24 y 47, y densidades de 1/47 y 1/59, respectivamente.

Las simulaciones tanto de medios homogéneos como heterogéneos se corrieron en una cuadrícula de 300 x 300, con 700 células virtuales (con excepción de aquellas donde se analizó la densidad celular, y por tanto se añadieron diferente número de células virtuales), durante 2,000 MCS en 10 réplicas.

Resultados

El modelo que se presenta, responde relativamente bien a las características biológicas del movimiento colectivo y agregación de *M. xanthus* reportado en medios homogéneos (Fig. 6). En particular, reproduce la migración colectiva de células virtuales, fusión de agregados y la formación de estructuras entrelazadas que se asemejan a *traffic jams* (Fig. 2). A medida que avanza la simulación, se observa un aumento en el tamaño de los agregados, que se asocia a la fusión de células aisladas, o bien, de otros agregados. Conforme se agregan estas células virtuales, se forman estructuras cada vez más alargadas y ramificadas. Aunque estos fenotipos ramificados son el resultado de la interacción (influencia) de las diferentes energías integradas en el modelo, es posible que la presencia del *slime* sea la principal causa de la morfología de dichas estructuras (Fig. 6b). Siendo que estos *slimes* redirigen la trayectoria de las células virtuales hacia otras células o agregados. Esta hipótesis se pone a prueba más adelante en la sección “Robustez del modelo”.

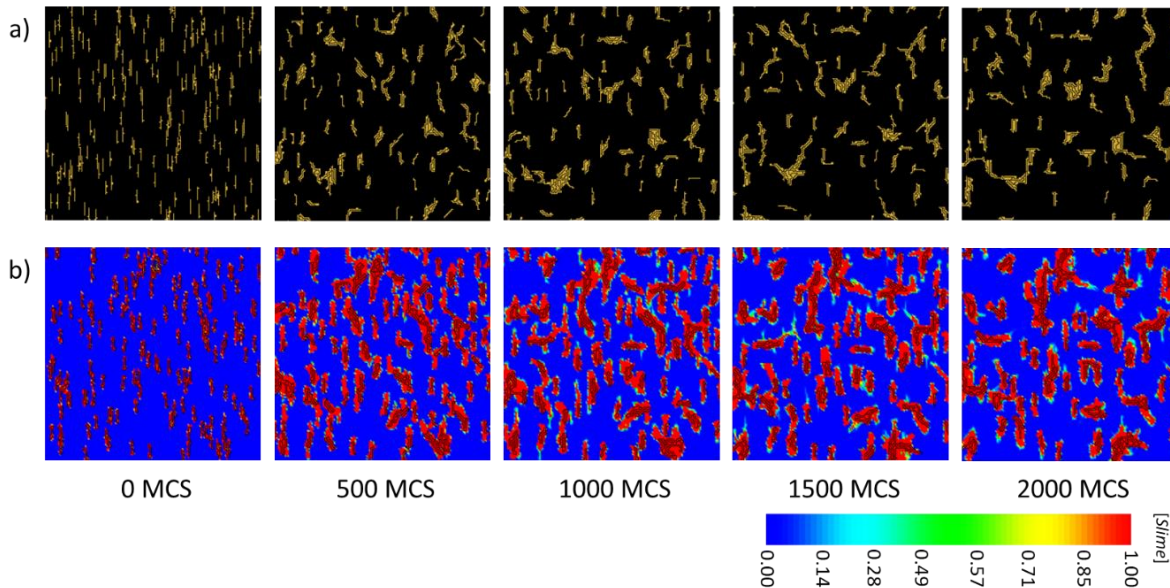


Figura 6. Imágenes obtenidas de las simulaciones del movimiento colectivo de *M. xanthus* en medios homogéneos, mostrando el fenotipo de a) células virtuales y b) *slime* cuyo color denota su concentración. Escala de imagen: 150 x 150.

1. Simulaciones cortas

Para explorar los efectos de un medio estructurado en la agregación, se corrieron simulaciones cortas del modelo de *M. xanthus* en medios con y sin partículas virtuales de diferente tamaño y densidad. En medios homogéneos se observa que al 2,000 MCS, se agrega en promedio el 92% de las células virtuales (Fig. 7a), ya sea asociándose a otra célula o a un conjunto de estas, formando entonces en promedio 130 agregados (Fig. 7b). Para conocer los tamaños máximos que pueden alcanzar estos agregados, se cuantificó y promedió el número de células situadas en los 5 agregados más grandes, en este caso se registra un valor de 17 células virtuales (Fig. 7c).

Por su parte, las simulaciones en medios heterogéneos muestran modificaciones en el comportamiento del movimiento colectivo anteriormente descrito para medios homogéneos (Fig. 7). Siendo que, los medios estructurados exhiben un amplio rango de valores para las tres variables cuantificadas, del cual, el medio homogéneo ocupa valores intermedios (Fig. 7). Estas modificaciones del comportamiento celular difieren en magnitud de acuerdo con el tamaño y densidad de las partículas virtuales, mostrando pautas consistentes con poca variación entre réplicas (Anexo, Fig. 4). En general, se observa que al incrementarse el tamaño y densidad de estas partículas virtuales, se promueve la agregación celular, aumentando tanto la proporción de células que se agregan (Fig. 7a) como el tamaño de los agregados (Fig. 7c), aunque disminuye el número de estos agregados (Fig. 7b). Este patrón se rompe en medios con densidades de partículas muy altas y tamaños pequeños (1/6 y 1/12). En las cuales parece ser que disminuyen considerablemente la proporción de células agregadas y tamaños máximos de agregados, mientras que el número de estos agregados incrementa. En este sentido, se observa un patrón entre las variables cuantificadas, es decir, que el número de agregados virtuales es inverso a la proporción de células virtuales agregadas y tamaño de los agregados. Esto sugiere que, al favorecerse el movimiento colectivo, una gran cantidad de células virtuales se acomodan dentro de un agregado, luego estos agregados se fusionan con otros, incrementando así su tamaño y reduciendo por ende, el número de agregados, tal como ocurre en el proceso de desarrollo de *M. xanthus*.

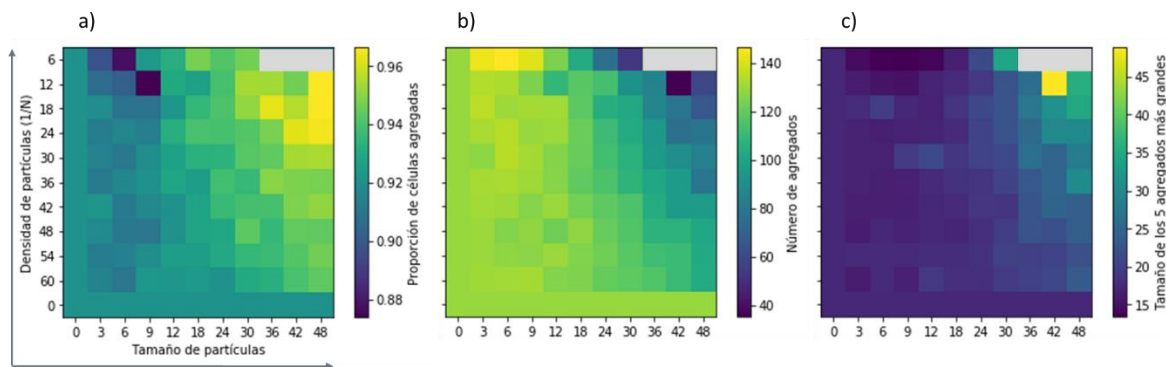


Figura 7. Mapas de calor que muestran para cada condición al 2,000 MCS, la cuantificación de: a) la proporción de células virtuales agregadas; b) el número de agregados; c) el tamaño de los 5 agregados más grandes. Se describe el tamaño y la densidad de partículas virtuales de forma ascendente en los ejes x y y respectivamente. Los cuadros en gris indican que las simulaciones no se efectuaron debido a que el área ocupada por las partículas virtuales era tal que el espacio libre de partículas no era suficiente para añadir las 700 células virtuales de forma aleatoria.

Para analizar las posibles asociaciones de los comportamientos celulares con otras variables, se realizaron regresiones lineales entre las variables cuantificadas ya descritas, y el tamaño, densidad y área ocupadas por las partículas virtuales (Fig. 8; Tabla 2). Las pruebas de normalidad de los datos y residuos se recopilan en la Tabla 3 y Fig. 8 del Anexo, respectivamente. En estas pruebas se evidencia la relación inversa (anteriormente señalada) del número de agregados con la proporción de células agregadas y tamaño de agregados (Fig. 8; Tabla 2). Por otro lado, se presentan correlaciones negativas entre el número de estos agregados y los tres atributos de las partículas virtuales (área ocupada, densidad y tamaño), mientras que el resto son correlaciones positivas (con excepción de la

relación de densidad de partículas y número de agregados, que también es negativa). A pesar de que todas las correlaciones son estadísticamente significativas (Tabla 2), son pocos los modelos de regresión que ayudan a explicar los comportamientos celulares registrados. Tal es el caso de la asociación entre el tamaño de las partículas virtuales, con ya sea, la proporción de células virtuales que se agregan ($R^2 = 0.70$), el número de agregados ($R^2 = 0.64$) o el tamaño de estos ($R^2 = 0.55$); así como el área ocupada por partículas virtuales con el número ($R^2 = 0.73$) y tamaño de agregados ($R^2 = 0.52$). Cabe resaltar que ninguna regresión asociada a la densidad de partículas virtuales parece influir en el comportamiento celular ($R^2 < 0.04$). Sin embargo, en este caso podemos entender al área ocupada por partículas virtuales como el resultado de la interacción del tamaño y densidad de dichas partículas. En este sentido, las correlaciones nos hacen suponer que el espacio disponible en el medio podría ser un factor relevante, es decir que, en medios con partículas virtuales de gran tamaño y en alta densidad, se restringe el espacio donde se pueden distribuir las células virtuales, aumentando entonces la densidad celular local y el alineamiento de estas células, que a su vez facilita la formación de agregados. Mientras que, en medios con partículas virtuales que ocupan poco espacio, se permiten posicionamientos espaciales celulares más separados.

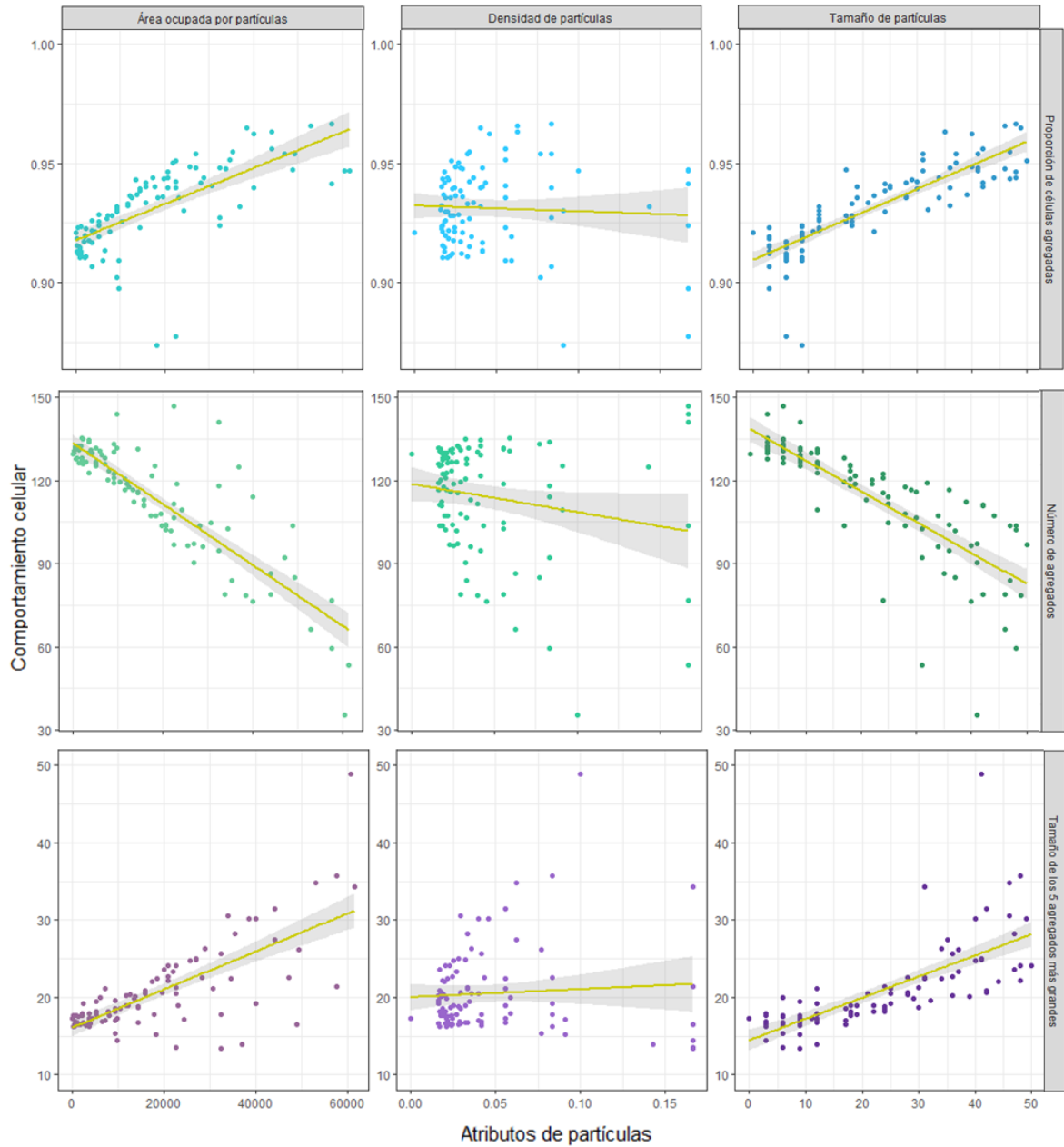


Figura 8. Regresiones lineales de diferentes atributos de las partículas virtuales (de izquierda a derecha en el eje x : área ocupada, densidad y tamaño de las partículas virtuales) con los comportamientos celulares registrados en la agregación (de arriba a abajo en el eje y : proporción de células virtuales agregadas, número de agregados y tamaño de los agregados) al 2,000 MCS.

Tabla 2. Valores de las regresiones lineales que correlacionan los comportamientos celulares registrados con variaciones en las partículas virtuales. Se resaltan los modelos que explican al menos el 50% de la variación.

Comportamiento celular	Atributo de partículas	β_o	m	R^2	P
Proporción de células agregadas	Área	0.917	7.588×10^{-7}	0.487	$< 2 \times 10^{-16}$
	Densidad	0.932	-0.024	0.002	$< 2 \times 10^{-16}$
	Tamaño	0.909	9.925×10^{-4}	0.707	$< 2 \times 10^{-16}$
Número de agregados	Área	133.70	-0.001	0.735	$< 2 \times 10^{-16}$
	Densidad	118.797	-101.834	0.037	$< 2 \times 10^{-16}$
	Tamaño	138.550	-1.115	0.640	$< 2 \times 10^{-16}$
Tamaño de los 5 agregados más grandes	Área	16.12	2.4×10^{-4}	0.526	$< 2 \times 10^{-16}$
	Densidad	20.013	10.268	0.005	$< 2 \times 10^{-16}$
	Tamaño	14.503	0.273	0.551	$< 2 \times 10^{-16}$

En un intento por analizar otras características de los fenotipos virtuales de los agregados y sus cambios a lo largo del tiempo, se escogieron 9 medios heterogéneos que representan la variedad de tamaños y densidades de partículas virtuales que se simularon, cuyas características se muestran en la Tabla 3. Estos medios arrojan diferentes fenotipos de agregación (Fig. 9), por ejemplo, en medios con partículas virtuales a altas densidades, los agregados tienden a ser más compactos. Con excepción de partículas virtuales de tamaños mínimos, las cuales son rodeadas por las células virtuales mediante su movimiento semiflexible, rescatando las formas alargadas del medio homogéneo (Fig. 6). Esta forma alargada también se observa en todas las densidades bajas y tamaños mínimos de partículas virtuales. Por su parte, densidades de partículas medias con tamaños tanto medios como máximos de estas, dan agregados con fenotipos intermedios. Es decir, formas compactas que empiezan a formar ramificaciones hacia los bordes de los agregados, lo cual se asemeja bastante a la apariencia de los *swarmings* (Fig. 2). En este sentido, parece ser que el fenotipo de la forma de los agregados se ve modificado en primera instancia por la densidad de las partículas virtuales del medio, y en segundo término por el tamaño de estas.

Tabla 3. Lista de condiciones elegidas para medios heterogéneos, donde se analizan el fenotipo virtual de las agregaciones. Se adjunta el tamaño y densidad de partículas virtuales y su clasificación de acuerdo con estas propiedades. También se incluyen dos elementos que permiten comparar las distribuciones de los tamaños de estos agregados obtenidos (*Skewness* y *Kurtosis*).

Atributos de partículas virtuales			Clasificación de los atributos		Atributos de distribución del tamaño de agregados	
Tamaño	Densidad	Área ocupada	Tamaño	Densidad	<i>Skewness</i>	<i>Kurtosis</i>
0	0	0	Nulo	Nula	2.26	10.87
3	1/59	225	Mínimo		2.10	9.77
22	1/58	7,744	Medio	Baja	1.91	7.63
47	1/59	19,881	Máximo		3.02	20.30
3	1/30	729	Mínimo		2.13	9.51
21	1/28	15,876	Medio	Media	2.12	8.71
47	1/30	35,344	Máximo		1.98	8.19
6	1/6	22,500	Mínimo		2.07	8.74
24	1/6	57,600	Medio	Alta	1.27	5.22
48	1/12	57,600	Máximo		1.89	7.80

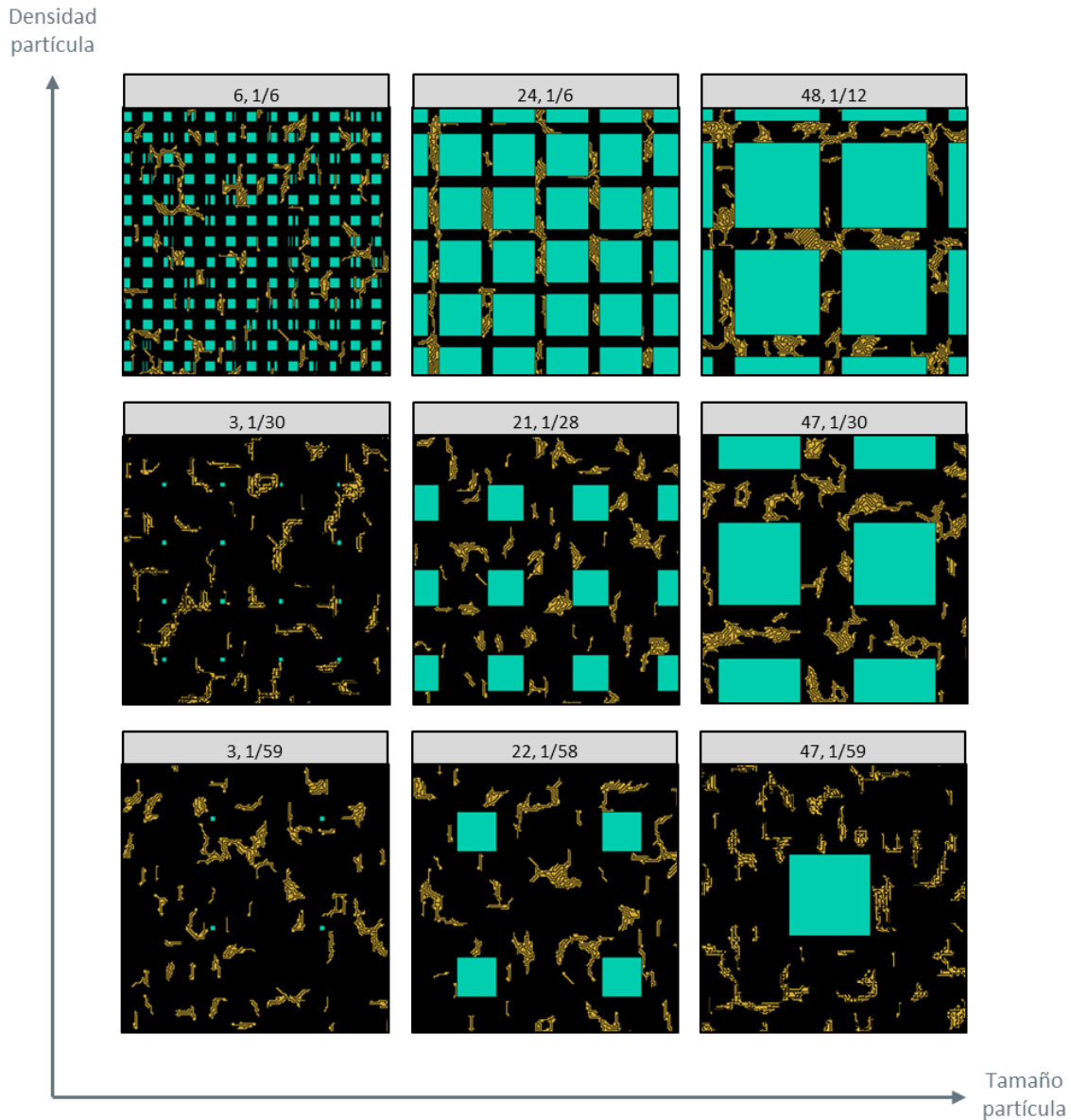


Figura 9. Fenotipos virtuales de la forma de los agregados, obtenidos de medios heterogéneos con partículas virtuales de diferente tamaño (incrementa de izquierda a derecha) y densidad (incrementa de abajo hacia arriba) al 2,000 MCS. Los tamaños y densidades de partículas se denotan respectivamente arriba de las imágenes. Los elementos de amarillo y verde corresponden a células y partículas virtuales respectivamente. Escala de imagen: 150 x 150.

Por otro lado, se examinaron los tamaños que presentan estos agregados, mediante el análisis de su distribución de tamaños (Fig. 10). Esta distribución cambia de acuerdo con las condiciones de la simulación, mostrando numerosos agregados pequeños tanto en medios sin partículas como en medios con partículas virtuales de tamaños mínimos. Estas distribuciones se mueven hacia tamaños de agregados más grandes conforme aumenta el tamaño de las partículas virtuales, mostrando distribuciones menos asimétricas (Tabla 3, *Skewness*). También se observa que el número de agregados disminuye conforme incrementa el tamaño de partículas virtuales o cuando disminuye la densidad de estas, mostrando distribuciones menos puntiagudas (Tabla 3, *Kurtosis*). Esto sugiere que

partículas virtuales de gran tamaño pueden restringir la dirección del movimiento de las células virtuales, facilitando su encuentro y alineamiento con otras células virtuales de forma directa o por medio de *slimes*, promoviendo a su vez la fusión de los agregados. Lo que explica la disminución del número de agregados y el aumento en el tamaño de estos.

Al igual que con las variables cuantificadas (proporción de células agregadas, número de agregados y tamaño de los 5 agregados más grandes; Fig. 7), en estas distribuciones del tamaño de agregados se observan comportamientos peculiares a altas densidades de partículas virtuales (1/6 y 1/12, Fig. 10). Presentándose grandes cambios tanto en la simetría como en la agudeza de las distribuciones (Tabla 3, *Skewness* y *Kurtosis*).

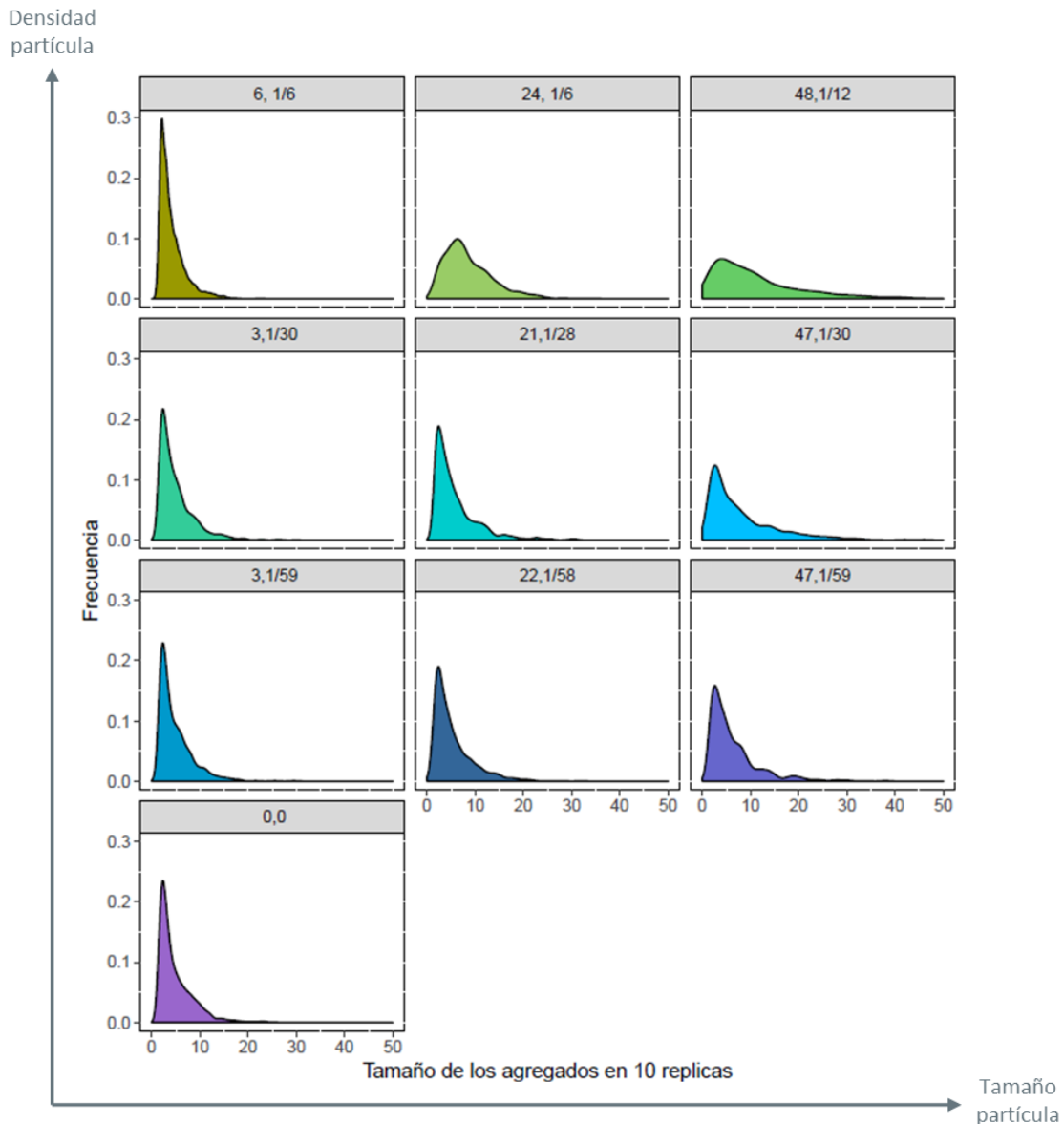


Figura 10. Distribución del tamaño de los agregados de medios con diferente tamaño (incrementa de izquierda a derecha) y densidad (incrementa de abajo hacia arriba) de partículas virtuales, los cuales se denotan arriba de cada distribución. Las gráficas se construyeron con el total de datos de las 10 réplicas al 2,000 MCS.

Por último, se analizó el número y tamaño de estos agregados en el tiempo (Fig. 11-12), es decir a lo largo de la simulación. En el primer caso, se observa un cambio en la forma de las curvas de acuerdo con el tamaño y densidad de partículas virtuales (Fig. 11). En medios homogéneos se presenta una curva parabólica con un corto incremento en el número de agregados del paso 0 a 700, donde comienzan a formarse una gran cantidad de agregados pequeños. Es a partir de este punto donde cambia la curva, con un decrecimiento que continua hasta el 2,000 MCS, el cual se puede asociar a la fusión de los agregados virtuales.

Este comportamiento es bastante similar al que se observa en medios heterogéneos con partículas virtuales de tamaños mínimos y densidades bajas, con ligeras variaciones al inicio de la simulación. Sin embargo, el comportamiento es muy diferente para el resto de las condiciones (Fig. 11). Siendo que, al incrementarse el tamaño de las partículas virtuales, se modifica la forma de la curva, pasando de una forma parabólica, a una semirrecta e incluso de "J" invertida. Esto sugiere que en medios con partículas virtuales de tamaños mínimos ocurre el mismo comportamiento que en medios homogéneos, es decir, la formación de pequeños agregados que luego se fusionan. Mientras que, con tamaños máximos de partículas, la fusión de agregados se ve altamente favorecida desde etapas muy tempranas de la simulación, cuya tasa disminuye con el tiempo. Esta transición en la forma de las curvas se puede observar en los medios con tamaños intermedios de partículas; ya que a baja densidad de estas se presenta una curva similar a la de tamaños pequeños de partículas, a densidad media se observa una recta casi constante, y en alta densidad se muestra una semirrecta de pendiente negativa. Por otra parte, el incremento en la densidad de partículas virtuales se puede asociar a curvas más pronunciadas. Es decir que en los medios con partículas de tamaños mínimos, se alcanzan mayor número de agregados antes de comenzar a disminuir. Mientras que con tamaños de partículas máximos se reduce aún más el número de agregados (Fig. 11).

En general parece ser que el tamaño de partículas virtuales modifica el comportamiento de la agregación celular a lo largo de la simulación, principalmente en como ocurre la fusión de los agregados, limitando la dirección e incrementando el nivel de alineamiento que pueden tener las células virtuales a un nivel local. Por su parte, la densidad celular puede intensificar estos comportamientos, reduciendo o no el espacio celular disponible.

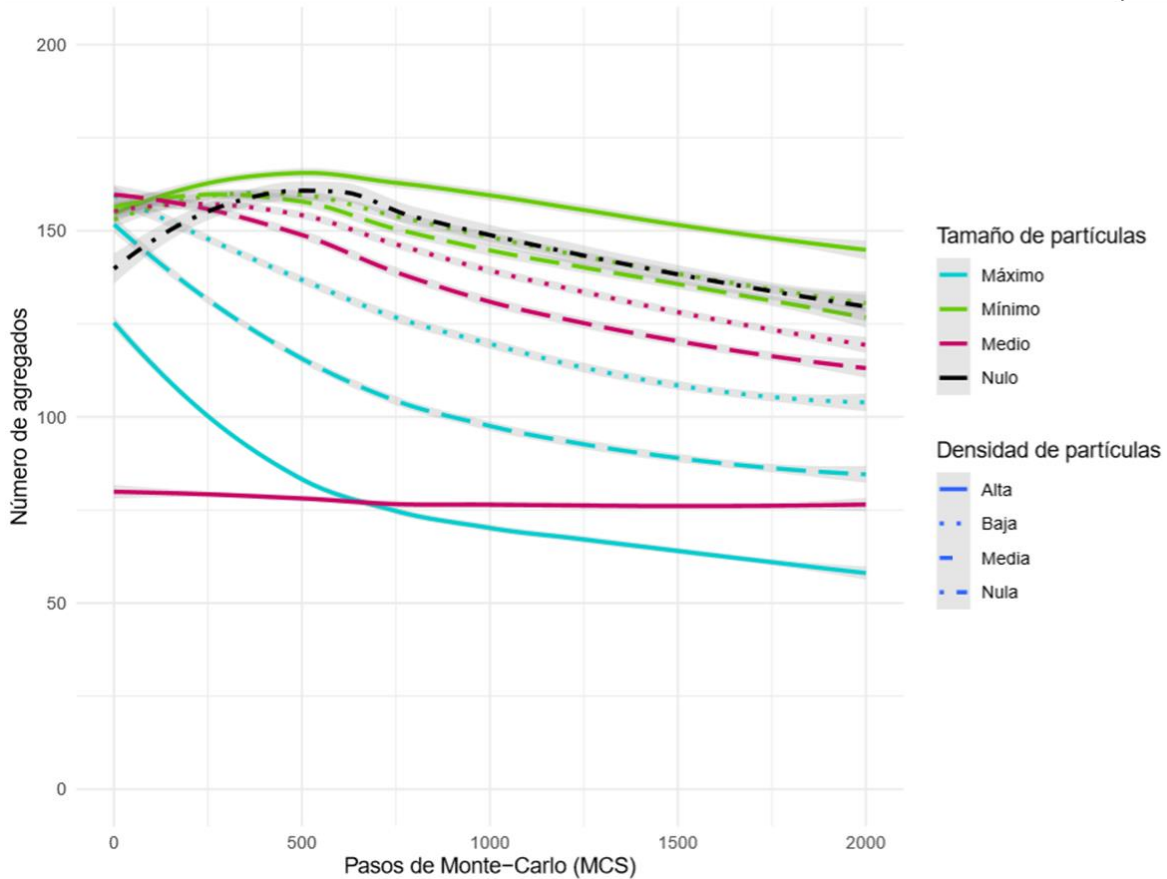


Figura 11. Curvas del cambio del número de agregados a lo largo de la simulación en medios heterogéneos de partículas virtuales con diferente tamaño (mínimo, medio y máximo) y densidad (baja, media y alta) que se denotan con diferente color y tipo de línea respectivamente. El comportamiento del medio homogéneo se denota con tamaño y densidad nulos. Las líneas representan el promedio de las 10 réplicas y el sombreado gris el intervalo de confianza del 95%.

Asimismo, se analizó el tamaño de los 5 agregados más grandes a lo largo de las simulaciones (Fig. 12). Con respecto al medio homogéneo, se observa un incremento casi constante del tamaño de estos agregados desde el inicio hasta el final de la simulación. Dicho comportamiento se conserva en tamaños mínimos de partículas virtuales, con excepción del medio de alta densidad de partículas, que muestra tamaños de agregados menores. Todas las curvas presentan un comportamiento creciente (con excepción de aquella para partículas virtuales de tamaño medio y densidad alta). Al aumentar el tamaño y densidad de partículas virtuales, también se incrementa el tamaño de los agregados. Siendo mayor el incremento asociado al tamaño de las partículas virtuales, lo cual refuerza la idea de que se está presentando una mayor fusión de agregados en medios con partículas de gran tamaño.

Nuevamente se resalta la presencia de comportamientos particulares a altas densidades de partículas virtuales. En medios con alta densidad de partículas pequeñas se observa un menor crecimiento del tamaño de los agregados (Fig. 12 y 7). Por el contrario, en medios con alta densidad de partículas grandes, el crecimiento de agregados es mucho más

pronunciado. Respecto al tamaño medio de partículas virtuales en alta densidad, se muestra más bien un decrecimiento del tamaño de los agregados.

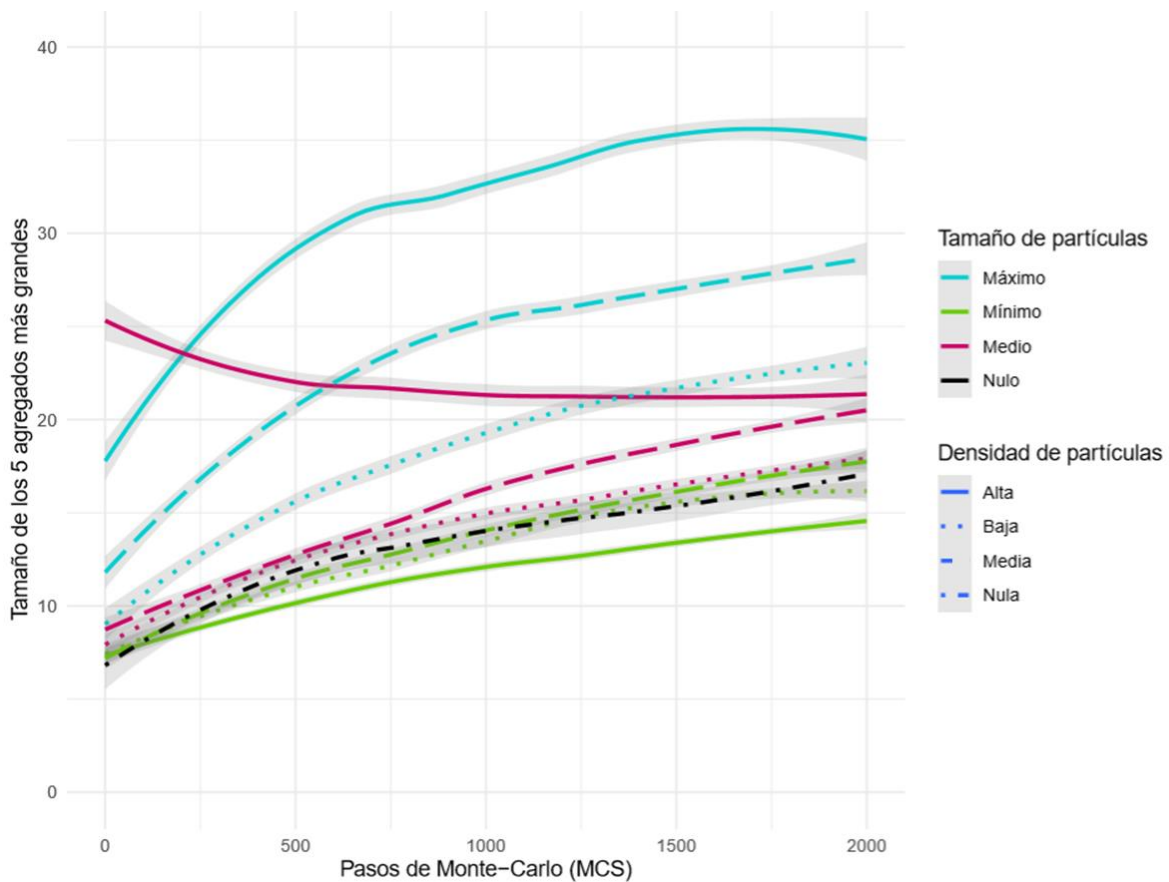


Figura 12. Curvas del cambio del tamaño promedio de los 5 agregados más grandes, a lo largo de la simulación en medios heterogéneos de partículas virtuales con diferente tamaño (mínimo, medio y máximo) y densidad (baja, media y alta) que se denotan con diferente color y tipo de línea respectivamente. El comportamiento del medio homogéneo se denota con tamaño y densidad nulos. Las líneas representan el promedio de las 10 réplicas y el sombreado gris el intervalo de confianza del 95%.

En síntesis, en las simulaciones cortas se observó que los medios estructurados dan lugar a una modificación del fenotipo de los agregados virtuales, tanto de la forma de los agregados como de la dinámica del movimiento colectivo celular. Sugiriendo en conjunto que el tamaño, la densidad y el área que ocupan las partículas virtuales alteran en diferente medida y forma estos rasgos celulares. Esto, posiblemente ocurra mediante la restricción en la dirección de las células virtuales y reducción del espacio celular disponible, que en conjunto favorecen o no el encuentro de células aisladas y la fusión de agregados.

2. Simulaciones extensas

Para analizar con mayor detalle la modificación de los comportamientos de agregación en medios heterogéneos, se realizaron simulaciones más extensas de 4 condiciones que mostraron dinámicas de movimiento contrastantes dentro de las simulaciones cortas (véase en el método). Al igual que en las simulaciones cortas, se registró el cambio de la proporción de células que se agregan, el número de agregados, y el tamaño promedio de los 5 agregados más grandes.

Nuevamente se observó que el aumento en el tamaño de las partículas virtuales concuerda con una mayor agregación, dada por una mayor proporción de células agregadas (Fig. 13), menor número de agregados (Fig. 14) y mayor tamaño de agregados (Fig. 15). Asimismo, se reafirma la idea de que a densidades de partículas altas se exacerban los comportamientos. Por ejemplo, en la condición con partículas virtuales de tamaño 41 y densidad 1/10, se intensifica la fusión de agregados, ya que se presentan relativamente pocos de estos (Fig. 14). Además, los agregados cuentan con un gran número de células virtuales, incluso 10 veces mayor que en el resto de las condiciones (Fig. 15). Pero, a la vez estos agregados parecen ser poco estables, debido a que alrededor del 3,000 MCS se comienzan a disgregar en cierta medida (Fig. 13-15). Además, estos agregados presentan formas sumamente compactas más no alargadas (Fig. 16). La condición de partículas virtuales de tamaño 46 y densidad 1/6, cuyos rasgos de partículas son muy cercanos al caso anterior, muestran además similitudes en los valores de células agregadas (Fig. 13) y número de agregados (más bien al paso 10,000, ya que en este caso la fusión de agregados es mucho más lenta; Fig. 14). Sin embargo, los tamaños máximos (Fig. 15) y la forma de estos agregados (Fig. 16) son muy contrastantes, presentándose en este caso agregados considerablemente más pequeños con formas ramificadas y alargadas.

Tomando en cuenta que las células virtuales tienen una dimensión de 1 x 12, observamos una concordancia entre el tamaño de las células virtuales, la densidad de las partículas virtuales y el comportamiento de agregación. Lo cual indica que en el modelo, la intensidad del efecto de la densidad de partículas está determinada por la relación con el tamaño mismo de las células virtuales.

Por otro lado, la condición con partículas virtuales de tamaño pequeño (9) y en baja densidad (1/61), muestra tanto para las tres variables cuantificadas (Fig. 13-15, línea azul turquesa) como para la forma de los agregados (Fig. 16), un comportamiento casi idéntico al del medio sin partículas virtuales (Fig. 13-15, línea roja; Fig. 16, condición 0, 0). Esto sugiere también que la modificación del comportamiento ocurre a un nivel local relativo al tamaño de las células virtuales. En este caso, cuando los espacios por donde se desplazan las células virtuales son suficiente amplios (dependiendo de la densidad y el tamaño de las partículas virtuales), parece como si no hubiese partículas en el medio virtual. Sin embargo, un comportamiento similar también se presenta en una condición de alta densidad de partículas virtuales (1/6; Fig. 13-15, línea verde). Aunque, muestra valores de agregación más bajos (Fig. 13-15) y agregados menos interconectados (Fig. 16). Esto sugiere que las células son capaces de rodear estas partículas virtuales de pequeño tamaño (6) mediante su forma semiflexible, aunque no es suficiente para contrarrestar por completo un efecto de esparcimiento.

En general se observó que, en estas simulaciones extensas, los agregados mantienen sus formas desde el 2000 MCS hasta el 10000 MCS, y estos solo crecen de tamaño mediante

la fusión con otros agregados (Fig. 16). Finalmente se reitera que los comportamientos observados son el resultado de la interacción entre el tamaño y la densidad de las partículas virtuales.

Debido a que los comportamientos observados en las simulaciones extensas (Fig. 13-16) son bastante similares a los obtenidos en las cortas (Fig. 7, 9-12), podemos reconocer que estas últimas son una buena representación del modelo y por tanto, una adecuada y valiosa herramienta de estudio.

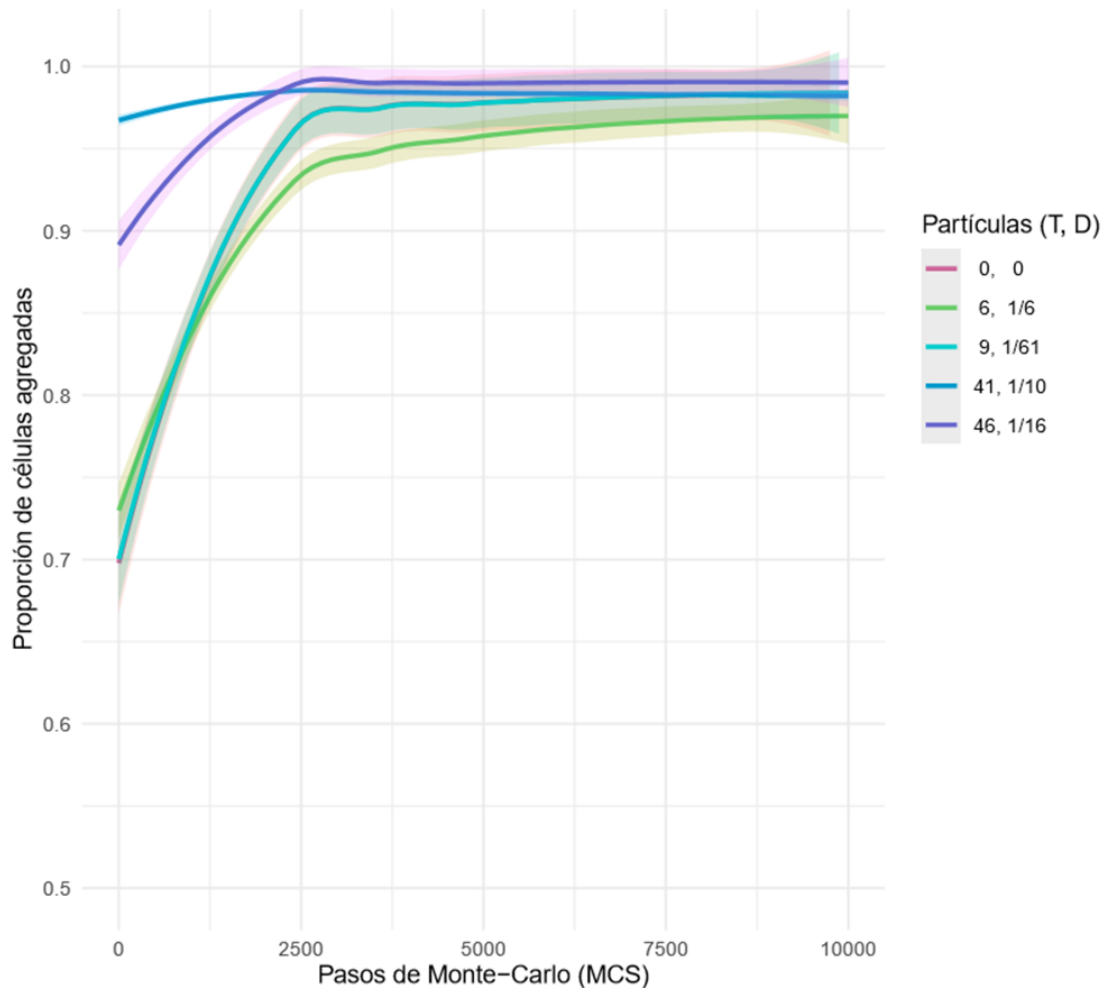


Figura 13. Curvas del cambio de la proporción de células virtuales agregadas, a lo largo de simulaciones extensas en medios heterogéneos con partículas virtuales de diferente tamaño (T) y densidad (D), las cuales se denotan en dicho orden (0, 0 corresponde al medio homogéneo). Las líneas representan el promedio de las réplicas y el sombreado en color el intervalo de confianza del 95%.

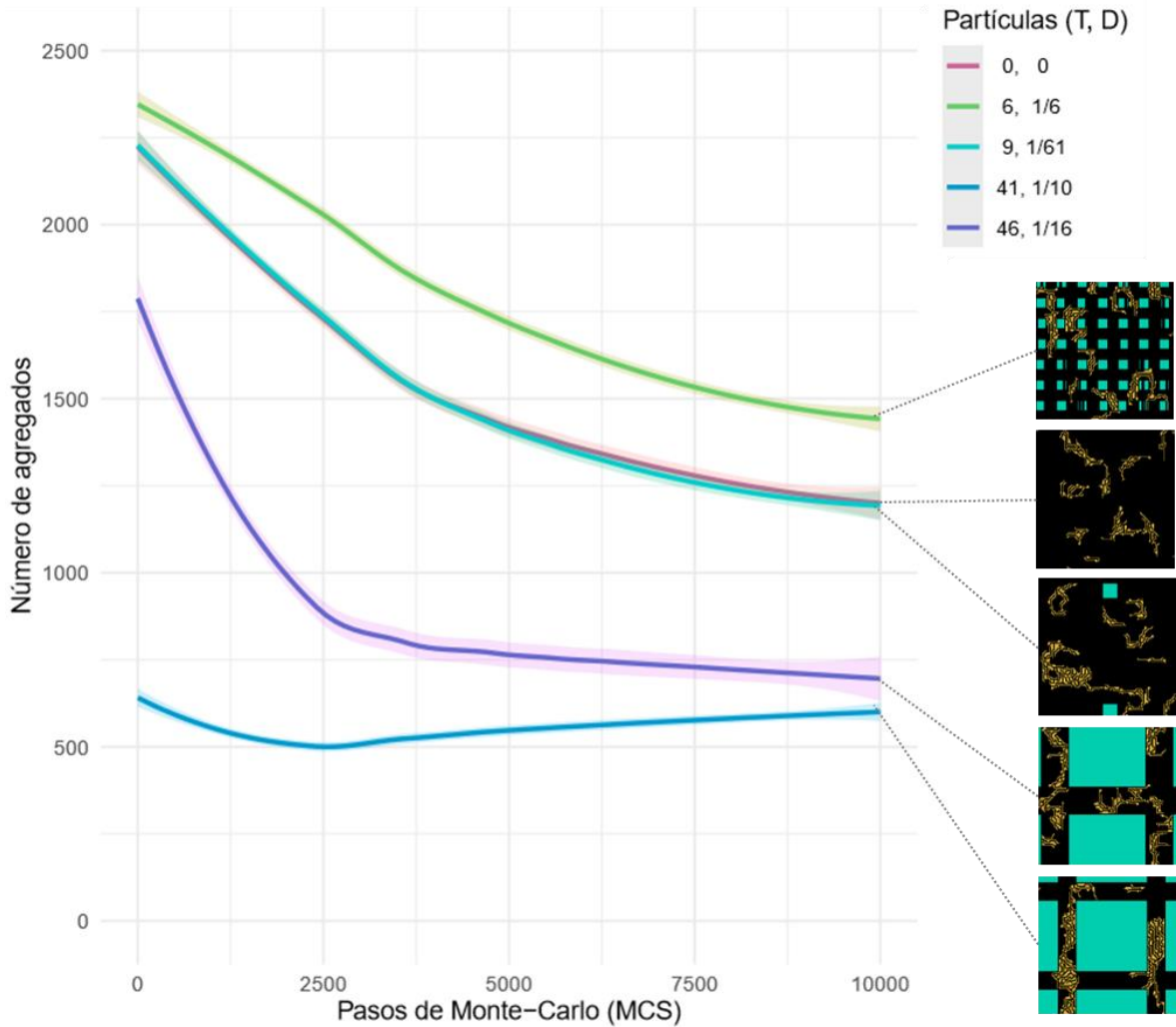


Figura 14. Curvas del cambio del número de agregados, a lo largo de simulaciones extensas en medios heterogéneos con partículas virtuales de diferente tamaño (T) y densidad (D), las cuales se denotan en dicho orden (0, 0 corresponde al medio homogéneo). Las líneas representan el promedio de las réplicas y el sombreado en color el intervalo de confianza del 95%. Las imágenes a la derecha (escala: 80 x 80) corresponden agregados de cada condición al 10,000 MCS; los elementos de amarillo y verde corresponden a células y partículas virtuales respectivamente.

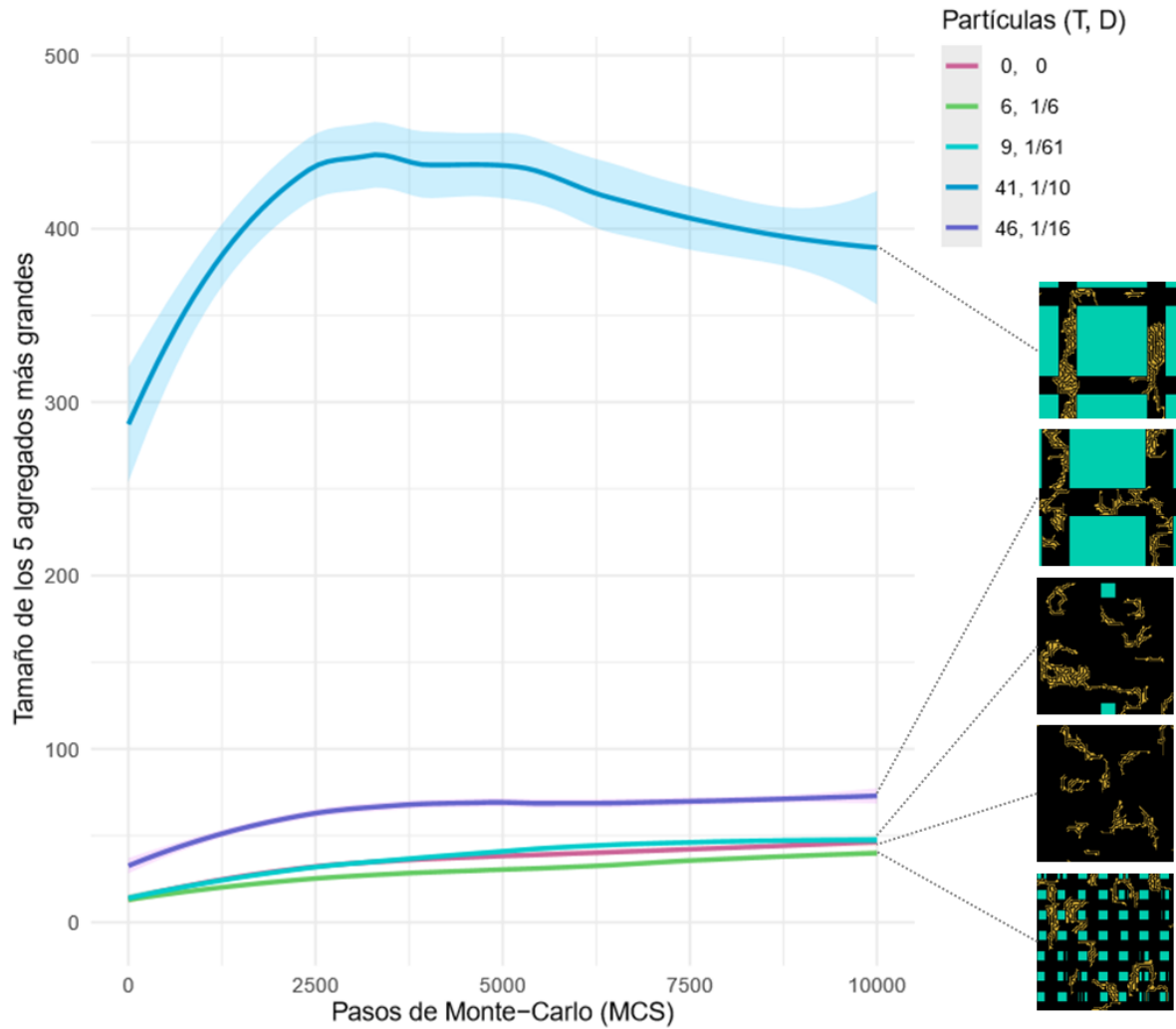


Figura 15. Curvas del cambio del tamaño promedio de los 5 agregados más grandes, a lo largo de simulaciones extensas en medios heterogéneos con partículas virtuales de diferente tamaño (T) y densidad (D), las cuales se denotan en dicho orden (0, 0 corresponde al medio homogéneo). Las líneas representan el promedio de las réplicas y el sombreado en color el intervalo de confianza del 95%. Las imágenes a la derecha (escala: 80 x 80) corresponden agregados de cada condición al 10,000 MCS; los elementos de amarillo y verde corresponden a células y partículas virtuales respectivamente.

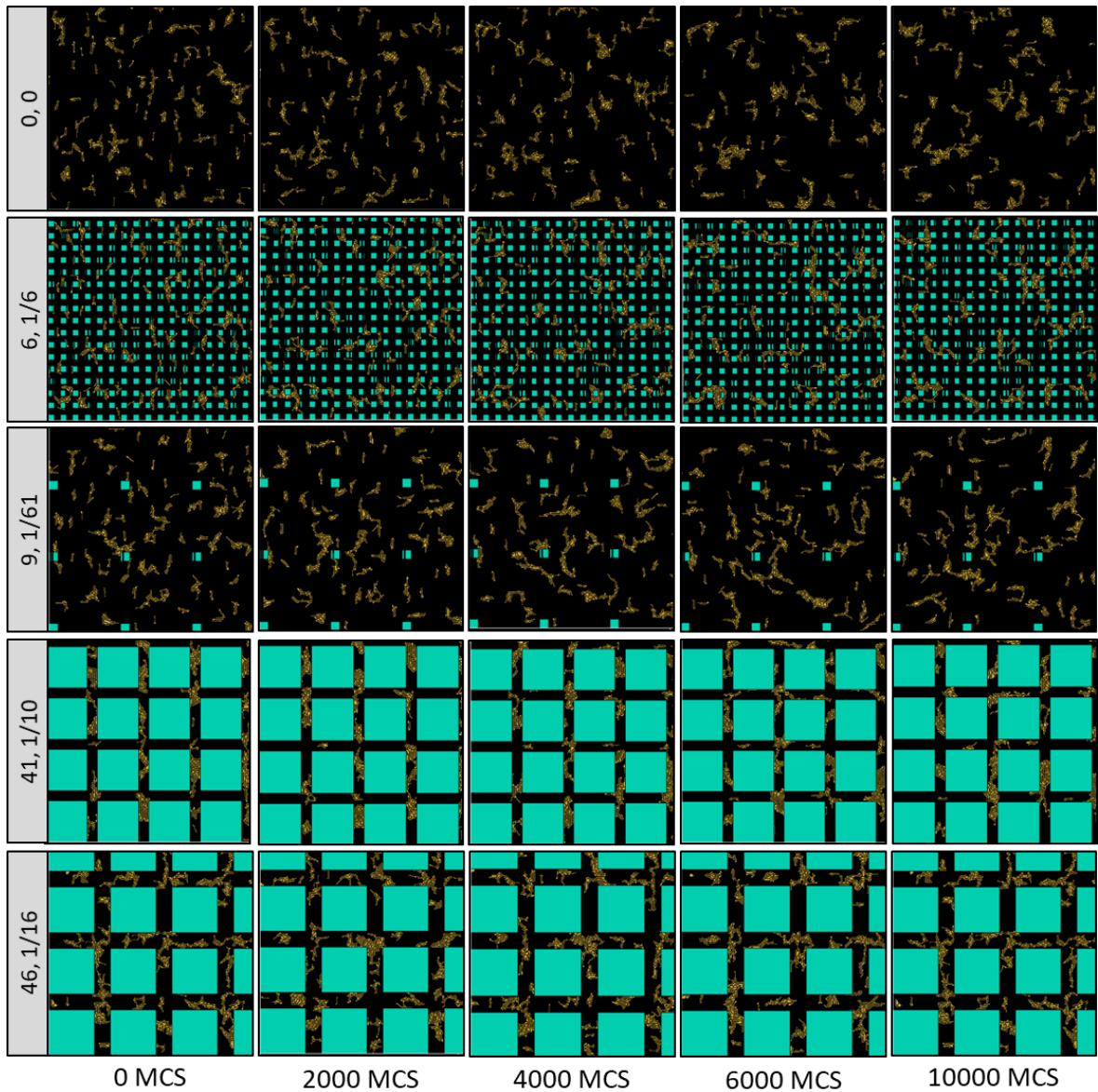


Figura 16. Cambio de la forma de los agregados a lo largo de simulaciones extensas para medios heterogéneos con partículas virtuales de diferente tamaño y densidad, los cuales se denotan respectivamente a la izquierda de las imágenes. Los elementos de amarillo y verde corresponden a células y partículas virtuales respectivamente. Escala de imagen: 200 x 200.

3. Robustez del modelo

Para conocer los alcances y limitaciones del modelo, se modificaron ciertas características de este y se analizó la respuesta a dichos cambios. En medios homogéneos se probaron diferentes valores en determinados parámetros (Fig. 17-19). La disminución de la adhesión celular (en este caso, valores más altos del parámetro J_{cc} representan una menor adhesión célula-célula) altera la agregación celular, incrementando el número de agregados (Fig. 17) y por tanto, disminuyendo el tamaño de estos (Fig. 18), de forma lineal en ambos casos. Esto sugiere que la adhesión celular es un componente relevante que facilita de forma directa la multicelularidad, como ya se ha mencionado. En contraste, el parámetro de curvatura (λ_c) no muestra cambios relevantes en el número o tamaño de los agregados. Por su parte, el valor de atracción por *slime* (λ_s) muestra un comportamiento particular, siendo que solo se afecta la agregación celular en la ausencia de este ($\lambda_s = 0$). Pero, una vez presente el *slime* ($\lambda_s > 0$), no se ve alterado el número o tamaño de agregados, al aumentar o disminuir el valor del parámetro. Lo anterior sugiere que para el modelo no es relevante la intensidad de atracción de las células virtuales, sino únicamente la presencia de este comportamiento. En este sentido el valor de decaimiento de *slime* (k) señala que a medida que se incrementa la tasa de decaimiento de estos caminos, se ve disminuido el tamaño de los agregados e incrementado el número de estos, siendo que *slimes* de mayor longitud favorecen en mayor medida la atracción de células virtuales. Asimismo, esto apoya la hipótesis de que, en el modelo los *slimes* son el factor que determina en mayor medida el arreglo de los agregados.

Por último, se estudió la densidad celular, la cual muestra comportamientos característicos, debido a que a medida que incrementa la densidad celular, aumenta de forma exponencial el número de agregados (Fig. 17). Lo anterior no es de sorprender, ya que a mayor número de células virtuales se pueden formar más agregados. Sin embargo, el número de estos agregados comienza a decaer a partir de las 900 células virtuales (recordando que el tamaño de la cuadrícula es de 300 x 300). Mientras que el tamaño de agregados (Fig. 18) presenta un crecimiento lineal a medida que aumenta la densidad celular, y es a partir de la densidad de 900 células virtuales, donde se observa un crecimiento exponencial que continua incluso en el valor máximo probado, es decir, 1,500 células virtuales. Esto sugiere que a cierta densidad celular, las células virtuales restringen la dirección y el espacio de las demás células. Favoreciendo así la formación y fusión de agregados, como ocurre con ciertos tamaños y densidad de partículas virtuales (Fig. 7, 9, 11-12), reafirmando la idea de que estos elementos pueden favorecer la agregación celular.

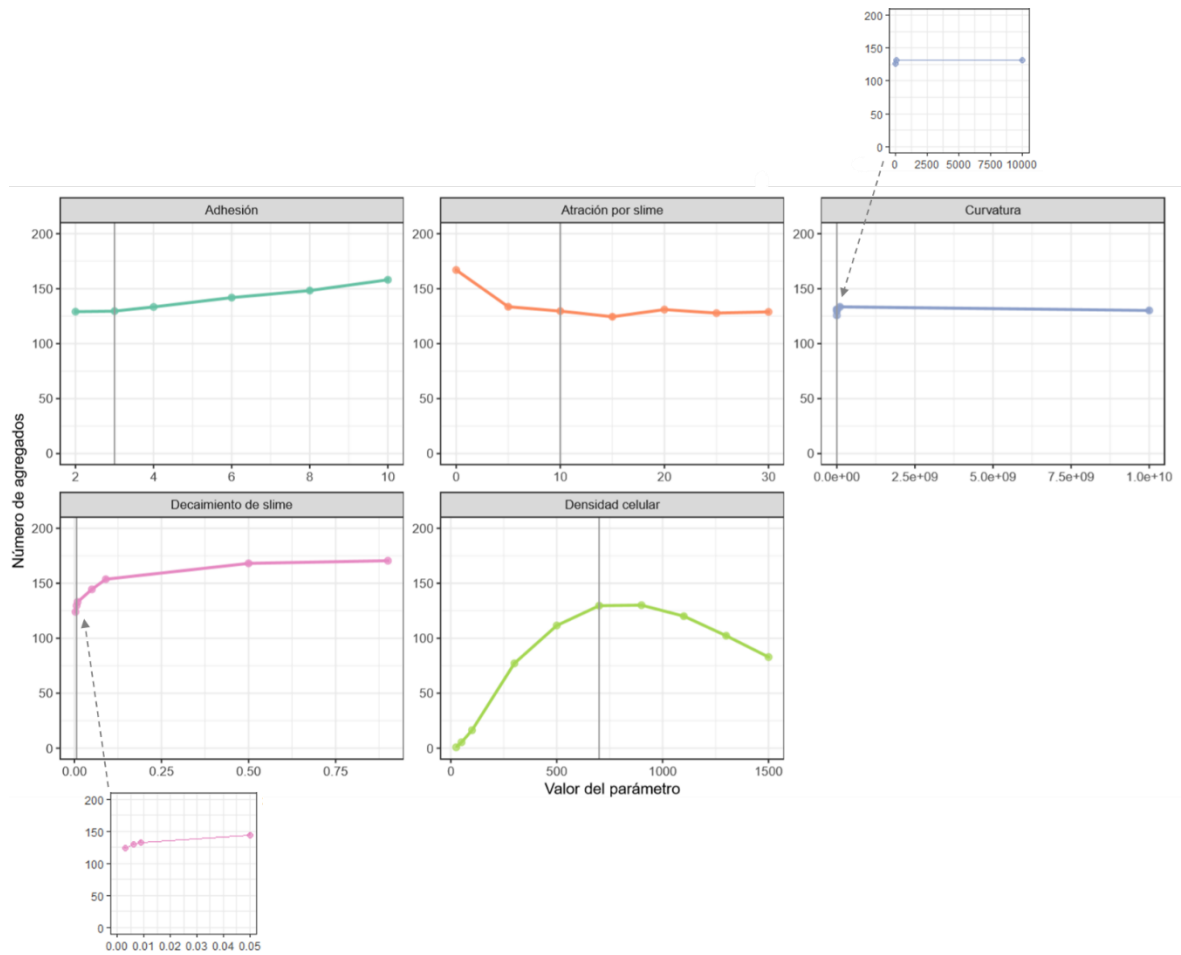


Figura 17. Pruebas de robustez en medios homogéneos, donde se grafica el número de agregados al 2,000 MCS para diferentes valores de parámetros de adhesión, atracción por *slime*, curvatura, decaimiento de *slime* y densidad celular. Las líneas verticales en gris especifican el valor empleado en las simulaciones.

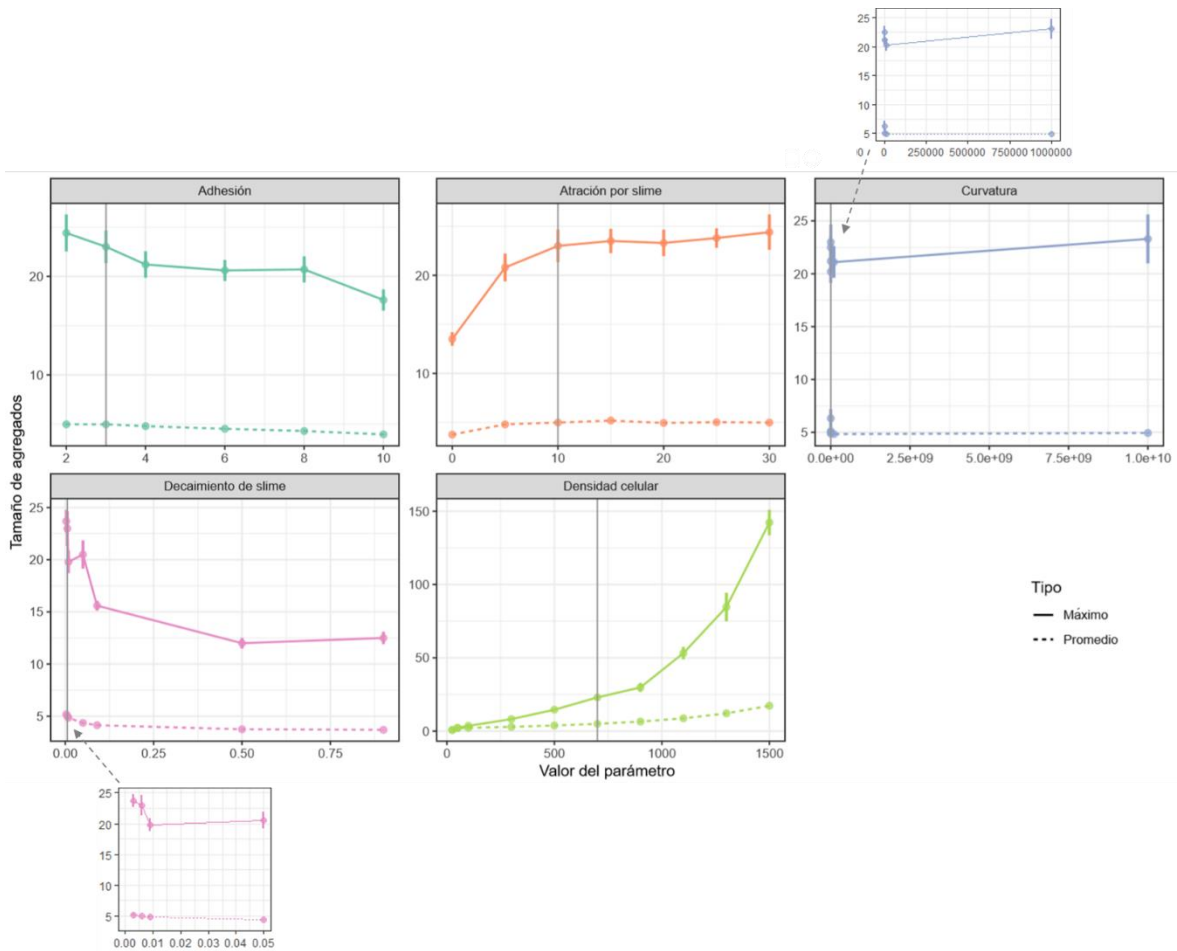


Figura 18. Pruebas de robustez en medios homogéneos, donde se grafica el tamaño máximo (líneas continuas) y promedio (líneas punteadas) de agregados al 2,000 MCS para diferentes valores de parámetros de adhesión, atracción por *slime*, curvatura, decaimiento de *slime* y densidad celular. Las líneas verticales en gris especifican el valor empleado en las simulaciones.

Asimismo, se analizó el fenotipo virtual de la forma los agregados (Fig.19) para los valores mínimos y máximos de parámetros escogidos. Al comparar estos fenotipos con el obtenido en el medio homogéneo (Fig. 6a, 2,000 MCS), resalta que la falta de adhesión también genera agregados ramificados y alargados, pero con menor número de células virtuales. Esta forma se ve ligeramente modificada ante la ausencia de la energía de curvatura, observándose agregados compactos y globosos. Por el contrario, en ausencia de *slimes*, ya sea por una alta tasa de decaimiento o al eliminar la condición de atracción, la forma es severamente modificada. Donde en lugar de estructuras conectadas, aparece una monocapa de células contiguas, lo cual reafirman la hipótesis de que estos caminos son la principal causa de la morfología de los agregados, en el modelo. Asimismo, a bajas densidades celulares no es posible la formación de agregados, pero a altas densidades celulares se observan formas aún más interconectadas que son bastante similares a los *traffic jams* (Fig. 2).

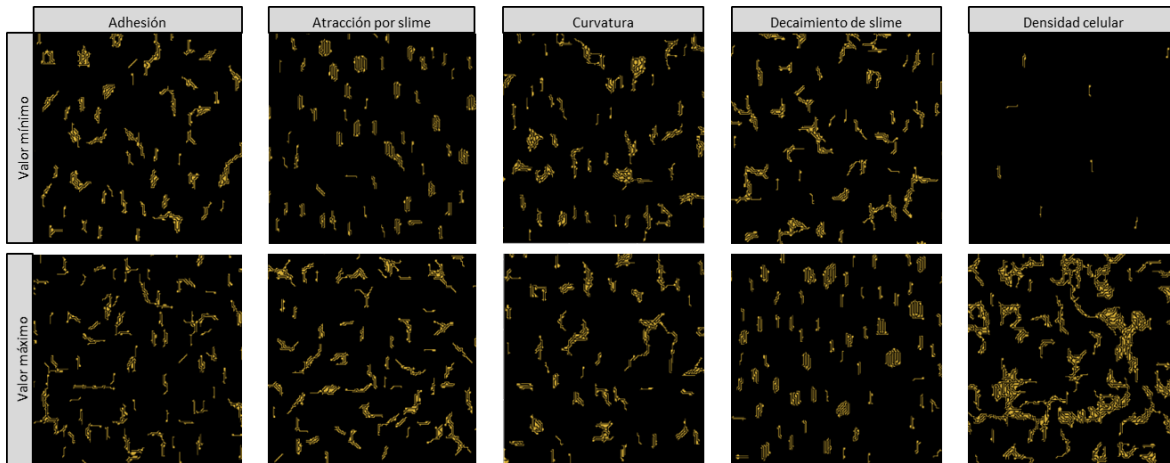


Figura 19. Fenotipo de la forma de los agregados en medios homogéneos obtenidos al 2,000 MCS para valores mínimos y máximos de parámetros elegidos de adhesión, atracción por *slime*, curvatura, decaimiento de *slime* y densidad celular. Los elementos de amarillo corresponden a células virtuales. Escala de imagen: 150 x 150.

Continuando con las pruebas de robustez del modelo, en medios heterogéneos con diferentes condiciones se analizó tanto la forma celular (compactas o alargadas; Fig. 20-21) como el ordenamiento de las partículas virtuales (añadidas ordenada o aleatoriamente; Tabla 4; Fig. 22), mediante la cuantificación de las variables de agregación ya descritas, y el fenotipo de la forma. En el primer caso, se observaron patrones similares de las variables cuantificadas entre células virtuales compactas y elongadas, ante cambios en el tamaño y densidad de las partículas virtuales (Fig. 20). Sin embargo, los valores difieren entre sí para la mayoría de los casos, siendo que en simulaciones con células virtuales compactas se presenta mayor proporción de células agregadas y número de agregados, pero menor tamaño de agregados. Esto sugiere que una forma compacta facilita el movimiento de las células virtuales hacia otras células. Mientras que formas elongadas facilitan tanto la agregación de células virtuales como la fusión de agregados (menor número de agregados y mayores tallas de estos), posiblemente por la capacidad de secretar rastros de *slime* de mayor longitud.

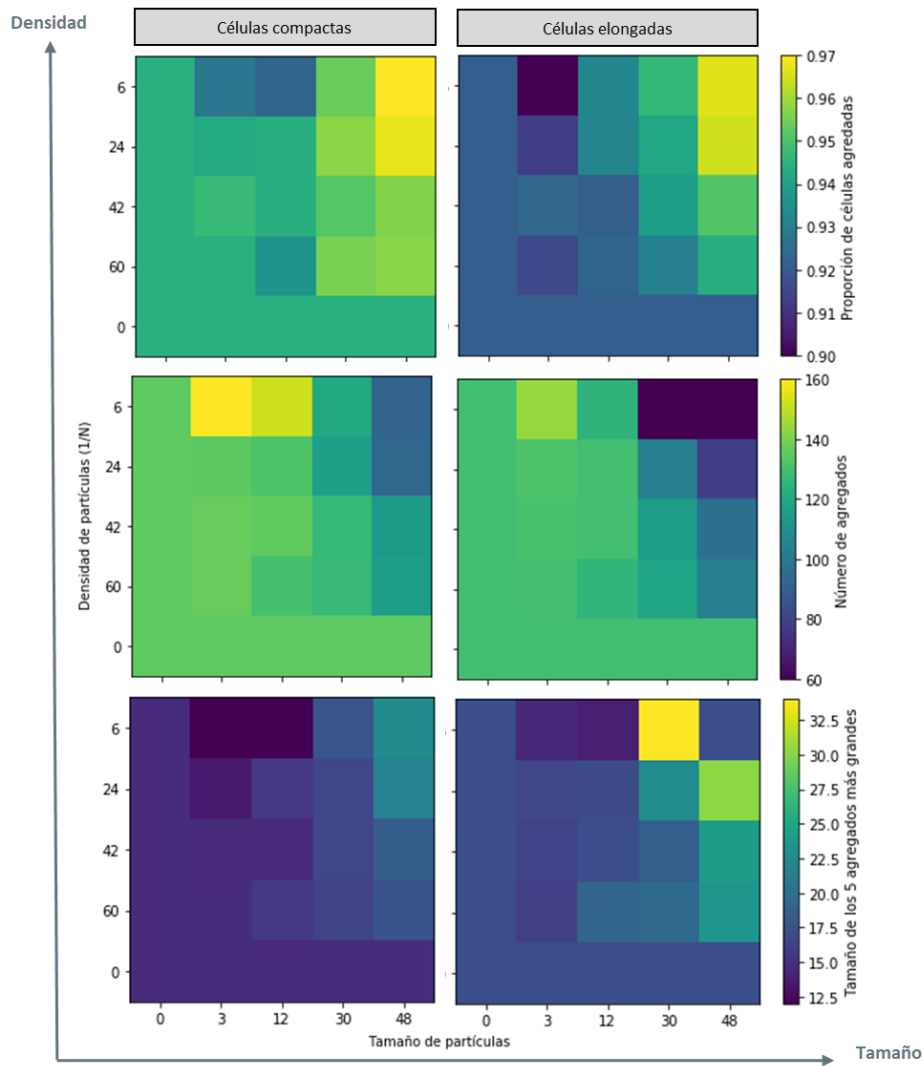


Figura 20. Mapas de calor de medios heterogéneos que muestran para células virtuales compactas y alargadas, la cuantificación de la proporción de células virtuales agregadas el número de agregados y el tamaño de los 5 agregados más grandes, esto para cada condición al 2,000 MCS. Se describe el tamaño y la densidad de partículas virtuales de forma ascendente en los ejes x y y respectivamente. En el medio con partículas virtuales de tamaño 48 y densidad 1/6, la densidad real es 1/12, debido a que no es posible efectuar simulaciones con la densidad menor.

Asimismo, se muestran claras diferencias entre la forma de los agregados con células virtuales compactas y alargadas (Fig. 21). Ya que, en el primer caso los agregados muestran formas globosas que no parecen variar ante diferentes tamaños y densidades de partículas virtuales. Contrario a las células virtuales alargadas, cuyos agregados presentan formas ramificadas y alargadas que varían entre las diferentes condiciones (Fig. 9 y 21). Siendo entonces, que para el modelo la forma celular parece ser un aspecto sumamente relevante en la formación de los agregados, tanto por promover la agregación celular como la fusión de agregados.

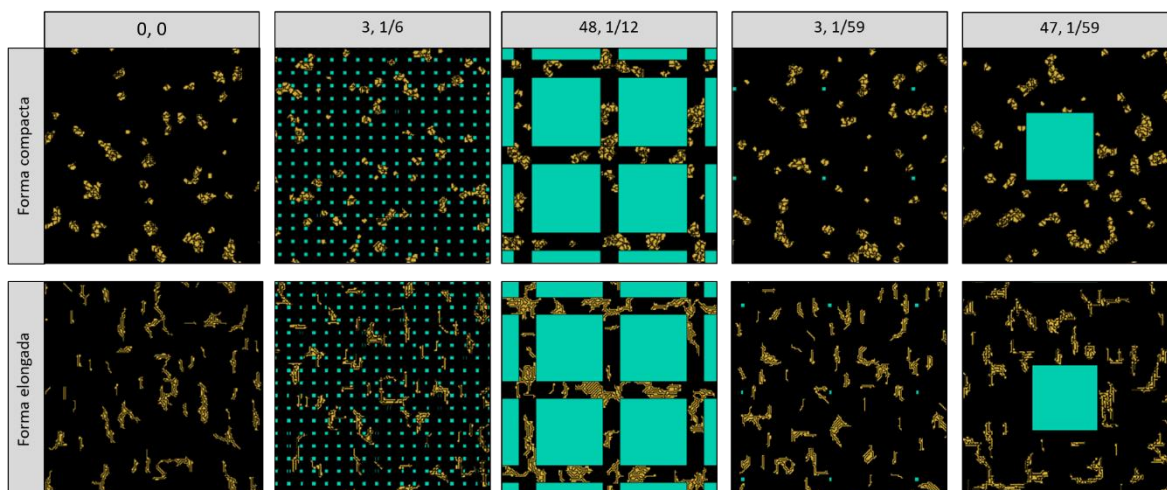


Figura 21. Fenotipo de la forma de los agregados en medios heterogéneos obtenidos al 2,000 MCS, formados con células virtuales compactas (arriba) y elongadas (abajo) en diferentes condiciones. Los tamaños y densidades de partícula se denotan respectivamente arriba de las imágenes. Los elementos de amarillo y verde corresponden a células y partículas virtuales respectivamente. Escala de imagen: 150 x 150.

Finalmente se analizó la sensibilidad del modelo al ordenamiento de las partículas virtuales, mostrando entonces diferencias únicamente en la proporción de células virtuales que se agregan, siendo menor en medios con partículas virtuales añadidas aleatoriamente (Tabla 4). El número y tamaño de los agregados es similar para medios con partículas ordenadas o añadidas aleatoriamente. Incluso, se mantiene la forma de los agregados para las dos condiciones exploradas (Fig. 22).

Tabla 4. Valores de agregación obtenidos al 2,000 MCS de medios heterogéneos con partículas virtuales dispuestas en forma ordenada o aleatoria. El tamaño y densidad de partículas virtuales se denotan respectivamente. Se adjunta el error estándar (\pm), así como el valor de probabilidad de la prueba de rangos Wilcoxon para ambos arreglos.

Partículas virtuales	Disposición de las partículas virtuales	Proporción de células agregadas	Número de agregados	Tamaño de los 5 agregados más grandes
24, 1/49	Ordenada	0.925 \pm 0.002	121.0 \pm 1.78	18.24 \pm 1.30
	Aleatoria	0.918 \pm 0.002	118.8 \pm 2.22	19.54 \pm 0.88
	Wilcoxon P =	0.022	0.518	0.115
47, 1/59	Ordenada	0.943 \pm 0.001	103.7 \pm 2.15	23.56 \pm 2.54
	Aleatoria	0.926 \pm 0.003	103.6 \pm 2.19	21.92 \pm 0.94
	Wilcoxon P =	0.001	0.939	0.7579

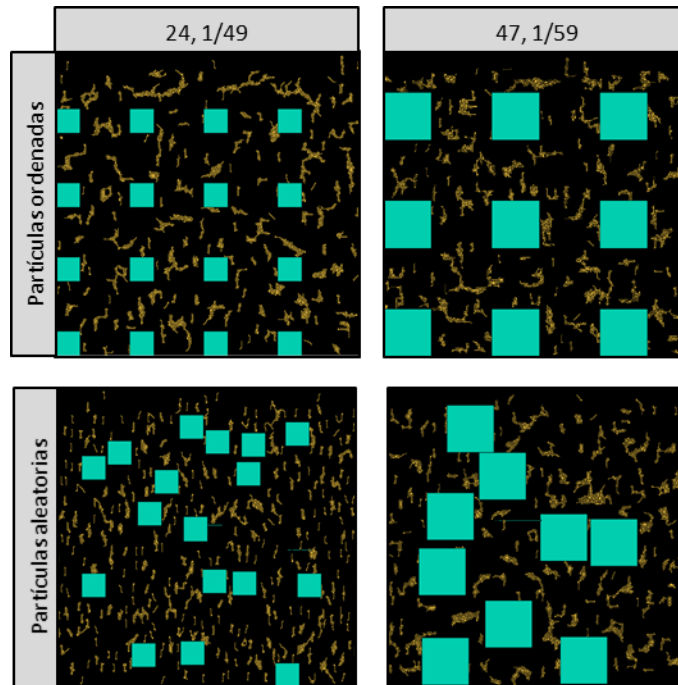


Figura 22. Fenotipo de la forma de los agregados obtenidos al 2,000 MCS en medios con partículas virtuales de diferente tamaño y densidad (izquierda o derecha), dispuestas en forma ordenada (arriba) o aleatoria (abajo). Los tamaños y densidades de partícula se denotan respectivamente arriba de las imágenes. Los elementos de amarillo y verde corresponden a células y partículas virtuales respectivamente. Escala de imagen: 300 x 300.

Por lo descrito anteriormente, se percibe que el modelo es poco sensible a las características de curvatura celular (agregados globosos), atracción por *slime* (se modifica el fenotipo solo en su ausencia) y ordenamiento de partículas virtuales (partículas aleatorias se asocian a una menor proporción de células agregadas). Sin embargo, se distinguen cambios mayores en el fenotipo virtual al alterar la adhesión celular, decaimiento de *slime* y la forma celular. Siendo la densidad celular, el elemento de mayor sensibilidad ya que modifica en gran medida tanto el comportamiento de agregación como la forma de los agregados resultantes (Fig. 17-19).

Discusión

El modelo computacional es una primera aproximación al estudio de la dinámica celular de agregación en etapas tempranas del desarrollo de *M. xanthus*, dentro de medios heterogéneos. En una primera instancia, el modelo logra reproducir considerablemente bien los comportamientos y fenotipos de la mixobacteria (Fig. 2 y 6) reportados para medios estándar. Como es, la capacidad de formar agregados alargados y ramificados (similares a *traffic jams*) que pueden fusionarse. Por otro lado, percibimos que la dinámica de agregación es sensible al decaimiento de *slime*, así como a la adhesión, forma y densidad celular (Fig. 17-21). Esto es de esperarse ya que, por ejemplo, el decaimiento de *slime* dispone de la longitud y el tiempo de establecimiento de estos caminos, y por tanto de su capacidad a ser seguidos por células. A mayor tasa de decaimiento, los *slimes* son más cortos, menos persistentes y atraen menos células. En el modelo, se intentó integrar una tasa de decaimiento que representara la relación del tamaño de las células con los *slimes* (Yu y Kaiser, 2007). Por su parte, la adhesión celular es un componente que sostiene la multicelularidad (Furusawa y Kaneko, 2002; Knoll, 2011; Mora Van Cauwelaert *et al.*, 2015), que al ser disminuida o eliminada, afecta la estabilidad de los agregados (Starruß *et al.*, 2007) y en consecuencia sus arreglos y tamaños.

Específicamente en *M. xanthus*, se ha sugerido que es necesaria una forma elongada y una alta densidad celular, para que se lleve a cabo el desarrollo. Se ha propuesto que la forma elongada puede influir en las interacciones célula-célula (Sozinova *et al.*, 2005; Starruß *et al.*, 2007), facilitando la transmisión de la señal C y el alineamiento de las células (Bär *et al.*, 2020; Thutupalli *et al.*, 2015). En el modelo se observó que se favorece la agregación en células elongadas, a comparación de células compactas. Esto en parte podría deberse a que, en el modelo el *slime* es secretado por toda la superficie de la célula (y no por los polos como se ha reportado), por lo que las células elongadas podrían formar *slimes* más largos que permitan una agregación con mayor facilidad. Respecto a la densidad celular, se ha sugerido que los comportamientos colectivos, incluido el desarrollo multicelular, son dependientes de este parámetro. Esto debido a que el alcance de un umbral químico (por ejemplo, de la señal A que da inicio al proceso de desarrollo) es directamente proporcional al número de células que reciben y transmiten estas señales. Además, se ha reportado que la agregación inicia en los puntos de choque de las crestas de *rippings*, que es donde hay mayor densidad celular (Kaiser, 2003, 2004; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta ahora no se han desarrollado experimentos que indaguen en un umbral de densidad celular (Liu *et al.*, 2019). Por su parte, algunos modelos (Holmes *et al.*, 2010; Igoshin *et al.*, 2004; Janulevicius *et al.*, 2010, 2015; Sozinova *et al.*, 2005; Thutupalli *et al.*, 2015), incluyendo este, también sugieren que altas densidades celulares promueven la agregación, pero desde una perspectiva mecánica. Es decir que, las propias células confinan el espacio de sus vecinas, lo cual ocasiona que se extiendan o refuercen los *slimes*, y se incrementen las interacciones célula-célula (incluyendo la transmisión de la C y el alineamiento de las células), redirigiendo entonces el movimiento de las células hacia su encuentro con otras. Hay que resaltar que la densidad celular por sí misma no explica la formación de agregados, sino que más bien pareciera facilitarlos. Por lo tanto, es posible que la dinámica de los comportamientos expuestos en este trabajo cambie a menor o mayor densidad celular.

Se debe estar consciente de que el modelo ignora ciertos comportamientos bien descritos en *M. xanthus*, como el movimiento social. Sin embargo, se ha reportado que durante el desarrollo se favorece el movimiento aventurero (Shi y Zusman, 1993; Velicer *et al.*, 1998). Aunque, también se ha reportado que mutantes que presentan solo este movimiento aventurero forman agregados pequeños, y tienden a solo seguir *slimes* en lugar de explorar territorios “nuevos” (Gloag *et al.*, 2016; Shi y Zusman, 1993). Debido a que estos dos últimos eventos no ocurren en las simulaciones, se considera que el modelo representa bien la migración colectiva. Por otro lado, es sabido que durante el desarrollo se reduce el número de reversas de la mixobacteria a medida que se incrementa la concentración de la señal C, lo cual altera la renovación o extensión de los *slimes* (Kaiser, 2004; Yu y Kaiser, 2007). Sin embargo, esta particularidad no se considera en el modelo, siendo que las células pueden revertir su dirección sin ninguna restricción. Asimismo, se ha documentado la presencia de lípidos que sesgan el movimiento de las células de acuerdo a un gradiente de concentración (quimiotaxis; Kearns & Shimkets, 1998, 2001). Sin embargo no se consideró en este modelo, así como tampoco en la mayoría de los modelos del desarrollo de *M. xanthus* encontrados en la literatura, con excepción de Cotter *et al.* (2017) y Zhang *et al.* (2018).

Por último, hay que mencionar que la orientación vertical y posicionamiento aleatorio de las células, escogidos como estado inicial en las simulaciones, no es una condición realista. Sin embargo, estas células virtuales son capaces de cambiar su orientación y posición a lo largo de la simulación. Por otro lado, no se logró probar adecuadamente la semiflexibilidad de las células, debido a que no fue posible simular células totalmente rectas en CC3D. Finalmente, en el modelo las partículas se consideran como parte de un medio inerte y sin adhesión con las células virtuales, pero es posible que estas interacciones sean diferentes en la realidad.

A pesar de las limitaciones del modelo, este es considerablemente robusto, y sus componentes mostraron ser suficientes para permitir la representación de la agregación. Al compararse con otros modelos de agregación, este se constituye por pocas energías, lo cual podría considerarse como una ventaja al permitir analizar de forma sencilla la influencia de cada uno de los componentes. Como ya se mencionó, los numerosos modelos (Bahar *et al.*, 2014; Balagam e Igoshin, 2015; Balagam *et al.*, 2014; Cotter *et al.*, 2017; Holmes *et al.*, 2010; Igoshin *et al.*, 2004; Janulevicius *et al.*, 2010, 2015; Sozinova *et al.*, 2005; Starruß *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018) propuestos para *M. xanthus*, suelen contradecirse entre sí al intentar explicar el proceso de desarrollo multicelular. Esto es debido a que aún no está completamente entendida la compleja interacción de los elementos químicos, físicos y biológicos que subyacen la formación de estructuras multicelulares. Por lo tanto, cada autor modela aquellos elementos que considera relevantes para el proceso. También es importante recalcar que la intención del modelo de este trabajo no es tratar de elucidar los mecanismos por los cuales se da el desarrollo multicelular. Sino que más bien se pretendió construir un modelo que permita la representación del movimiento colectivo en la agregación, para entonces explorar la influencia que tiene un medio heterogéneo sobre el comportamiento de los agregados.

Respecto a lo anterior, en este trabajo al igual que en otros (Vallespir y Ursell, 2019), se reconoce que los medios heterogéneos pueden modificar la dinámica del comportamiento bacteriano. En este caso, se altera el comportamiento tanto de la agregación como de la forma de los agregados de *M. xanthus*. La intensidad de estas modificaciones varía según el tamaño y densidad de las partículas, fungiendo en ciertas ocasiones como nucleadores

o esparcidores. En general, partículas de tamaños pequeños se asocian a comportamientos similares a los de medios homogéneos, debido a que las células son capaces de rodear las partículas. Por el contrario, partículas de gran tamaño facilitan la agregación celular, sugiriendo que estas restringen a nivel local la dirección del movimiento de las células. Esto promueve el encuentro y alineamiento de las células con otras, de forma directa o a través de *slimes*, lo cual puede resultar en la fusión de agregados. Por su parte, la densidad de partículas parece intensificar la agregación o dispersión de las células. Debido a que esto sucede solo a altas densidades, se propone que las partículas al sobrepasar un umbral de densidad (relativo al tamaño de las células) pueden reducir el espacio celular disponible, modificando a su vez la forma de los agregados. Sin embargo, hay que resaltar que en este caso el comportamiento observado es el resultado de la interacción entre el tamaño y densidad de partículas, y no de los elementos por separado. Es posible que en los medios naturales de la mixobacteria estén actuando otros factores adicionales.

En este sentido, se plantea que los medios estructurados pueden modificar la transmisión de señales químicas, cuyas concentraciones demarcan la regulación de vías cruciales en el desarrollo. Por ejemplo, se pueden confinar las señales de difusión (señal A) o bien, se puede facilitar o interrumpir señales que se transmiten por contacto celular (señal C; Kim y Kaiser, 1990; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2012). Asimismo, esta heterogeneidad del medio puede estar alterando los sistemas de movimiento (Fig. 2), redireccionando el movimiento de las células y restringiendo la disposición de los *slimes* (aventurero), o bien, modificando las interacciones célula-célula (social; Mauriello *et al.*, 2010; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012). Por lo tanto, podría considerarse que la topografía del medio altera no solo la agregación celular, sino también la fusión y maduración de los agregados, que posteriormente pueden convertirse o no en cuerpos fructíferos. Entonces, los resultados sugieren que la estructuración del medio podría incluso influir en el proceso completo de desarrollo, así como modificar otros comportamientos colectivos como la formación de *rippings* y *swarmings* (Kaiser, 2003; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016).

Asimismo, se presenta la posibilidad de que, en algunos casos esta condición estructurada podría facilitar la formación de cuerpos fructíferos. Por ejemplo, podemos cuestionarnos cómo es posible que se dé el desarrollo multicelular en ambientes naturales, si en principio la densidad de mixobacterias podría ser relativamente baja en los suelos que habita (Hartzell, 2016). Una explicación podría ser que, las partículas del suelo bajo ciertas condiciones pueden tanto aumentar la densidad celular local, como direccionar el movimiento y alinear las células hacia su encuentro con otras. Dado que difícilmente las mixobacterias podrían escalar estas partículas (Meel *et al.*, 2012), las células se estarían moviendo entre los espacios libres entre partícula y partícula (Gloag *et al.*, 2016). Considerando que, aproximadamente la mitad del volumen de los suelos se constituye por espacios porosos entre las partículas sólidas de material mineral y orgánico, donde además circunda el agua y aire (Tarbuck *et al.*, 2005). De esta forma, también podemos explicar la formación de cuerpos fructíferos en medios estándar con un alta (sino es que irreal) densidad celular. Donde las mismas células pueden ejercer un efecto similar al de las partículas virtuales.

Extrapolando estos resultados, podemos pensar que numerosos procesos de desarrollo de multicelularidad agregativa, tanto de las mixobacterias como de otros organismos, pueden verse influenciados por la estructura de su medio. Sobretudo a esta microescala donde el

medio físico toma mayor relevancia en los organismos (Rivera-Yoshida *et al.*, 2018) presentándose incluso como constricciones del desarrollo. Un ejemplo podría ser la ameba *Dictyostelium discoideum*, que ante condiciones de inanición, igualmente lleva a cabo una migración colectiva de células recubiertas por una capa de *slime*, que culmina en la formación de cuerpos fructíferos pedunculados con esporas (Maree y Hogeweg, 2002).

Sin embargo, sabemos también que los organismos son capaces de modificar su medio (Laland *et al.*, 2015). En el caso de *M. xanthus*, la secreción de *slimes* facilita la formación de cuerpos fructíferos en medios homogéneos. Es posible que esta propiedad tome mayor relevancia en la autoorganización de las células en medios estructurados. Debido a que forman surcos que confinan y facilitan la movilidad de las células hacia la formación de *traffic jams*, a la vez que se refuerzan estos *slimes* (Gloag *et al.*, 2016). Asimismo, otras características como: forma, semiflexibilidad, adhesión y comunicación celular (Furusawa y Kaneko, 2002; Grosberg y Strathmann, 2007; Knoll, 2011; Mora Van Cauwelaert *et al.*, 2015) pueden llegar a ser elementos clave que sostienen la multicelularidad en este tipo de medios heterogéneos. Sin embargo, como se ha mencionado la formación de cuerpos fructíferos, es la respuesta a la interacción de numerosos factores. Varios de estos están por ser dilucidados en cuanto a redes de genes, señalizaciones químicas y condiciones ambientales. Llegando a obtener experimental y teóricamente, una gran variedad de fenotipos de *M. xanthus*, no documentados hasta ahora (Arias Del Angel *et al.*, 2017; Rivera-Yoshida *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012).

Es importante recordar que el fenotipo de los organismos es resultado de diversos factores genéticos, epigenéticos, celulares, de interacción con otros organismos y el ambiente físico, del desarrollo e incluso históricos (Arias Del Angel *et al.*, 2017; Laland *et al.*, 2015; Payne y Wagner, 2019; Rivera-Yoshida *et al.*, 2018, 2019). Por lo cual todo esto se vuelve relevante al tratar de entender a los organismos en el contexto de su medio natural, que aunque en ocasiones resulte difícil, sobretudo a una microescala, es primordial empezar a hacer un esfuerzo colectivo con estudios que se aproximen a estas condiciones.

Conclusión

M. xanthus es una bacteria multicelular del suelo, cuyo proceso de desarrollo ha sido ampliamente estudiado en medios estándares de agar bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, este tipo de medios ignoran la heterogeneidad presente en el ambiente natural de la mixobacteria. En este trabajo se construyó un modelo computacional que sugiere que la dinámica de agregación de *M. xanthus* podría modificarse en medios estructurados. Siendo que, las partículas virtuales pueden funcionar como nucleadores o esparcidores de las células bajo determinadas condiciones, de acuerdo con el tamaño y densidad de las partículas. Lo anterior, resalta la importancia de intentar estudiar y entender las dinámicas de los organismos en el contexto de su medio natural.

Referencias

- Arias Del Angel, J. A., Escalante, A. E., Martínez-Castilla, L. P. y Benítez, M. (2017). An Evo-Devo Perspective on Multicellular Development of Myxobacteria. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 328(1–2), 165–178. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22727>
- Arias Del Angel, J. A., Escalante, A. E., Martínez-Castilla, L. P. y Benítez, M. (2018). Cell-fate determination in *Myxococcus xanthus* development: Network dynamics and novel predictions. *Development Growth and Differentiation*, 60(2), 121–129. <https://doi.org/10.1111/dgd.12424>
- Bahar, F., Pratt-Szeliga, P. C., Angus, S., Guo, J. y Welch, R. D. (2014). Describing *Myxococcus xanthus* aggregation using Ostwald ripening equations for thin liquid films. *Scientific Reports*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep06376>
- Balagam, R. e Igoshin, O. A. (2015). Mechanism for Collective Cell Alignment in *Myxococcus xanthus* Bacteria. *PLoS Computational Biology*, 11(8), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004474>
- Balagam, R., Litwin, D. B., Czerwinski, F., Sun, M., Kaplan, H. B., Shaevitz, J. W. e Igoshin, O. A. (2014). *Myxococcus xanthus* Gliding Motors Are Elastically Coupled to the Substrate as Predicted by the Focal Adhesion Model of Gliding Motility. *PLoS Computational Biology*, 10(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003619>
- Bär, M., Großmann, R., Heidenreich, S. y Peruani, F. (2020). Self-Propelled Rods: Insights and Perspectives for Active Matter. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 11(1), 1–20. <https://doi.org/10.1146/annurev-conmatphys-031119-050611>
- Bonner, J. T. (1998). The Origin of Multicellularity. *Integrative Biology*, 1, 27–36. <https://doi.org/10.1515/9781400830589.19>
- Brodland, G. W. (2015). How computational models can help unlock biological systems. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 47–48, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.001>
- Cotter, C. R., Schüttler, H. B., Igoshin, O. A. y Shimkets, L. J. (2017). Data-driven modeling reveals cell behaviors controlling self-organization during *Myxococcus xanthus* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(23), E4592–E4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620981114>
- Ducret, A., Théodoly, O. y Mignot, T. (2013). Single Cell Micro fluidic Studies of Bacterial Motility. En *Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols* (Vol. 966, pp. 97–107). <https://doi.org/10.1126/science.214.4520.550>
- Furusawa, C. y Kaneko, K. (2002). Origin of multicellular organisms as an inevitable consequence of dynamical systems. *Anatomical Record*, 268(3), 327–342. <https://doi.org/10.1002/ar.10164>
- Glazier, J. A. y Graner, F. (1993). Simulation of the differentail adhesion driven rearrangement of biological cells. *Physical Review*, 47(3), 2128–2154.
- Glazier, J. A., Balter, A. y Poplawski, N. J. (2007). Magnetization to morphogenesis: A brief history of the Glazier-Graner-Hogeweg Model. En A. R. A. Anderson, M. A. J. Chaplain y K. A. Rejniak (Eds.), *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine* (pp. 79–106).
- Gloag, E. S., Turnbull, L., Javed, M. A., Wang, H., Gee, M. L., Wade, S. A. y Whitchurch, C.

- B. (2016). Stigmergy co-ordinates multicellular collective behaviours during *Myxococcus xanthus* surface migration. *Scientific Reports*, 6(26005), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26005>
- Goldstein, R. E. (2018). Are theoretical results “Results”? *eLife*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.7554/eLife.40018>
- Grosberg, R. K. y Strathmann, R. R. (2007). The Evolution of Multicellularity: A Minor Major Transition? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 621–654. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.114735>
- Hartzell, T. (2016). Myxobacteria. *eLS*, (2007), 1–9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020391.pub2>
- Hirashima, T., Rens, E. G. y Merks, R. M. H. (2017). Cellular Potts modeling of complex multicellular behaviors in tissue morphogenesis. *Development Growth and Differentiation*, 59(5), 329–339. <https://doi.org/10.1111/dgd.12358>
- Holmes, A. B., Kalvala, S. y Whitworth, D. E. (2010). Spatial simulations of myxobacterial development. *PLoS Computational Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000686>
- Igoshin, O. A., Welch, R., Kaiser, D. y Oster, G. (2004). Waves and aggregation patterns in myxobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), 4256–4261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400704101>
- Janulevicius, A., Van Loosdrecht, M. C. M., Simone, A. y Picioreanu, C. (2010). Cell flexibility affects the alignment of model myxobacteria. *Biophysical Journal*, 99(10), 3129–3138. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.075>
- Janulevicius, A., van Loosdrecht, M. y Picioreanu, C. (2015). Short-range guiding can result in the formation of circular aggregates in myxobacteria populations. *PLoS Computational Biology*, 11(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004213>
- Kaiser, D. (2003). Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro733>
- Kaiser, D. (2004). Signaling in myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 58(1), 75–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123620>
- Kearns, D. B. y Shimkets, L. J. (1998). Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11957–11962. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11957>
- Kearns, D. B. y Shimkets, L. J. (2001). Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends in Microbiology*, 9(3), 126–129. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)01948-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)01948-5)
- Kim, S. K. y Kaiser, D. (1990). Cell motility is required for the transmission of C-factor, an intercellular signal that coordinates fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Genes and Development*, 4(6), 896–904.
- Knoll, A. H. (2011). The Multiple Origins of Complex Multicellularity. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39(1), 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.031208.100209>
- Kraemer, S. A., Touns, M. A. y Velicer, G. J. (2010). Natural variation in developmental life-history traits of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(1), 226–233. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00888.x>

- Laland, K. N., Uller, T., Feldman, M. W., Sterelny, K., Müller, G. B., Moczek, A., Jablonka, E. y Odling-Smee, J. (2015). The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1813), 20151019. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1019>
- Lancero, H., Caberoy, N. B., Castaneda, S., Li, Y., Lu, A., Dutton, D., Duan, X., Kaplan, H. B., Shi, W. y Garza, A. G. (2004). Characterization of a *Myxococcus xanthus* mutant that is defective for adventurous motility and social motility. *Microbiology*, 150(12), 4085–4093. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27381-0>
- Levins, R. y Lewontin, R. C. (1985). The Analysis of Variance and the Analysis of Causes. En *The Dialectical Biologist* (pp. 109–122). <https://doi.org/10.2307/4973>
- Liu, G., Patch, A., Bahar, F., Yllanes, D., Welch, R. D., Marchetti, M. C., Shashi, T. y Shaevez, J. W. (2019). Self-Driven Phase Transitions Drive *Myxococcus xanthus* Fruiting Body Formation. *Physical Review Letters*, 122(24), 248102-1–6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.122.248102>
- Maree, A. F. M. y Hogeweg, P. (2002). How amoeboids self-organize into a fruiting body: Multicellular coordination in *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3879–3883. <https://doi.org/10.1073/pnas.061535198>
- Mauriello, E. M. F., Mignot, T., Yang, Z. y Zusman, D. R. (2010). Gliding Motility Revisited: How Do the Myxobacteria Move without Flagella? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(2), 229–249. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00043-09>
- Meel, C., Kouzel, N., Oldewurtel, E. R. y Maier, B. (2012). Three-dimensional obstacles for bacterial surface motility. *Small*, 8(4), 530–534. <https://doi.org/10.1002/smll.201101362>
- Merks, R. M. H., Brodsky, S. V., Goligorsky, M. S., Newman, S. A. y Glazier, J. A. (2006). Cell elongation is key to in silico replication of in vitro vasculogenesis and subsequent remodeling. *Developmental Biology*, 289(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.003>
- Mohr, K. (2018). Diversity of Myxobacteria—We Only See the Tip of the Iceberg. *Microorganisms*, 6(3), 84. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030084>
- Mora Van Cauwelaert, E., Arias Del Angel, J. A., Benítez, M. y Azpeitia, E. M. (2015). Development of cell differentiation in the transition to multicellularity: A dynamical modeling approach. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00603>
- Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F. J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A. y Pérez, J. (2016). Myxobacteria: Moving, killing, feeding, and surviving together. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00781>
- Parke, E. C. (2014). Experiments, Simulations, and Epistemic Privilege. *Philosophy of Science*, 81(4), 516–536. <https://doi.org/10.1086/677956>
- Pathak, D. T., Wei, X. y Wall, D. (2012). Myxobacterial tools for social interactions. *Research in Microbiology*, 163, 579–591. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>
- Payne, J. L. y Wagner, A. (2019). The causes of evolvability and their evolution. *Nature Reviews Genetics*, 20(1), 24–38. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0069-z>
- Pelling, A. E., Li, Y., Cross, S. E., Castaneda, S., Shi, W. y Gimzewski, J. K. (2006). Self-

- organized and highly ordered domain structures within swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63, 141–148. <https://doi.org/10.1002/cm.20112>
- Pelling, A. E., Li, Y., Shi, W. y Gimzewski, J. K. (2005). Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), 6484–6489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501207102>
- Rivera-Yoshida, N., Arias Del Angel, J. A. y Benítez, M. (2018). Microbial multicellular development: mechanical forces in action. *Current Opinion in Genetics and Development*, 51, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.05.006>
- Rivera-Yoshida, N., Arzola, A. V., Del Angel, J. A. A., Franci, A., Travisano, M., Escalante, A. E. y Benítez, M. (2019). Plastic multicellular development of *Myxococcus xanthus*. *Royal Society Open Science*, 6(3). <https://doi.org/10.1098/rsos.181730>
- Rivera-Yoshida, N., Hernández-Terán, A., Escalante, A. E. y Benítez, M. (2019). Laboratory biases hinder Eco-Evo-Devo integration: Hints from the microbial world. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22917>
- Sharpe, J. (2017). Computer modeling in developmental biology: Growing today, essential tomorrow. *Development (Cambridge)*, 144(23), 4214–4225. <https://doi.org/10.1242/dev.151274>
- Shi, W. y Zusman, D. R. (1993). The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3378–3382.
- Sozinova, O., Jiang, Y., Kaiser, D. y Alber, M. (2005). A three-dimensional model of myxobacterial aggregation by contact-mediated interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), 11308–11312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504259102>
- Starruß, J., Bley, T., Søgaard-Andersen, L. y Deutsch, A. (2007). A new mechanism for collective migration in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Statistical Physics*, 128(1–2), 269–286. <https://doi.org/10.1007/s10955-007-9298-9>
- Swat, M. H., Thomas, G. L., Belmonte, J. M., Shirinifard, A., Hmeljak, D. y Glazier, J. A. (2012). Modeling of Tissues Using CompuCell3D. En *Methods in Cell Biology* (Vol. 110, pp. 325–366). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388403-9.00013-8>. Multi-Scale
- Tarback, E. J., Lutgens, F. K. y Tasa, D. (2005). *Ciencias de la Tierra*. Madrid: Pearson.
- Thutupalli, S., Sun, M., Bunyak, F., Palaniappan, K. y Shaevitz, J. W. (2015). Directional reversals enable *Myxococcus xanthus* cells to produce collective one-dimensional streams during fruiting-body formation. *Journal of the Royal Society Interface*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0049>
- Vallespir Lowery, N. y Ursell, T. (2019). Structured environments fundamentally alter dynamics and stability of ecological communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2), 379–388. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811887116>
- Velicer, G. J., Kroos, L. y Lenski, R. E. (1998). Loss of social behaviors by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12376–12380. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12376>

- Whitworth, D. E. (2008). *Mixobacteria. Multicellularity and Differentiation*. Washington D.C.: ASM Press.
- Yu, R. y Kaiser, D. (2007). Gliding motility and polarized slime secretion. *Molecular Microbiology*, 63(2), 454–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05536.x>
- Yuan, X. L., Chen, Z., Xiao, S. H., Wan, B., Guan, C. G., Wang, W., Zhou, C. y Hua, H. (2013). The Lantian biota: A new window onto the origin and early evolution of multicellular organisms. *Chinese Science Bulletin*, 58(7), 701–707. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5483-6>
- Zhang, Y., Ducret, A., Shaevitz, J. y Mignot, T. (2012). From individual cell motility to collective behaviors: Insights from a prokaryote, *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 149–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00307.x>
- Zhang, Z., Igoshin, O. A., Cotter, C. R. y Shimkets, L. J. (2018). Agent-Based Modeling Reveals Possible Mechanisms for Observed Aggregation Cell Behaviors. *Biophysical Journal*, 115(12), 2499–2511. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.005>

Anexo

```
1 <CompuCell3D Revision="20180722" Version="3.7.8">
2
3 <Potts>
4   <Dimensions x="300" y="300" z="1"/>
5   <Steps>2001</Steps>
6   <Temperature>10.0</Temperature>
7   <NeighborOrder>2</NeighborOrder>
8   <Boundary_x>Periodic</Boundary_x>
9   <Boundary_y>Periodic</Boundary_y>
10 </Potts>
11
12 <Plugin Name="CellType">
13   <CellType TypeId="0" TypeName="Medium"/>
14   <CellType TypeId="1" TypeName="Medium2" Freeze=""/>
15   <CellType TypeId="2" TypeName="Vegetativas"/>
16 </Plugin>
17
18 <Plugin Name="Volume">
19   <VolumeEnergyParameters CellType="Vegetativas" LambdaVolume="5.0" TargetVolume="12.0"/>
20 </Plugin>
21
22 <Plugin Name="CenterOfMass">
23 </Plugin>
24
25 <Plugin Name="NeighborTracker"/>
26
27 <Plugin Name="LengthConstraint">
28   <LengthEnergyParameters CellType="Vegetativas" TargetLength="12" LambdaLength="30"/>
29 </Plugin>
30 <Plugin Name="ConnectivityGlobal">
31   <Penalty Type="Vegetativas">100000000000</Penalty>
32 </Plugin>
33
34 <CellMotility>
35   <MotilityParameters CellType="Vegetativas" Motility="20"/>
36 </CellMotility>
37
38
39 <Plugin Name="Chemotaxis">
40   <ChemicalField Name="Slime" Source="FlexibleDiffusionSolverFE">
41     <ChemotaxisByType ChemotactTowards="Vegetativas" Lambda="10.0" Type="Vegetativas"/>
42   </ChemicalField>
43 </Plugin>
44
45 <Plugin Name="Secretion">
46   <Field Name="Slime">
47     <SecretionOnContact SecreteOnContactWith="Medium" Type="Vegetativas">0.9</SecretionOnContact>
48   </Field>
49 </Plugin>
50 <Steppable Type="FlexibleDiffusionSolverFE">
51   <DiffusionField Name="Slime">
52     <DiffusionData>
53       <FieldName>Slime</FieldName>
54       <DiffusionConstant>0.0</DiffusionConstant>
55       <DecayConstant>0.006</DecayConstant>
56       <DoNotDiffuseTo>Medium2</DoNotDiffuseTo>
57     </DiffusionData>
58   </DiffusionField>
59 </Steppable>
60
61
62 <Plugin Name="Curvature">
63   <InternalParameters Type1="Vegetativas" Type2="Vegetativas">
64     <Lambda>100000.0</Lambda>
65     <ActivationEnergy>-50.0</ActivationEnergy>
66   </InternalParameters>
67   <InternalTypeSpecificParameters>
68     <Parameters TypeName="Vegetativas" MaxNumberOfJunctions="2" NeighborOrder="1"/>
69   </InternalTypeSpecificParameters>
70 </Plugin>
```

Figura 1. Código .xml empleado en CompuCell 3D.

```

71 |
72 |     <Plugin Name="Contact">
73 |         <Energy Type1="Medium" Type2="Medium">0.0</Energy>
74 |         <Energy Type1="Medium" Type2="Medium2">0.0</Energy>
75 |         <Energy Type1="Medium" Type2="Vegetativas">10.0</Energy>
76 |         <Energy Type1="Medium2" Type2="Medium2">0.0</Energy>
77 |         <Energy Type1="Medium2" Type2="Vegetativas">10.0</Energy>
78 |         <Energy Type1="Vegetativas" Type2="Vegetativas">3.0</Energy>
79 |         <NeighborOrder>2</NeighborOrder>
80 |     </Plugin>
81 |
82 |     <Steppable Type="PIFInitializer">
83 |         <PIFName>Simulation/46x16.piff</PIFName>
84 |     </Steppable>
85 |
86 | </CompuCell3D>

```

Figura 1. Continuación.

```

1 |
2 | import sys
3 | from os import environ
4 | from os import getcwd
5 | import string
6 |
7 | sys.path.append(environ["PYTHON_MODULE_PATH"])
8 |
9 |
10 | import CompuCellSetup
11 |
12 | sim, simthread = CompuCellSetup.getCoreSimulationObjects()
13 |
14 | CompuCellSetup.initializeSimulationObjects(sim, simthread)
15 |
16 | steppableRegistry=CompuCellSetup.getSteppableRegistry()
17 |
18 | from FructiferoSteppables import FructiferoSteppable
19 | steppableInstance=FructiferoSteppable(sim, _frequency=1)
20 | steppableRegistry.registerSteppable(steppableInstance)
21 |
22 | from FructiferoSteppables import HandleOutputDataSteppable
23 | steppableInstance=HandleOutputDataSteppable(sim, _frequency=50)
24 | steppableRegistry.registerSteppable(steppableInstance)
25 |
26 | from FructiferoSteppables import NeighborDataSteppable
27 | steppableInstance=NeighborDataSteppable(sim, _frequency=2000)
28 | steppableRegistry.registerSteppable(steppableInstance)
29 |
30 | CompuCellSetup.mainLoop(sim, simthread, steppableRegistry)
31 |
32 |

```

Figura 2. Código .py empleado en CompuCell 3D.

```

1
2 from PySteppables import *
3 import CompuCell
4 import sys
5
6 import numpy as np
7 import numpy.random as rng
8
9 #####
10 #Céulas/Partículas aleatorias; Código modificado de Julio Belmonte
11 class FructiferoSteppable(SteppableBasePy):
12
13     def __init__(self, _simulator, _frequency=1):
14         SteppableBasePy.__init__(self, _simulator, _frequency)
15     def start(self):
16
17         number_of_medium2 = 15
18         height_of_medium2 = 47
19         width_of_medium2 = 47
20         self.seed_medium2(number_of_medium2,height_of_medium2,width_of_medium2)
21
22         number_of_vegetativas = 700
23         height_of_vegetativas = 12
24         self.seed_vegetativas(number_of_vegetativas,height_of_vegetativas)
25
26 # Partículas aleatorias
27     def seed_medium2(self,N,H,W):
28
29         to_be_created = N
30         while to_be_created > 0:
31             x = rng.randint(0,self.dim.x)
32             y = rng.randint(0,self.dim.y)
33             existing_cell_at_point = self.cellField[x, y, 0]
34             if not existing_cell_at_point:
35                 free_pixels_y = []
36                 if y+H<self.dim.y:
37                     for check_y in range(y-H,y+H):
38                         existing_cell_at_point_2_y = self.cellField[x, check_y, 0]
39                         if not existing_cell_at_point_2_y:
40                             free_pixels_y.append(check_y)
41
42                 free_pixels_x = []
43                 if x+W<self.dim.x:
44                     for check_x in range(x-W,x+W):
45                         existing_cell_at_point_2_x = self.cellField[check_x, y, 0]
46                         if not existing_cell_at_point_2_x:
47                             free_pixels_y.append(check_y)
48                             if not existing_cell_at_point_2_x:
49                                 free_pixels_x.append(check_x)
50
51                 if len(free_pixels_y) == H:
52                     if len(free_pixels_x) == W:
53                         to_be_created -=1
54                         free_pixels_y = np.array(free_pixels_y)
55                         free_pixels_x = np.array(free_pixels_x)
56                         print"creating medium2 at\n x=",free_pixels_x,'\n y=',free_pixels_y
57                         new_medium2 = self.newCell(self.MEDIUM2)
58                         self.cellField[np.amin(free_pixels_x):np.amax(free_pixels_x),
59                                         np.amin(free_pixels_y):np.amax(free_pixels_y),
60                                         0] = new_medium2
61
62                 elif len(free_pixels_y) > H:
63                     if len (free_pixels_x) > W:
64                         to_be_created -=1
65                         free_pixels_y = free_pixels_y[:H]
66                         free_pixels_x = free_pixels_x[:W]
67                         free_pixels_y = np.array(free_pixels_y)
68                         free_pixels_x = np.array(free_pixels_x)
69                         print"creating medium2 at\n x=",free_pixels_x,'\n y=',free_pixels_y
70                         new_medium2 = self.newCell(self.MEDIUM2)
71                         self.cellField[np.amin(free_pixels_x):np.amax(free_pixels_x),
72                                         np.amin(free_pixels_y):np.amax(free_pixels_y),
73                                         0] = new_medium2

```

Figura 3. Código *Steppables.py* empleado en CompuCell 3D.

```

74
75 # Células aleatorias
76 def seed_vegetativas(self,N,H):
77
78     to_be_created = N
79
80     while to_be_created > 0:
81         x = rng.randint(0,self.dim.x)
82         y = rng.randint(0,self.dim.y)
83         existing_cell_at_point = self.cellField[x, y, 0]
84
85         if not existing_cell_at_point:
86             free_pixels = []
87             if y+H<self.dim.y:
88                 for check_y in range(y-H,y+H):
89                     existing_cell_at_point_2 = self.cellField[x, check_y, 0]
90                     if not existing_cell_at_point_2:
91                         free_pixels.append(check_y)
92
93             if len(free_pixels) == H:
94                 to_be_created -=1
95                 free_pixels = np.array(free_pixels)
96                 print"creating vegetativa at\n x=",x,'\n y=',free_pixels
97                 new_vegetativa = self.newCell(self.VEGETATIVAS)
98                 self.cellField[x,
99                     np.amin(free_pixels):np.amax(free_pixels),
100                     0] = new_vegetativa
101             elif len(free_pixels) > H:
102                 to_be_created -=1
103                 free_pixels = free_pixels[:H]
104                 free_pixels = np.array(free_pixels)
105                 print"creating vegetativa at\n x=",x,'\n y=',free_pixels
106                 new_vegetativa = self.newCell(self.VEGETATIVAS)
107                 self.cellField[x,
108                     np.amin(free_pixels):np.amax(free_pixels),
109                     0] = new_vegetativa
110
111     def step(self,mcs):
112         pass
113     def finish(self):
114         pass
115
116     #####
117     #Datos de salida: Número y tamaño de agregados
118     # Código modificado de Juan Arias del Angel
119
120 class HandleOutputDataSteppable(SteppableBasePy):
121     def __init__(self,_simulator,_frequency = 1):
122         SteppableBasePy.__init__(self,_simulator,_frequency)
123     def start(self):
124         file_name = "output_data_"+ str(time.time()) + ".txt"
125         path_to_file = "/Users/Edna/CC3DWorkspace/"
126         self.output_data = open(path_to_file + file_name, "w")
127
128         for cell in self.cellListByType(self.VEGETATIVAS):
129             self.attributes_to_extract = ['id', 'xCOM', 'yCOM']
130             self.cell_neighborhood = True
131
132     def step(self, mcs):
133         for attribute in self.attributes_to_extract:
134             self.output_data.write("MCS" + str(mcs)+ "\tCELL_ATTRIBUTE\t" + attribute + ":\t")
135             for cell in self.cellListByType(self.VEGETATIVAS):
136                 cellattr = getattr(cell, attribute)
137                 self.output_data.write(" " + str(cellattr))
138             self.output_data.write("\n")
139
140         if(self.cell_neighborhood):
141             self.output_data.write("MCS" + str(mcs)+ "\tCELL_INTERACTION\tCELL_NEIGHBORS:\t")
142             for cell in self.cellListByType(self.VEGETATIVAS):
143                 for neighbor , commonSurfaceArea in self.getCellNeighborDataList(cell):
144                     if neighbor:
145                         if neighbor.id > cell.id:
146                             self.output_data.write(" " + str(cell.id) + "-" + str(neighbor.id))
147             self.output_data.write("\n")
148

```

Figura 3. Continuación.

```

149
150         self.output_data.write("MCS" + str(mcs) + "\t\tREPORT\n")
151     def finish(self):
152         self.output_data.close()
153
154
155
156     #####
157         # Datos de salida: Número de células agregadas
158 class NeighborDataSteppable(SteppableBasePy):
159     def __init__(self, _simulator, _frequency=1):
160         SteppableBasePy.__init__(self, _simulator, _frequency)
161
162     def start(self):
163         pass
164
165     def step (self, mcs):
166         fileName= 'Output'+str(mcs)+'.txt'
167         try:
168             fileHandle, fullFileName = self.openFileInSimulationOutputDirectory(fileName, "w")
169         except IOError:
170             print "Could not open file ", fileName, " for writing. "
171             return
172         for cell in self.cellListByType(self.VEGETATIVAS):
173             neighborList = self.getCellNeighborDataList(cell)
174             print >>fileHandle, neighborList.neighborCountByType()

```

Figura 3. Continuación.

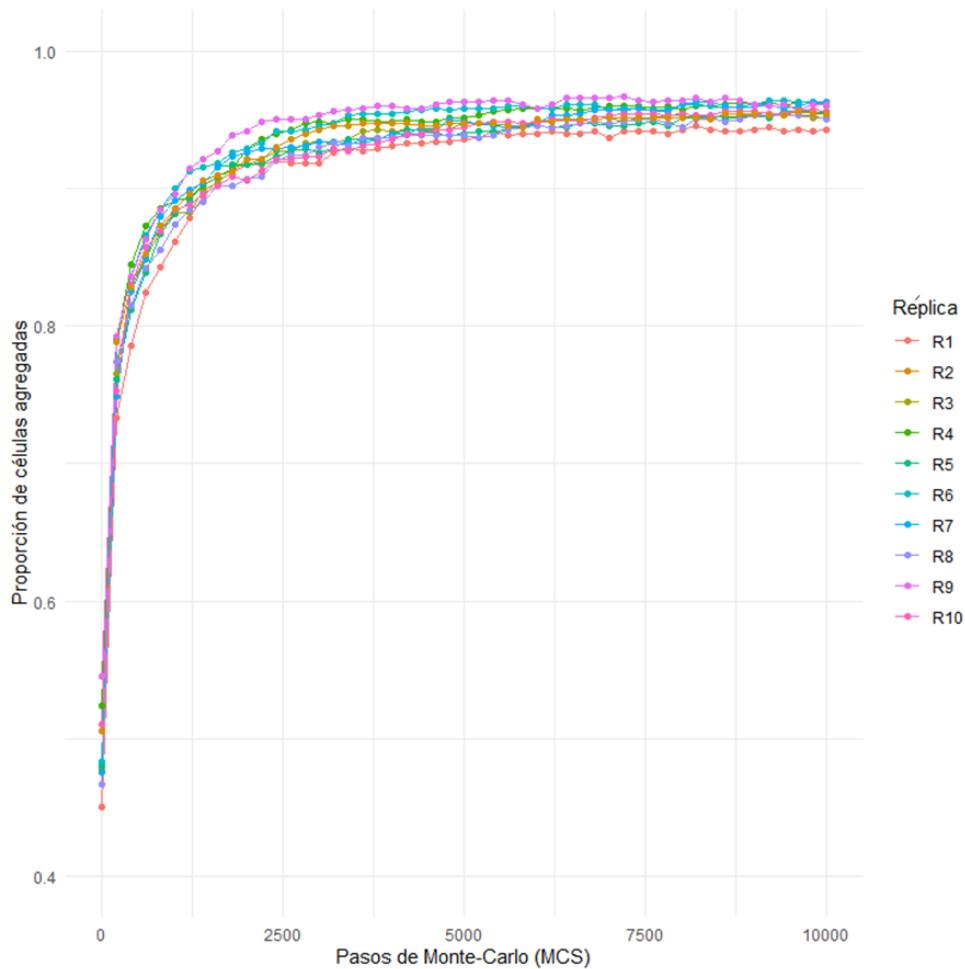


Figura 4. Cambio de la proporción de células virtuales agregadas a lo largo del tiempo (MCS), en medios homogéneos. Cada línea corresponde a una réplica diferente de la simulación.

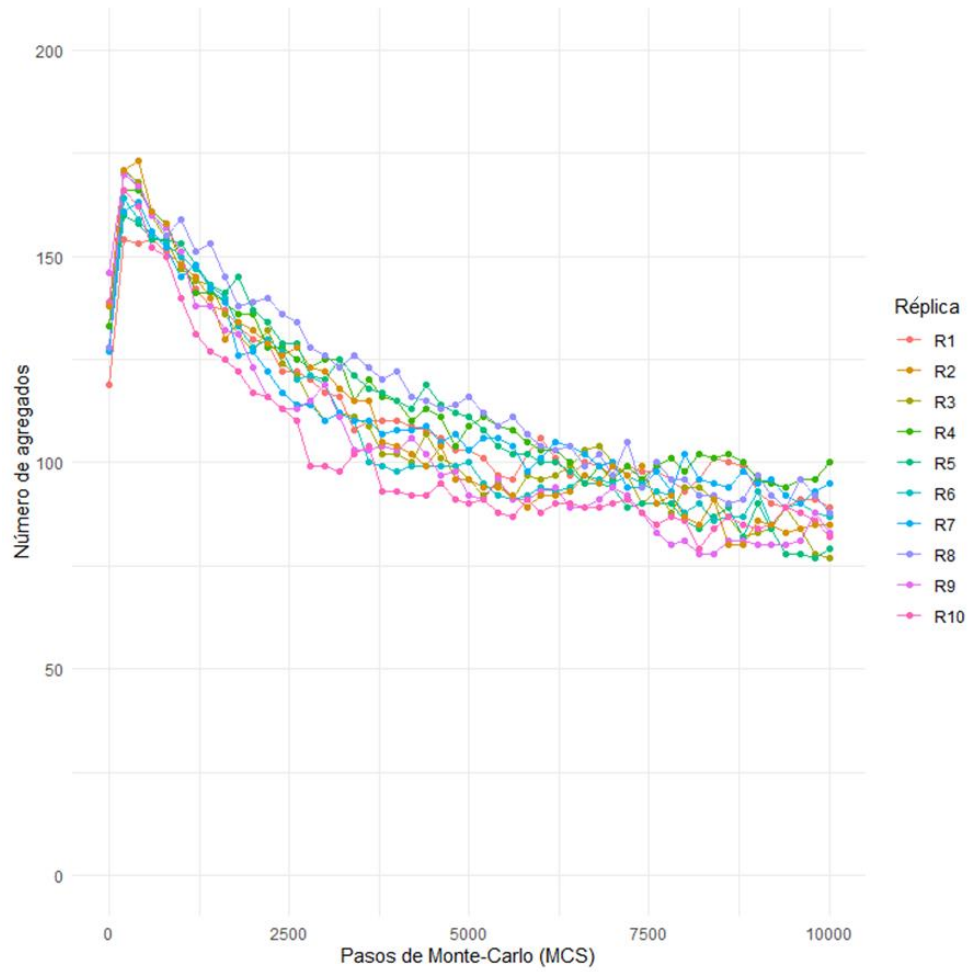


Figura 5. Cambio del número de agregados a lo largo del tiempo (MCS), en medios homogéneos. Cada línea corresponde a una réplica diferente de la simulación.

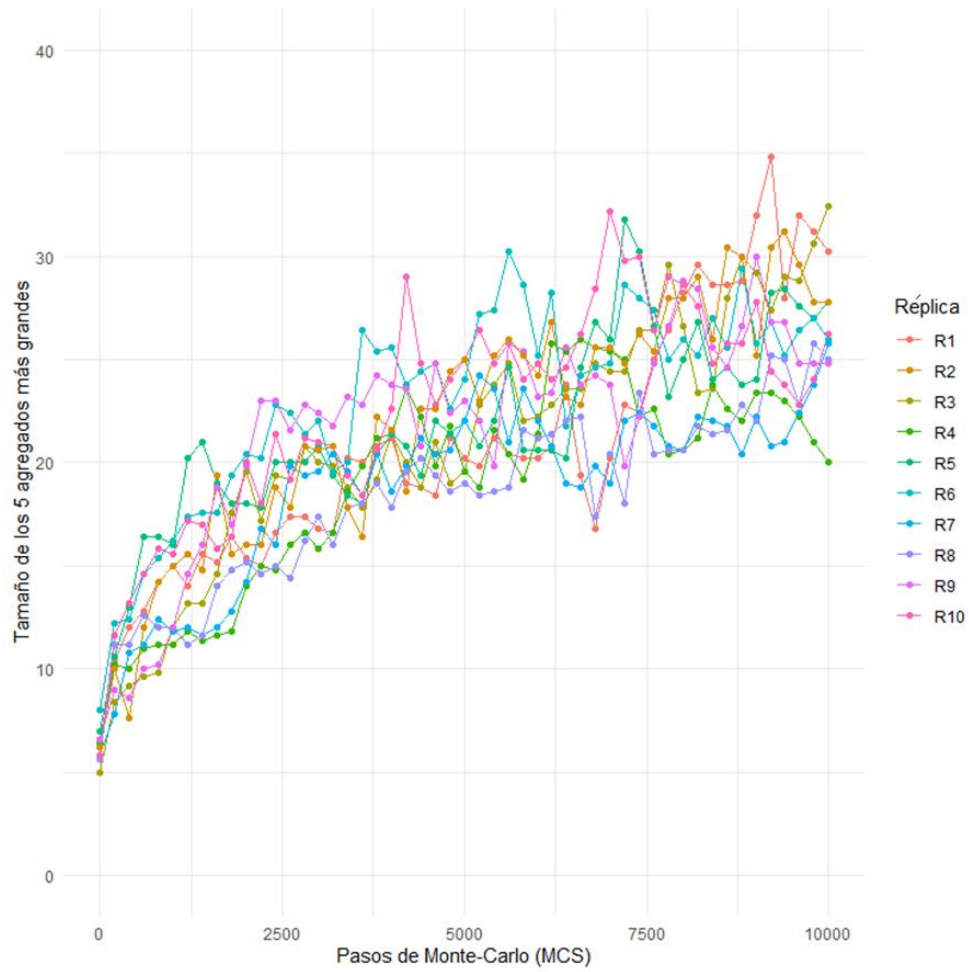


Figura 6. Cambio del promedio del tamaño de los 5 agregados más grandes a lo largo del tiempo (MCS), en medios homogéneos. Cada línea corresponde a una réplica diferente de la simulación.

Tabla 1. Lista de los tamaños y densidades de partículas virtuales empleadas en las simulaciones cortas. El valor hipotético se refiere a las condiciones estándar seleccionadas, y el valor real es la modificación de 1-2 unidades del valor hipotético para disminuir el desajuste entre la cuadrícula y el acomodo de las partículas virtuales.

Tamaño hipotético	Densidad hipotética (1/N)	Tamaño real	Densidad real (1/N)
3	6	3	6
6	6	6	6
9	6	9	6
12	6	12	7
18	6	17	6
24	6	24	6
30	6	31	6
36	6	37	6
42	6	43	7
48	6	46	4
3	12	3	12
6	12	6	13
9	12	9	11
12	12	12	11
18	12	18	12
24	12	25	12
30	12	31	12
36	12	37	13
42	12	41	10
48	12	48	12
3	18	3	17
6	18	6	17
9	18	9	18
12	18	12	18
18	18	19	18
24	18	25	18
30	18	31	18
36	18	35	16
42	18	42	18
48	18	46	16
3	24	3	24
6	24	6	24
9	24	9	24
12	24	12	25
18	24	19	24
24	24	25	25
30	24	28	23
36	24	36	24

Tabla 1. Continuación.

Tamaño hipotético	Densidad hipotética (1/N)	Tamaño real	Densidad real (1/N)
42	24	40	22
48	24	49	25
3	30	3	30
6	30	6	31
9	30	9	29
12	30	12	30
18	30	18	31
24	30	21	28
30	30	30	30
36	30	34	28
42	30	41	31
48	30	47	30
3	36	3	35
6	36	6	36
9	36	9	34
12	36	12	37
18	36	17	34
24	36	24	36
30	36	28	34
36	36	37	37
42	36	41	36
48	36	46	34
3	42	3	41
6	42	6	43
9	42	9	42
12	42	11	41
18	42	18	42
24	42	22	40
30	42	30	43
36	42	36	41
42	42	40	40
48	42	50	44
3	48	3	48
6	48	6	46
9	48	9	49
12	48	12	48
18	48	17	46
24	48	24	49
30	48	29	48
36	48	34	46

Tabla 1. Continuación.

Tamaño hipotético	Densidad hipotética (1/N)	Tamaño real	Densidad real (1/N)
42	48	44	50
48	48	48	49
3	54	3	55
6	54	6	54
9	54	9	53
12	54	12	52
18	54	18	55
24	54	24	53
30	54	28	52
36	54	39	56
42	54	42	55
48	54	48	54
3	60	3	59
6	60	6	58
9	60	9	61
12	60	12	61
18	60	18	59
24	60	22	58
30	60	32	62
36	60	36	61
42	60	42	60
48	60	47	59

Tabla 2. Lista de los tamaños y densidades de partículas virtuales empleadas en las simulaciones para células virtuales compactas, que permiten analizar la robustez del modelo.

Tamaño	Densidad (1/N)
3	6
12	7
31	6
48	12
3	24
12	25
28	23
49	25
3	41
11	41
30	43
50	44
3	59
12	61
32	62
47	59

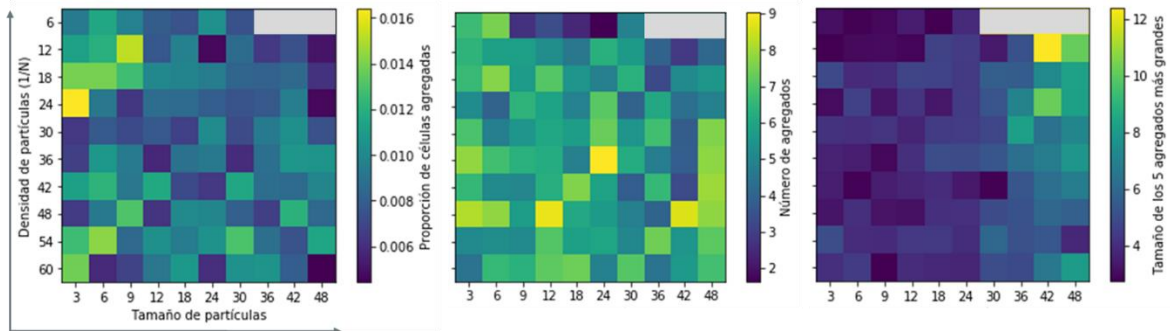


Figura 7. Mapas de calor que muestran la desviación estándar entre las 10 réplicas de simulación para cada condición al 2,000 MCS de: a) la proporción de células virtuales agregadas; b) el número de agregados; c) el tamaño de los 5 agregados más grandes. Se describe el tamaño y la densidad de partículas virtuales de forma ascendente en los ejes x y y respectivamente. Los cuadros en gris indican que las simulaciones no se lograron efectuar.

Tabla 3. Pruebas de normalidad de Shapiro para los datos empleados en las regresiones líneas de los atributos de partículas virtuales y los comportamientos celulares.

Variable	<i>W</i>	<i>P</i>
Proporción de células agregadas	0.976	0.074
Número de agregados	0.887	4.78×10^{-7}
Tamaño de los 5 agregados más grandes	0.797	2.81×10^{-10}
Tamaño de partícula	0.921	2.05×10^{-5}
Densidad de partícula	0.710	1.34×10^{-12}
Área ocupada por partículas	0.883	5.16×10^{-7}

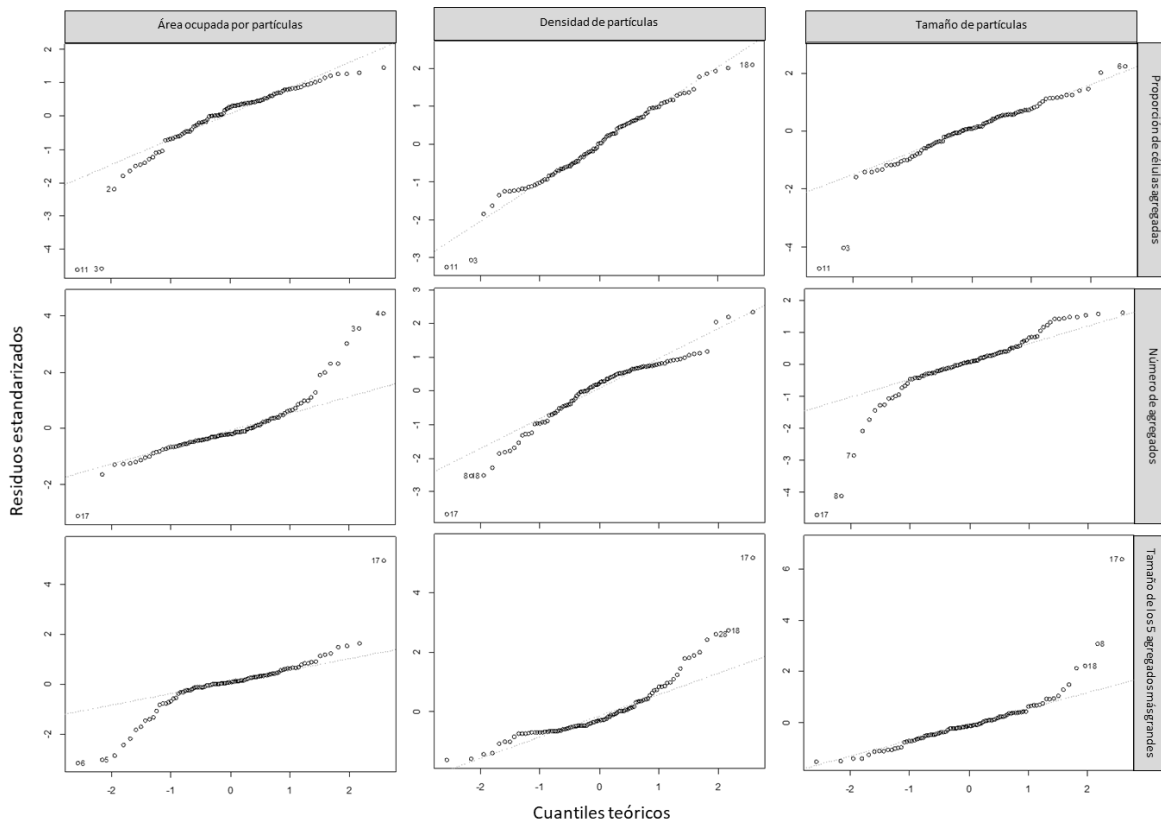


Figura 8. QQ-plots de los residuos de las regresiones lineales de los atributos de las partículas virtuales (de izquierda a derecha: área ocupada, densidad y tamaño) con los comportamientos celulares registrados (de arriba a abajo: proporción de células virtuales agregadas, número de agregados y tamaño de agregados) al 2,000 MCS. Se observa en general que los residuos poseen una distribución normal.