

Dinámica de micronadadores: optimización y control

Memoria para optar al título de Doctor en Física

Ivan Berdakin

Dirigida por el Doctor

Carlos A. Condat

Codirigida por la Doctora

Verónica I. Marconi

**Facultad de Matemática, Astronomía y Física Universidad
Nacional de Córdoba**

Junio 2015



Dinámica de micronadadores: optimización y control por Iván Berdakin, Carlos A. Condat y Verónica I. Marconi. se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 2.5 Argentina](#).

Documento maquetado con T_EX_S v.1.0

*A Carla
mi viento en las velas
mi embarcación y mi norte*

Agradecimientos

El trabajo que condujo a la escritura de esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración y la motivación de muchas personas e instituciones con las que estaré siempre enormemente agradecido. Ellos son:

Mis directores de tesis, Carlos A. Condat y Verónica I. Marconi, quienes no solo me introdujeron en un área de investigación sino que me transmitieron una manera de trabajar y corrigieron una y otra vez el manuscrito hasta llegar a esta versión. Adolfo J. Banchio, Alejandro V. Silhanek y Alejandro Guidobaldi que generosamente colaboraron con las investigaciones que conforman este trabajo, aportando discusiones valiosas además de tiempo, ideas y recursos. Todos los participantes de los seminarios semanales de GTMCbio: Gustavo Sibona, Jorge Revelli, Silvia Menchón, Lucas Barberis, Mario Di Salvo y Shirlene Vega con los que tuve la posibilidad de discutir muchos de los resultados que aquí se presentan. A mis compañeros de oficina, con quienes compartimos mucho más que un lugar de trabajo. A mis amigos, familiares y a Carla, quien me acompañó (y aguantó) durante todo el proceso.

La beca que me permitió desarrollar esta investigación y los distintos proyectos en los que participé fueron financiados por Conicet, el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación y por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba. LAMARX prestó sus instalaciones para el estudio de las trayectorias de espermatozoides en cámaras circulares con y sin rugosidad. FaMAF me brindó un lugar de trabajo y un grupo humano de docentes y no docentes a quienes les debo toda mi gratitud.

Resumen

Los estudios sobre la dinámica de micronadadores han cobrado un notable impulso durante la última década, acompañado por el desarrollo de técnicas experimentales que permiten la manipulación de materiales en las escalas del micrómetro y el nanómetro, con costos accesibles para un gran número de laboratorios. Las investigaciones desarrolladas cubren una amplia variedad de temas y escalas, desde el procesamiento intracelular de señales quimiotácticas hasta las propiedades reológicas de líquidos ocupados por poblaciones celulares a altas densidades, pasando por la autopropulsión de nadadores artificiales y el efecto de distintos estímulos externos. En esta tesis se abordan numéricamente dos de estas temáticas. En primer lugar se estudia la dinámica y la eficiencia de un nadador artificial idealizado, formado únicamente por tres esferas que varían sus posiciones relativas en forma cíclica y no simétrica [Najafi y Golestanian (2004)]. El estudio se lleva a cabo empleando dinámica de Stokes, con el fin de conseguir una representación adecuada de las interacciones hidrodinámicas ejercidas entre las esferas [Brady y Bossis (1988); Swan et al. (2011)]. Este enfoque permite evaluar y optimizar la eficiencia del ciclo y, al mismo tiempo, encontrar el límite de validez de soluciones analíticas publicadas con anterioridad a nuestro trabajo [Golestanian y Ajdari (2008)]. El segundo tema investigado trata sobre la posibilidad de controlar la distribución espacial de una población de nadadores bajo confinamiento, utilizando contenedores con volúmenes del orden del nanolitro. Distintos experimentos han permitido comprobar que la interacción de nadadores con paredes sólidas produce un efecto de atrapamiento [Berke et al. (2008); Di Leonardo et al. (2011)] que puede ser aprovechado para dirigir el movimiento de una población en conjunto [Galajda et al. (2007)], aumentar su acumulación en regiones específicas del espacio [Kim et al. (2010)], separar nadadores de acuerdo a su tamaño [Hulme et al. (2008)] o incluso propulsar micromotores [Angelani et al. (2009); Sokolov et al. (2010)]. Al igual que en todas estas investigaciones, los resultados que se presentan en esta tesis también se basan en una colaboración activa entre especialistas en microbiología, física de materiales y técnicas computacionales. En una primera instancia se extiende el modelo de Wan [Wan et al. (2008)] para investigar el direccionamiento de bacterias *Escherichia coli* por medio de barreras asimétricas. El modelo propuesto mejora la comparación con resultados experimentales y se evalúan por separado los efectos vinculados con cambios en la geometría y con los parámetros que caracterizan la dinámica de los nadadores [Berdakin et al. (2013a)]. La comprobación de la dependencia del direccionamiento con los parámetros dinámicos

de cada población dio lugar al diseño de contenedores capaces de separar poblaciones con distintas características de movimiento [Berdakin et al. (2013b)]. Finalmente, se colaboró en la optimización de un diseño geométrico eficaz para el direccionamiento de células espermáticas humanas. Este resultado abre perspectivas muy interesantes para la mejora de técnicas de fertilización *in vitro*, la determinación precisa de subfertilidad masculina y el estudio de la quimiotaxis espermática [Guidobaldi et al. (2014, 2015)].

Índice

Agradecimientos	III
Resumen	v
1. Introducción	1
1.1. Presentación del problema	1
1.2. Mecanismos de propulsión de micronadadores	4
1.2.1. Escherichia Coli	5
1.2.2. Espermatozoides	6
1.2.3. Nadadores Artificiales	9
1.3. Litografía Blanda	10
2. Hidrodinámica de micronadadores	13
2.1. Introducción	13
2.2. Flujos a Bajo Número de Reynolds	14
2.2.1. Ecuación de Navier-Stokes	14
2.2.2. Régimen de Stokes	14
2.2.3. Función de Green para la ecuación de Stokes	15
2.3. Nadar a bajo número de Reynolds	16
2.3.1. Movimiento de cuerpos rígidos	16
2.3.2. Autopropulsión	17
2.3.3. El teorema de Purcell	18
2.4. Métodos numéricos	19
3. Difusión de microorganismos nadadores	21
3.1. Introducción	21
3.2. Difusión	21
3.2.1. Caminatas aleatorias con persistencia	22
3.2.2. Difusión con corridas curvas	24
3.2.3. Difusión de nadadores con torque externo	27

4. Optimización de un micronadador artificial	29
4.1. Introducción	29
4.2. Descripción del nadador y su movimiento	31
4.2.1. Adimensionalización	35
4.3. Aproximación de fuerzas puntuales	35
4.4. Dinámica del nadador	37
4.5. Validez de la aproximación puntual	40
4.6. Ciclo cuadrado vs. ciclo circular	42
4.7. Conclusiones	47
5. Bacterias en medios microconfinados	49
5.1. Introducción	49
5.2. Modelo	50
5.3. Corridas y tumbos	53
5.4. Difusión	53
5.5. Acumulación	56
5.6. Direccionamiento	59
5.7. Conclusiones	63
6. Direccionamiento y Separación de bacterias <i>E. coli</i>	65
6.1. Introducción	65
6.2. Direccionamiento vs. parámetros dinámicos	66
6.3. Separación de bacterias	67
6.4. Eficiencia del dispositivo	71
6.5. Conclusiones	77
7. Direccionamiento de espermatozoides	79
7.1. Introducción	79
7.2. Modelo	80
7.3. Acumulación	82
7.4. Acumulación de células con torque externo	84
7.5. Atrapamiento	88
7.6. Direccionamiento	92
7.7. Conclusiones	95
8. Conclusiones	97
A. Trabajos publicados y en preparación	101
Bibliografía	107

Capítulo 1

Introducción

Para mi esta fue, entre todas las maravillas naturales que he descubierto, la más maravillosa de todas, y debo decir, por mi parte, que ninguna visión más placentera ha llegado a mis ojos que la de tantos miles de criaturas vivas nadando en una sola gota de agua.

Anton van Leeuwenhoek.

Resumen:

En este capítulo se presenta una introducción general a los temas que se abordan a lo largo de toda la tesis. Inicialmente se comentan las motivaciones del presente estudio y su organización. Posteriormente se revisan los mecanismos de propulsión y estrategias de movimiento de distintos microorganismos, así como también de micro-nadadores artificiales. Se termina el capítulo con una breve mención sobre la técnica que se utiliza para la construcción de contenedores con geometrías apropiadas para el control del movimiento celular.

1.1. Presentación del problema

Los microorganismos son seres vivos cuyas dimensiones se encuentran en la escala del micrómetro y, por ende, no pueden ser observados a simple vista. A pesar de que no los veamos, los microorganismos están en todas partes y constituyen una de las formas de vida más abundante de nuestro planeta. Se calcula que tan solo las células procariotas – clase celular que contiene a todas las bacterias, además de otras especies – almacenan una cantidad de carbono similar a la de todas las plantas de la Tierra y 10 veces más nitrógeno que éstas [Whitman et al. (1998)]. Además, los microorganismos intervienen en

diversos procesos que son fundamentales para el mantenimiento de la biósfera terrestre, reciclando nutrientes y participando activamente en los ciclos del carbono y el nitrógeno.

Desde que los microorganismos fueron descubiertos, hace ya más de tres siglos, su movimiento ha sido objeto de numerosas investigaciones. En algunos casos, éstas se orientan hacia el desarrollo de aplicaciones tecnológicas y productivas, relacionadas por ejemplo con las industrias alimenticia y farmacéutica, mientras que otras veces buscan responder preguntas que no se vinculan de una manera evidente con alguna aplicación. En este último grupo podemos mencionar, solo por nombrar algunas, aquellas que intentan comprender cuáles son las condiciones de supervivencia celular y sus estrategias de búsqueda de nutrientes [Tam y Hosoi (2011); Di Salvo y Condat (2012)], de qué manera algunos microorganismos consiguen detectar y alejarse de medios hostiles [Thar y Fenchel (2001)], moverse en medios porosos [Moyano Cortez y Marconi (2014)], y el modo en que las células espermáticas consiguen arribar al óvulo femenino para fertilizarlo. Una rama de la investigación que se relaciona con todas las preguntas anteriores es aquella dirigida directamente a la comprensión de los mecanismos empleados por distintas células para propulsarse.

La autopropulsión de nadadores con dimensiones del orden del micrómetro se enfrenta a algunas limitaciones muy diferentes a las que encontramos en nuestra experiencia cotidiana. Esto condujo evolutivamente al desarrollo de diversos mecanismos de nado específicos para diferentes especies, algunos de los cuales se describen en lo que resta de este capítulo. Para comprender el origen de estas limitaciones, se presentará en el **capítulo 2** una breve introducción al problema del nado a bajo número de Reynolds.

Dada la dificultad que presenta el estudio de sistemas reales, se han propuesto en el pasado diversas idealizaciones que sirven para el estudio de alguna característica específica del problema [Taylor (1951); Purcell (1976)]. En la actualidad, gracias a la posibilidad de fabricar micronadadores artificiales, el estudio de nadadores simples cobró nuevo impulso prometiendo interesantes aplicaciones prácticas. Posiblemente el micronadador más sencillo capaz de autopropulsarse sea el que introdujo Golestanian en años recientes. Este nadador está formado tan solo por 3 esferas que cambian sus posiciones relativas cíclicamente, rompiendo la simetría espacial y la simetría temporal [Najafi y Golestanian (2004)]. A pesar de su simplicidad, no existe un estudio sistemático de su eficiencia, anterior al que aquí se presenta, que tenga en cuenta de manera detallada las interacciones hidrodinámicas entre las esferas. Luego de hacer un breve repaso en el **capítulo 3** de las propiedades difusivas de poblaciones, se retomará el estudio del nadador de Golestanian en el **capítulo 4** utilizando dinámica de Stokes para las simulaciones. El método numérico escogido permite evaluar la eficiencia del nadador como función de su tamaño y del tipo de ciclo que emplea para su propulsión. Se obtiene, además, un límite para la validez de aproximaciones analíticas desarrolladas con anterioridad [Golestanian y Ajdari (2008)].

A pesar de los enormes avances observados en décadas recientes, el estudio de los mecanismos y estrategias vinculados al movimiento de microorganismos continúa siendo al presente un campo dinámico de investigación [Lauga y Powers (2009)]. Si bien algunas especies celulares han sido muy estudiadas en el pasado por su interés particular o por la relativa facilidad con que pueden cultivarse *in-vitro*, otras empiezan a ser investigadas

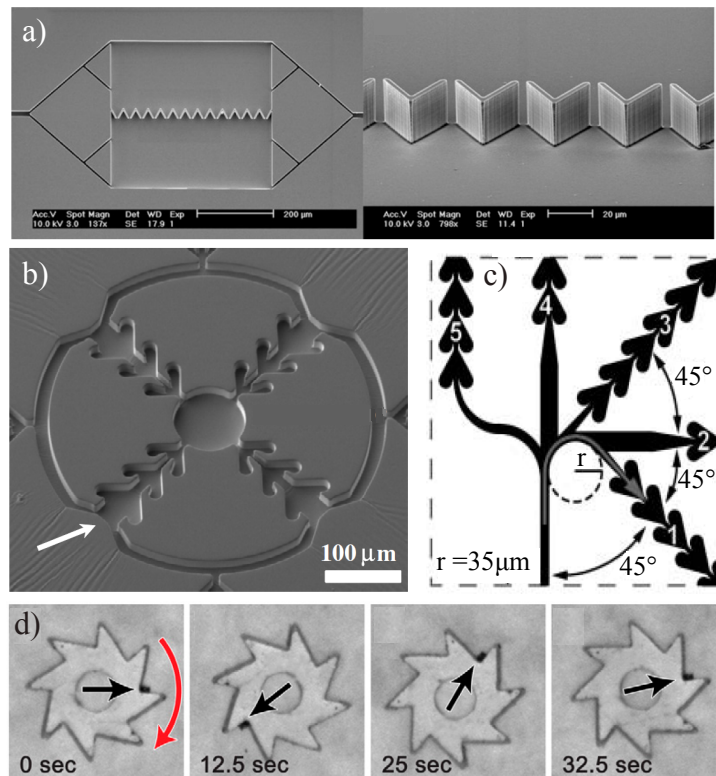


Figura 1.1: Dispositivos de control pasivo del movimiento de microorganismos. a) Contenedor empleado para direccionar el movimiento de bacterias *E. coli* en [Galajda et al. (2007)]. b) Concentrador de bacterias diseñado y construido por [Kim et al. (2010)]. c) Esquema de la geometría empleada para separar bacterias en base a su tamaño [Hulme et al. (2008)] y d) Micromotor propulsado por bacterias [Sokolov et al. (2010)].

recién ahora o no han entrado aún a los laboratorios. Así, por ejemplo, en años recientes se ha conseguido comprender el mecanismo que les permite a las *chlamydomonas reinhardtii* cambiar de dirección [Goldstein et al. (2009)] y se descubrió un mecanismo novedoso usado por la bacteria marina *Vibrio alginolyticus* para orientarse con respecto a gradientes químicos [Xie et al. (2011)].

Las características del movimiento celular implican que, en ausencia de algún campo externo que rompa la simetría espacial, todos los microorganismos tienden a ocupar el espacio que habitan de manera homogénea, haciéndose preciso diseñar estrategias específicas si se desea controlarlos. La distribución uniforme de distintas poblaciones puede ser alterada de diversas maneras, ya sea en presencia de gradientes químicos, térmicos o lumínicos, por la influencia de la gravedad, o, incluso, por el campo magnético terrestre [Blakemore (1975); Dunin-Borkowski et al. (1998)]. Por otra parte, se conoce desde hace tiempo la tendencia de algunos microorganismos a nadar en la proximidad de paredes planas [Rothschild (1963); Berke et al. (2008); Li y Tang (2009)]. Esta última propiedad

fue empleada por primera vez por Galajda para controlar pasivamente el movimiento de una población de bacterias *E. coli*, sin la necesidad de aplicar gradientes químicos ni de generar flujos en el fluido [Galajda et al. (2007)]. Para lograrlo, Galajda y sus colaboradores construyeron un contenedor cuadrado de tan solo $400\ \mu\text{m}$ de lado y $20\ \mu\text{m}$ de profundidad, utilizando técnicas de microlitografía blanda. Este contenedor fue dividido a su vez en dos regiones separadas entre sí por una barrera de obstáculos con forma de V (figura 1.1a). Gracias a la tendencia de las células a moverse a lo largo de las paredes, los obstáculos facilitan su paso de un lado al otro del contenedor y lo dificultan en sentido contrario, dando lugar a un gradiente de concentración. Esta técnica fue posteriormente perfeccionada por medio de una nueva geometría (figura 1.1b) capaz de aumentar hasta en 180 veces la concentración inicial de células y localizarlas en el espacio de acuerdo a un patrón predeterminado [Kim et al. (2010)]. Basado en ideas similares, Hulme consiguió fabricar un dispositivo que separa bacterias *E. coli* de acuerdo a su tamaño (figura 1.1c). El tamaño de estas bacterias se encuentra correlacionado con su tiempo de vida, con lo cual el dispositivo puede utilizarse potencialmente para sincronizar poblaciones de acuerdo a sus edades [Hulme et al. (2008)]. Finalmente, cabe destacar el trabajo de Sokolov, en el que la interacción de bacterias con paredes fue aprovechada para propulsar motores microscópicos (figura 1.1d) [Sokolov et al. (2010)].

El trabajo de Galajda no sólo produjo nuevos aportes interesantes relacionados con dispositivos para controlar el movimiento de microorganismos, como se mencionó previamente, sino que dio lugar, también, a una serie de investigaciones teóricas [Tailleur y Cates (2009); Wan et al. (2008); Reichhardt et al. (2011); Drocco et al. (2012); Kaiser et al. (2012)]. La mayor parte de los resultados que se presentan en esta tesis fueron obtenidos en base a una extensión del modelo de Wan, cuyo trabajo fue sin dudas una importante motivación para toda la tesis [Wan et al. (2008)]. En el **capítulo 5** se presentará una extensión al modelo de Wan que permite obtener, empleando parámetros realistas, una dinámica mucho más cercana a la que se observa experimentalmente. El modelo es empleado para estudiar la influencia de los parámetros dinámicos específicos de distintos nadadores sobre el direccionamiento en una geometría como la introducida por Galajda y también la influencia de los parámetros geométricos del contenedor. El **capítulo 6** hace uso de los resultados obtenidos en el capítulo 5 para evaluar la posibilidad de separar poblaciones de bacterias en base a diferencias en sus parámetros dinámicos. Finalmente, el **capítulo 7** presenta los resultados que se obtuvieron, aplicando la técnica usada por Galajda, para controlar el movimiento de espermatozoides humanos. En este último caso se contó con acceso directo a observaciones experimentales. El **capítulo 8** resume las conclusiones de la tesis en conjunto y propone posibles extensiones futuras.

1.2. Mecanismos de propulsión de micronadadores

Toda la vida en la tierra puede ser clasificada en dos grandes grupos, el de las células *eucariotas* que contienen un núcleo en el que almacenan su ADN y el de las *procariotas*,

que no tienen núcleo. Estos dos tipos celulares pueden distinguirse a su vez por el tipo de apéndice que utilizan para propulsarse en medios fluidos. Las células eucariotas, tales como los *espermatozoides* y las *chlamydomonas*, cuentan con flagelos flexibles que pueden ser deformados activamente por la propia célula para producir un impulso. La deformación se produce gracias al trabajo de motores moleculares distribuidos a lo largo del apéndice, cuya acción coordinada produce una onda que viaja alejándose del cuerpo celular e impulsando a la célula en dirección contraria. A diferencia de los flagelos de las células eucariotas, los flagelos de las células procariotas, tales como la bacteria *E. coli*, son mucho más delgados y semirrígidos, su forma es helicoidal y giran gracias a la conexión con un motor rotatorio que se encuentra anclado a la pared celular. A continuación se describe el mecanismo de propulsión y el tipo de movimiento desarrollado por las bacterias *E. coli*, *espermatozoides* y algunos nadadores artificiales de reciente fabricación.

1.2.1. Escherichia Coli

Las bacterias *E. coli* son un tipo de bacteria ampliamente estudiada y cuyas propiedades de movimiento son bien conocidas, por lo cual se las escogió como uno de los casos de estudio para esta tesis. Estas bacterias tienen un cuerpo aproximadamente cilíndrico de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro y $2\ \mu\text{m}$ de largo. Para propulsarse cuentan con flagelos semirrígidos y espiralados cuya longitud es de entre 3 a 5 veces la del cuerpo celular y su diámetro es de apenas $20\ \text{nm}$, aproximadamente 1000 veces más delgados que un cabello humano. Las *E. coli* son bacterias *peritricas*, lo que significa que sus flagelos se encuentran distribuidos a lo largo de toda la superficie celular. Cada uno de los flagelos de la *E. coli* se une con un motor ubicado en la pared de la célula. Estos motores son capaces de girar impulsados por el flujo de protones que es provocado por la diferencia de potencial electroquímico que existe entre el interior y el exterior de la bacteria, y que esta mantiene activamente al costo de consumir energía. Notables por la complejidad de su estructura, los motores bacterianos pueden girar en ambos sentidos, miden aproximadamente $45\ \text{nm}$ de diámetro y son capaces de girar a varios cientos de revoluciones por segundo manteniendo un torque aproximadamente constante a lo largo de un amplio intervalo de velocidades [Berg (2003)].

La estrategia de movimiento de las bacterias *E. coli* y su relación con el seguimiento de gradientes químicos fue dilucidada en gran medida gracias al microscopio diseñado por Howard Berg para seguir su movimiento en 3 dimensiones [Berg et al. (1972)]. Cuando todos los motores giran coordinadamente en sentido antihorario, mirados desde la parte trasera de la célula hacia adelante, los flagelos se agrupan y giran coordinadamente formando una ristra que impulsa a la célula. La rotación de los flagelos agrupados propulsa a la bacteria hacia adelante a una velocidad promedio de $\sim 20\ \mu\text{m}/\text{s}$ durante una corrida, hasta que uno o varios motores invierten su sentido de giro. El cambio del sentido de rotación de uno de los motores alcanza para que los flagelos se desagrupen y produzcan una rotación aleatoria del cuerpo celular, como muestra esquemáticamente la figura 1.2a. Seguidamente, todos los motores vuelven a rotar en sentido antihorario, los flagelos se

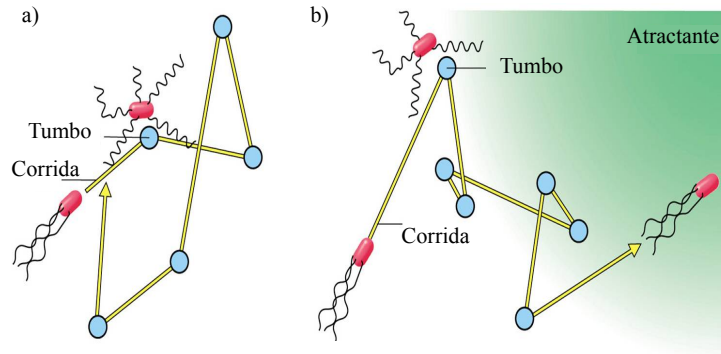


Figura 1.2: Estrategia de movimiento de una bacteria *E. coli*. a) La sucesión de *corridas*, en las que todos los flagelos giran en un mismo sentido, y *tumbos*, producidos por la rotación en sentido contrario de uno o más flagelos, produce una caminata aleatoria que le permite a las bacterias explorar el espacio. b) En presencia de un gradiente químico, las bacterias son capaces de controlar la longitud de las corridas de modo tal de aproximarse progresivamente a la fuente del atrayente.

reagrupan y la célula comienza a moverse nuevamente hacia adelante en una nueva dirección. La alternancia entre estos dos modos de propulsión conduce a las bacterias a lo largo de una caminata aleatoria tridimensional. Berg encontró en sus experimentos que la duración de las corridas corresponde a una distribución de Poisson, mientras que la distribución de ángulos que la célula gira en cada tumbo es aproximadamente gaussiana, con su valor medio ubicado en ángulos diferentes para distintos mutantes de la *E. coli*. Berg fue capaz de determinar, además, que las bacterias prolongan las corridas cuando detectan que se mueven en el sentido creciente de un gradiente químico atractivo, sin variar la distribución de rotaciones, lo que modifica la caminata aleatoria y conduce a las células hacia la fuente del atrayente, figura 1.2b.

1.2.2. Espermatozoides

Existe una notable variabilidad morfológica entre los espermatozoides de distintas especies. La longitud del flagelo de un espermatozoide puede variar desde los $35 \mu\text{m}$ en los hipopótamos hasta los $260 \mu\text{m}$ en algunos roedores [Cummins y Woodall (1985)]. En el caso de los espermatozoides humanos, que serán los únicos estudiados en esta tesis, la cabeza mide $5 \mu\text{m}$ y el flagelo aproximadamente $55 \mu\text{m}$. Aunque la frecuencia con la que oscila el flagelo es muy dependiente de las características del fluido en la que se encuentra inmerso [Yeung et al. (1994); Smith et al. (2009)], normalmente se encuentra en el rango de $10\text{--}20 \text{ Hz}$. Por otra parte, la cabeza de los espermatozoides no es estrictamente esférica, y de hecho se ha determinado, mediante estudios comparativos empleando espermatozoides de distintas especies, que la asimetría de la cabeza juega un rol importante en la tendencia

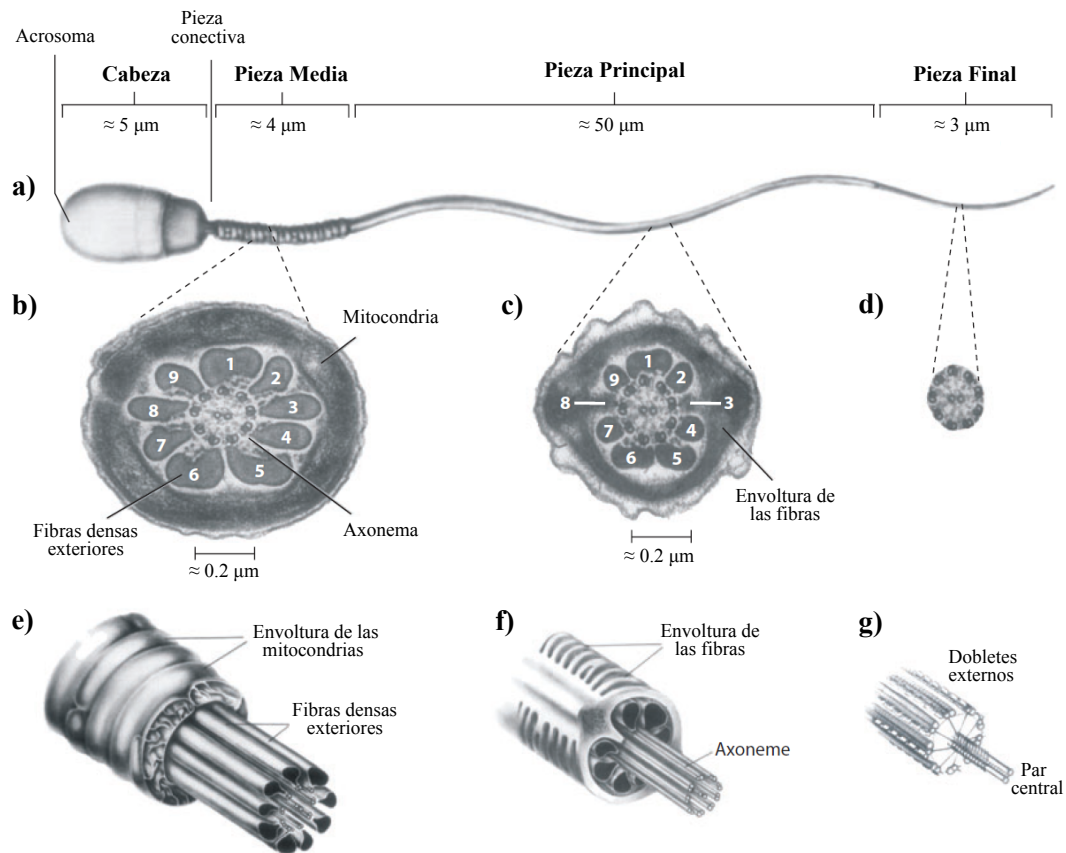


Figura 1.3: Ilustración de un espermatozoide, extraída de [Gaffney et al. (2011)], que incluye la estructura interna del flagelo. a) Distintas regiones del flagelo, con sus longitudes correspondientes aproximadamente a espermatozoides humanos. b) Sección transversal de la pieza media (mirada desde la cabeza hacia la punta del flagelo), en la que se pueden ver las 9 fibras densas que recubren a los dobletes microtubulares que componen el *axonema*. Esta región del flagelo, que puede verse también en el panel (e), está recubierta por mitocondrias encargadas de generar el ATP necesario para el funcionamiento de las dineínas. Los paneles (c) y (f) muestran la estructura de la pieza principal del flagelo, en la que las fibras 3 y 8 se desplazan radialmente hacia afuera. En esta parte del flagelo ya no hay mitocondrias. El flagelo se hace cada vez más delgado a medida que se aleja de la cabeza, estando su parte final compuesta únicamente por el axonema, como se ve en (d) y (g). El axonema a su vez está compuesto por 9 pares de microtúbulos distribuidos radialmente en torno a 2 microtúbulos centrales, en una estructura conocida como 9+2.

de estas células a nadar en la proximidad de paredes sólidas [Woolley (2003); Smith y Blake (2009)], siendo las cabezas más elongadas las que ofrecen una mayor ventaja en líquidos newtonianos, ya que disminuyen la oscilación de las trayectorias [Gillies et al. (2009)].

El movimiento del flagelo de los espermatozoides se produce gracias a la actuación

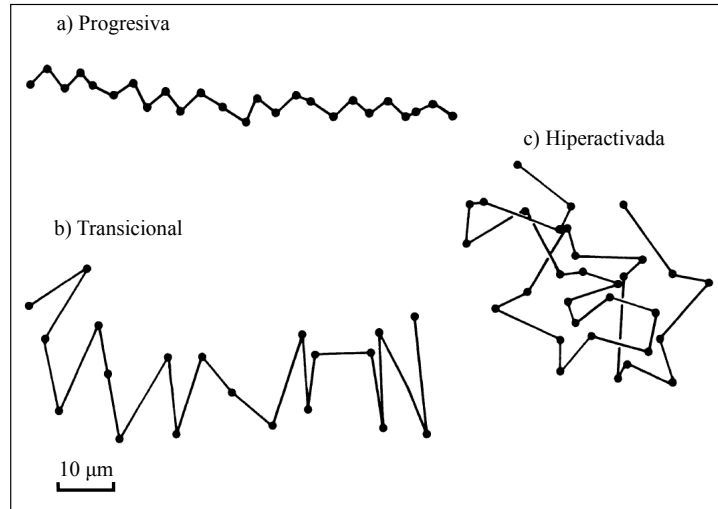


Figura 1.4: Patrones de movimiento de células espermáticas humanas. a) Trayectoria seguida por la cabeza de una célula en estado *lineal* o *progresivo*, b) *transicional* y c) *hiperactivada*. Imagen extraída y modificada de [Mortimer y Mortimer (1990)].

coordinada de motores moleculares, dineínas, que inducen sus cambios de curvatura. La estructura que hace este movimiento posible es bastante compleja, tal como puede verse en la figura 1.3. A diferencia de lo que ocurre con el flagelo de las bacterias, que es propulsado por un único motor ubicado en su base, en el caso de los espermatozoides las tensiones producidas por las dineínas se hallan distribuidas a lo largo de todo el flagelo y deben sincronizarse para producir una deformación adecuada. Existe una abundante cantidad de trabajos dirigidos a comprender la relación entre la estructura del flagelo, las tensiones producidas por los motores moleculares y las interacciones hidrodinámicas con el fluido, que dan como resultado la propagación de ondas adecuadas para la propulsión celular [Hines y Blum (1978); Brokaw (1999, 2009); Lindemann (1994, 2004); Riedel-Kruse et al. (2007)].

De los millones de espermatozoides que son depositados por el hombre en el tracto genital femenino, sólo unos pocos consiguen ingresar a las trompas de Falopio [Williams et al. (1993)], y de estos, únicamente un pequeño porcentaje se encuentra en condiciones de fertilizar el óvulo. Sólo recientemente se han comenzado a estudiar, en espermatozoides de mamíferos, los mecanismos quimiotácticos que permiten a estas células orientarse [Eisenbach y Giojalas (2006)]. Durante su camino en busca del óvulo, los espermatozoides atraviesan un proceso de maduración conocido como *capacitación*, por medio del cual se preparan para atravesar el cúmulo de células que lo rodean. Además, sólo las células capacitadas pueden llevar a cabo la *reacción acrosómica* que les permite fundirse con la membrana celular del óvulo [Brewis et al. (2005)]. La quimiotaxis de espermatozoides de mamíferos posiblemente sea más complicada que la de espermatozoides de otras especies, involucrando la presencia de más de un atractor [Ralt et al. (1991)] y estando combinada

a su vez con *thermotaxis* [Bahat et al. (2003)].

Los espermatozoides humanos capacitados presentan distintos patrones de movimiento, que generalmente pueden ser clasificados como *lineales* o *progresivos*, *transicionales* e *hiperactivados*, según sea la trayectoria seguida por la cabeza [Mortimer et al. (1996)] y el movimiento de sus flagelos [Mortimer et al. (1997)]. Se considera que la hiperactivación es necesaria para que sea posible la fertilización, con lo cual una determinación precisa de la proporción de espermatozoides hiperactivados en una preparación *in-vitro* puede representar una prueba de la función celular importante a la hora de determinar problemas de fertilidad masculina. Los parámetros empleados convencionalmente para determinar el tipo de movimiento corresponden a la *Amplitud de Cabeceo Lateral* (ALH por su sigla en inglés), y las velocidades *Curvilínea* (VCL) y *Lineal* (VSL) [David et al. (1981)], sin embargo, los avances técnicos permiten en la actualidad determinar el movimiento de estas células con un detalle mucho mayor [Su et al. (2012)]. Como puede verse en la figura 1.4, el movimiento lineal se caracteriza por una amplitud del cabeceo mucho menor a la que se observa en patrones transicionales o hiperactivados. Mientras que la velocidad curvilínea de las células hiperactivadas y transicionales puede duplicar la velocidad curvilínea de las células lineales, sus velocidades de avance promedio pueden ser mucho menores, llegando a ser VSL, para las células transicionales, aproximadamente un 75 % de la VSL de las células lineales y para las hiperactivadas tan solo un 25 % [Mortimer y Mortimer (1990)]. En el capítulo 7 se estudia el direccionamiento de estas células por medio de geometrías de confinamiento apropiadas. La posibilidad de controlar así el desplazamiento conjunto de poblaciones enteras podría resultar un instrumento útil en el estudio de la quimiotaxis espermática.

1.2.3. Nadadores Artificiales

En la última década, distintos laboratorios han conseguido fabricar micronadadores cuyo movimiento puede ser controlado a distancia. Si bien estos desarrollos todavía no se encuentran lo suficientemente maduros como para utilizarse en la resolución de problemas prácticos reales, se espera que en el futuro puedan resultar apropiados en el campo de la medicina como herramienta para realizar microcirugías o también para la distribución de medicamentos en el interior del cuerpo humano directamente sobre tejidos afectados, permitiendo de este modo disminuir las dosis aplicadas.

El primer desarrollo de este tipo fue presentado en el año 2005. Para construir un nadador de aproximadamente $20 \mu\text{m}$ de largo, Dreyfus y sus colaboradores unieron un eritrocito (célula encargada de transportar el oxígeno en la sangre), que cumple el papel de cabeza del nadador, con un filamento construido en base a tiras de ADN y partículas coloidales magnetizadas [Dreyfus et al. (2005)]. Con esta preparación los investigadores pudieron demostrar que, en presencia de un campo magnético variable en el tiempo, se produce una onda de deformación que viaja desde la cabeza hasta la punta de la cola, de modo muy similar a lo que ocurre con un espermatozoide, propulsando al nadador hacia adelante.

Así como el nadador fabricado por Dreyfus produce un movimiento similar al de un espermatozoide, otros desarrollos se asemejan más al tipo de propulsión que impulsa a bacterias como la *E. coli*. Este es el caso propuesto por ejemplo por Gosh y Fischer, quienes en 2009 publicaron un trabajo en el que se muestra el empleo de técnicas de electrodeposición para construir nadadores de dióxido de silicio de tan solo $1 \mu m$ de longitud [Ghosh y Fischer (2009)]. Estos nadadores, que pueden ser construidos en gran número simultáneamente, están formados por una esfera de $\approx 200 nm$ de diámetro sobre los cuales se hace crecer una hélice que hace las veces de flagelo. La fabricación concluye con un recubrimiento ferromagnético sobre el cual se induce un momento magnético permanente, de modo que el nadador gira y se propulsa en presencia de un campo magnético rotativo.

Finalmente, existe una clase de nadadores artificiales que consiguen su autopropulsión en base a reacciones químicas. Estos nadadores están compuestos por dos materiales diferentes, uno es inerte mientras que el otro funciona como un catalizador o como un reactivo para una reacción química. Una vez que la reacción química comienza se genera un gradiente de alguno de los reactantes y esto a su vez produce un desplazamiento del fluido sobre la superficie del nadador, generando en última instancia su propulsión.

Una importante cantidad de trabajo ha sido dirigido a estudiar la eficiencia del movimiento a bajo número de Reynolds [Becker et al. (2003); Avron et al. (2004); Alouges et al. (2009)]. Un conocimiento preciso de la manera en que el mecanismo de propulsión de cada nadador y su movimiento pueden ser optimizados facilitaría el diseño de nadadores artificiales y, también, podría aportar nuevos conocimientos en relación a los procesos evolutivos que permitieron su aparición en el mundo natural. El nadador de Golestanian que presentamos en el capítulo 4 y el estudio de su eficiencia apuntan también en este sentido. Incluso si se trata de un nadador demasiado simple, cuyo movimiento difícilmente podría ser controlado en la práctica, se ha mostrado la posibilidad de utilizarlo en sentido inverso como una microbomba [Leoni et al. (2009)]. Conocer la manera de optimizar el ciclo y las dimensiones del nadador resultaría útil para la fabricación de actuadores de circuitos microfluídicos, además de ser un problema interesante desde el punto de vista teórico.

1.3. Litografía Blanda

La *litografía blanda* es un conjunto de técnicas [Xia y Whitesides (1998); Whitesides et al. (2001)] que permiten fabricar estructuras con patrones micrométricos, haciendo uso de materiales poliméricos. El campo de aplicación de estas técnicas no se restringe a los temas que se trabajan en esta tesis, sino que ofrecen una gran variedad de posibilidades para todo tipo de tecnologías. Su extensa utilización desde finales de los años 90 se debe a que, en comparación con otras técnicas litográficas como la *fotolitografía* y la *litografía electrónica*, su costo es bajo para producciones en serie y también los tiempos de producción implicados son menores. Permite la fabricación sin dificultades de diseños con dimensiones mayores a los $50 \mu m$ (aproximadamente el tamaño de una célula eucariota)

y pueden generarse estructuras multicapas, especiales para la fabricación de componentes para microfluídica. El *Polydimetilsiloxano*, PDMS, es uno de los materiales más utilizados [McDonald y Whitesides (2002)], entre cuyas muchas virtudes cabe destacar que es biocompatible. La litografía blanda también permite manipular las propiedades químicas de las superficies, con lo cual se constituye en una técnica muy importante para realizar ensayos bioquímicos.

La microlitografía blanda ha sido empleada exitosamente para distintos tipos de experimentos químicos y biológicos, además de usarse para la fabricación de dispositivos para el control microscópico de fluidos como válvulas y bombas [Unger et al. (2000); Squires y Quake (2005); Weibel et al. (2007)]. Esta técnica posibilita la generación de gradientes químicos regulables [Dertinger et al. (2001)], el estudio del movimiento de bacterias en constricciones con dimensiones menores al micrómetro [Männik et al. (2009)] y el estudio evolutivo de múltiples cultivos simultáneamente [Shin et al. (2012)]. También fue utilizada para diseñar dispositivos capaces de controlar el movimiento de células cancerígenas [Mahmud et al. (2009); Huang et al. (2011)] y para investigar la competencia entre el direccionamiento basado en obstáculos asimétricos y la orientación quimiotáctica de una población de bacterias provocado por escases de nutrientes [Lambert et al. (2010)]. En el caso particular de esta tesis, la litografía blanda cumple un rol esencial pues fue utilizada en el experimento de Galajda que se toma como referencia para todos los trabajos posteriores, y para la construcción de los contenedores diseñados para dirigir el movimiento de espermatozoides, que se estudian en el capítulo 7.

Capítulo 2

Hidrodinámica de micronadadores

Resumen:

En este capítulo se describen las particularidades dinámicas de un nadador a bajo número de Reynolds. Se introducen nociones fundamentales de la hidrodinámica implicada en el nado y se presenta el teorema de Purcell. Se discute de qué manera a partir de las restricciones impuestas por el teorema surge la idea del nadador de Purcell. Introducimos algunos métodos que posibilitan el estudio numérico del problema, particularmente el método conocido como Dinámica de Stokes.

2.1. Introducción

La física que gobierna el movimiento de nadadores microscópicos es fundamentalmente diferente de aquella a la que estamos acostumbrados a pensar en nuestra vida cotidiana. Las estrategias para nadar desarrolladas por animales acuáticos, por el ser humano, o incluso el funcionamiento de la hélice que propulsa un barco, están todas basadas en comunicar momento al fluido en el que se encuentran. Para organismos con dimensiones típicas de unos pocos micrómetros, en cambio, cualquier intento de acelerar el fluido a su alrededor es inmediatamente frustrado, disipándose el trabajo en forma de calor. Por este motivo, los microorganismos han desarrollado estrategias que les permiten moverse eficientemente, sobreponiéndose a la fuerza viscosa y aprovechando el arrastre provocado por el medio.

En este capítulo se describe el marco teórico necesario para estudiar la autopropulsión de objetos microscópicos sumergidos en un líquido.

2.2. Flujos a Bajo Número de Reynolds

2.2.1. Ecuación de Navier-Stokes

Las fuerzas y torques debidas al fluido, que actúan sobre un cuerpo sumergido, pueden calcularse a partir del campo de flujo \mathbf{u} y el campo de presiones p a su alrededor. Si el fluido es newtoniano e incompresible, estos campos pueden obtenerse resolviendo la ecuación de Navier-Stokes

$$\rho \left(\frac{\partial}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \right) \mathbf{u} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{u}, \quad \nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (2.1)$$

junto con las condiciones de contorno apropiadas. Suponiendo que el fluido no puede deslizar sobre la superficie de los nadadores, su velocidad sobre esta es igual a la velocidad con que se mueve dicha superficie, determinando la condición de contorno correspondiente (“no-slip”). Una vez conocidos \mathbf{u} y p , es posible construir el tensor de estrés $\sigma = -p\mathbf{I} + \eta[\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T]$ a partir del cual la fuerza \mathbf{F} y el torque \mathbf{L} que actúan sobre el nadador pueden obtenerse integrando sobre su superficie

$$\mathbf{F} = \iint_S \sigma \cdot \mathbf{n} dS, \quad \mathbf{L} = \iint_S \mathbf{x} \times (\sigma \cdot \mathbf{n}) dS \quad (2.2)$$

donde \mathbf{x} recorre la superficie S y \mathbf{n} es el vector unitario normal a S que apunta hacia el fluido.

2.2.2. Régimen de Stokes

El número de Reynolds (Re) es un indicador adimensional que permite cuantificar las características del flujo resultante de la solución de la ecuación 2.1. Si el número de Reynolds es mucho mayor que 1 el fluido se encuentra en un régimen turbulento, mientras que $Re \ll 1$ corresponde a un régimen laminar. El número de Reynolds se calcula como $Re = \rho UL/\eta$, donde ρ es la densidad del fluido, η su viscosidad y U y L la velocidad relativa y longitud típicas relacionadas con el campo de flujo en cuestión. Esta definición surge de comparar los términos inerciales en la ecuación de Navier-Stokes $\sim \rho \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u}$ con la fuerza viscosa por unidad de volumen $\sim \eta \nabla^2 \mathbf{u}$.

Una interpretación interesante del número de Reynolds se encuentra en [Purcell (1976)]. Purcell notó que la cantidad dada por η^2/ρ tiene unidades de fuerza y es característica de cada fluido. En particular, si aplicamos sobre una esfera una fuerza $6\pi\eta^2/\rho$, esta se moverá con $Re = 1$ independientemente de cual sea su tamaño. La velocidad de una esfera de radio a que se mueve en estas condiciones estará dada por $U = \nu/a$, donde ν es la viscosidad cinemática definida como η/ρ . Si tomamos como ejemplo el agua, para la cual $\eta^2/\rho \approx 1 \text{ nN}$ y $\nu \approx 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$, la velocidad de un nadador esférico de radio $a = 1 \text{ m}$ deberá ser $1 \text{ } \mu\text{m}/\text{s}$ para mantener la condición $Re = 1$, mientras que para una esfera de

$a = 1 \mu m$ (dimensión típica de una bacteria *E. coli*) será $1 m/s$. Es evidente a partir de este análisis que el número de Reynolds para bacterias es mucho menor que 1 pues sus velocidades típicas rondan los $30 \mu m/s$. Es fácil comprobar, de hecho, que para una bacteria *E. coli* $Re \approx 10^{-5} - 10^{-4}$ y para un espermatozoide humano $Re \approx 10^{-2}$. Si $Re \ll 1$, el movimiento de un cuerpo es determinado completamente a cada momento por las fuerzas que actúan sobre el fluido en ese mismo instante, en otras palabras, la dinámica no guarda ninguna memoria de los eventos pasados. Siendo los números de Reynolds tan pequeños para el movimiento de microorganismos, los términos inerciales en la ecuación 2.1 pueden despreciarse (estrictamente esto es cierto en el límite $Re = 0$) y la ecuación para el flujo toma una forma más sencilla conocida como ecuación de Stokes,

$$\nabla p = \eta \nabla^2 \mathbf{u}, \quad \nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (2.3)$$

En este límite, la ecuación para el flujo resulta lineal e independiente del tiempo, dos condiciones con importantes consecuencias para el movimiento de nadadores microscópicos, como se verá más adelante. Otra propiedad importante de los flujos en el límite de número de Reynolds pequeño se conoce con el nombre de *teorema recíproco* [Happel y Brenner (1965)], que resulta de gran utilidad para resolver el problema de nadadores autpropulsados [Stone y Samuel (1996)]. Supongamos que tanto \mathbf{u}_1 como \mathbf{u}_2 son soluciones de la ecuación 2.3 en un volumen V definido por la superficie cerrada S . Si los tensores de estrés correspondientes a cada campo de velocidad son σ_1 y σ_2 , entonces el teorema asegura que vale la igualdad

$$\iint_S \mathbf{u}_1 \cdot \sigma_2 \cdot \mathbf{n} dS = \iint_S \mathbf{u}_2 \cdot \sigma_1 \cdot \mathbf{n} dS \quad (2.4)$$

2.2.3. Función de Green para la ecuación de Stokes

Gracias a la linealidad de las ecuaciones 2.3, es posible construir la solución de cualquier problema por superposición de una solución fundamental dada por el tensor de Oseen $\mathbf{G}(\mathbf{r})$. El campo de velocidades en un fluido cuya velocidad en el infinito es cero y sobre el cual se aplica una fuerza \mathbf{F} en la posición \mathbf{x}' está dado por $\mathbf{u}(\mathbf{x}) = \mathbf{G}(\mathbf{x} - \mathbf{x}') \cdot \mathbf{F}(\mathbf{x}')$, donde

$$\mathbf{G}(\mathbf{r}) = \frac{1}{8\pi\eta} \left(\frac{\mathbf{I}}{r} + \frac{\mathbf{r}\mathbf{r}}{r^3} \right), \quad r = |\mathbf{r}| \quad (2.5)$$

Análogamente, el campo de presiones puede obtenerse por medio de

$$p(\mathbf{x}) = \mathbf{H}(\mathbf{x} - \mathbf{x}') \cdot \mathbf{F}, \quad \mathbf{H}(\mathbf{r}) = \frac{\mathbf{r}}{4\pi r^3} \quad (2.6)$$

La solución 2.5 representa físicamente el campo de velocidades producido por una fuerza puntual, singular, \mathbf{F} y es conocida con el nombre de *stokeslet* [Kim y Karrila (1991)]. A partir de ella, es posible obtener todas las singularidades para un fluido viscoso por

diferenciación. Mientras que el campo de velocidad producido por un *stokeslet* decae proporcionalmente a $\sim 1/r$, el campo que se obtiene de derivar \mathbf{G} una vez corresponde a un *dipolo* y decae como $\sim 1/r^2$. Una nueva diferenciación conduce a la obtención de *dobletes* y *cuadrupolos* que decaen como $\sim 1/r^3$, y así siguiendo pueden construirse las singularidades de cualquier orden [Chwang y Wu (1975)]. Una distribución apropiada de estas singularidades puede utilizarse para resolver de manera exacta la ecuación de Stokes en distintas geometrías.

2.3. Nadar a bajo número de Reynolds

2.3.1. Movimiento de cuerpos rígidos

Veamos ahora de qué manera podemos determinar la trayectoria de un cuerpo rígido sumergido en un fluido viscoso si este se mueve con un número de Reynolds bajo. Como mencionamos anteriormente, la condición $Re \ll 1$ implica que el movimiento es completamente sobreamortiguado, razón por la cual no hay aceleración y las velocidades resultan proporcionales a las fuerzas. Más precisamente, si sobre el cuerpo actúan una fuerza externa \mathbf{F} y un torque externo \mathbf{L} , entonces sus velocidades de translación \mathbf{U} y de rotación $\mathbf{\Omega}$ estarán relacionadas por medio de la ecuación matricial

$$\begin{pmatrix} \mathbf{F} \\ \mathbf{L} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{A} & \mathbf{B} \\ \mathbf{B}^T & \mathbf{C} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \mathbf{U} \\ \mathbf{\Omega} \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

o por su inversa

$$\begin{pmatrix} \mathbf{U} \\ \mathbf{\Omega} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{M} & \mathbf{N} \\ \mathbf{N}^T & \mathbf{O} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \mathbf{F} \\ \mathbf{L} \end{pmatrix}. \quad (2.8)$$

La matriz en la ecuación 2.7 es la matriz de *resistencia* del cuerpo y su inversa en 2.8 es la matriz de *movilidad*. La condición de bajo número de Reynolds implica que estas matrices deben ser simétricas [Happel y Brenner (1965)]. Por ejemplo, para una esfera de radio R , los elementos de la matriz de movilidad están dados por $\mathbf{M} = (6\pi\eta R)^{-1}\mathbf{I}$ y $\mathbf{O} = (8\pi\eta R^3)^{-1}\mathbf{I}$, mientras que los elementos de \mathbf{N} se anulan por simetría. Para geometrías más complejas, determinar los elementos de estas matrices puede resultar sumamente complicado.

Las ecuaciones 2.7 y 2.8 presentan por lo menos tres características con importantes consecuencias para el movimiento de nadadores microscópicos. Primero, las matrices \mathbf{A} , \mathbf{M} , \mathbf{C} y \mathbf{O} no son necesariamente proporcionales a la identidad como en el caso de la esfera y, de hecho, es justamente debido a este tipo de anisotropías que el movimiento de micronadadores es posible. Segundo, para aquellos cuerpos que no cuentan con simetría especular, las matrices cruzadas \mathbf{N} y \mathbf{B} son distintas de cero. Este es justamente el caso para las bacterias que consiguen propulsarse traslacionalmente rotando sus flagelos helicoidales.

Finalmente, estas matrices están involucradas en el teorema de fluctuación-disipación, que relaciona el coeficiente de difusión de un cuerpo en equilibrio térmico a temperatura T con su geometría y con la viscosidad del medio. Así, el coeficiente de difusión traslacional está dado por $D = k_B T \mathbf{M}$ y el coeficiente de difusión rotacional por $D_R = k_B T \mathbf{O}$

2.3.2. Autopropulsión

El problema fundamental de la autopropulsión de microorganismos, desde un punto de vista matemático, es determinar la velocidad de desplazamiento \mathbf{U} de un nadador conociendo la velocidad de deformación $\mathbf{u}_s(t)$ de su cuerpo. A cada instante de tiempo, el nadador se desplaza con velocidad lineal \mathbf{U} y velocidad angular $\mathbf{\Omega}$, de modo tal que la velocidad de un punto ubicado en \mathbf{x} sobre su superficie se moverá con una velocidad $\mathbf{u} = \mathbf{U} + \mathbf{\Omega} \times \mathbf{x} + \mathbf{u}_s$. Esta ecuación determina la condición de contorno apropiada para resolver las ecuaciones 2.3, a lo que debe agregarse la condición de que las fuerzas y torques totales ejercidas por el fluido sumen cero, en ausencia de fuerzas externas. La dificultad de este problema radica en que las velocidades que se pretenden determinar, \mathbf{U} y $\mathbf{\Omega}$, son necesarias para definir las condiciones de contorno.

Debido a las complicaciones mencionadas en el párrafo anterior, se han propuesto en el pasado estrategias que simplifican el problema y resultan útiles para mejorar la comprensión de ciertos casos en particular. Un ejemplo relevante desde el punto de vista histórico corresponde al trabajo de Gray y Hancock, que permitió explicar por primera vez en términos cuantitativos el mecanismo de propulsión de los espermatozoides [Hancock (1953); Gray y Hancock (1955)]. El abordaje usado por estos autores se conoce en inglés como *Resistive Force Theory* y se basa en el hecho de que para un cilindro alargado, el coeficiente de arrastre tangencial C_T es diferente al coeficiente de arrastre normal C_N , y de hecho es posible demostrar que, en el límite en el que el radio del cilindro tiende a cero, el cociente $C_N/C_T \approx 2$. En base a esta anisotropía los autores demostraron que, incluso cuando el movimiento del flagelo está dado por una oscilación periódica, el mismo produce una fuerza de propulsión no nula, provisto que el radio de curvatura del flagelo sea mucho más grande que el radio del mismo. Una versión más refinada de esta teoría se conoce como *Slender Body Theory*, cuyas bases se encontraban implícitas ya en el trabajo mencionado de Hancock del año 1953. En este caso, la idea es reemplazar al flagelo por una serie de fuerzas puntuales localizadas a lo largo de la línea central del flagelo. El campo de velocidades que estas fuerzas imprimen sobre el fluido se puede calcular como una suma pesada de las mismas, mientras que los pesos para cada fuerza puntual se determinan imponiendo la condición de que la velocidad del fluido en el punto de aplicación de cada fuerza sea igual a la velocidad con la que se mueve el flagelo en el punto de aplicación de dicha fuerza. Para una introducción actual a estas teorías ver [Lauga y Powers (2009); Gaffney et al. (2011)].

Una notable simplificación del problema, aplicable a casos más generales, fue introducida por Stone y Samuel utilizando el *teorema recíproco* expresado en la ecuación 2.4. El método desarrollado por estos dos investigadores presenta la gran ventaja de relacionar de

manera directa la velocidad de movimiento \mathbf{U} y la velocidad angular $\mathbf{\Omega}$ del nadador con su velocidad de deformación $\mathbf{u}_s(t)$, sin que sea necesario calcular los campos \mathbf{u} y p en todo el espacio [Stone y Samuel (1996)]. Recordemos que este teorema relaciona los campos de velocidad y presión para dos problemas independientes que involucran al mismo cuerpo. Sean \mathbf{U} y $\mathbf{\Omega}$ las velocidades traslacionales y angulares que nos interesa determinar para un cuerpo que se deforma con velocidad $\mathbf{u}_s(t)$, mientras que $\hat{\mathbf{U}}$ y $\hat{\mathbf{\Omega}}$ son las velocidades de un problema dual que corresponde al mismo cuerpo, con exactamente la misma forma instantánea $S(t)$ pero que se mueve rígidamente (es decir, $\hat{\mathbf{u}}_s(t) = 0$) impulsado por una fuerza $\hat{\mathbf{F}}$ y un torque $\hat{\mathbf{L}}$. Con estos elementos es posible demostrar la validez de la siguiente ecuación:

$$\hat{\mathbf{F}} \cdot \mathbf{U} + \hat{\mathbf{L}} \cdot \mathbf{\Omega} = - \iint_S \mathbf{u}_s \cdot \hat{\boldsymbol{\sigma}} \cdot \mathbf{n} dS \quad (2.9)$$

En donde $\hat{\boldsymbol{\sigma}}$ corresponde al campo de tensiones que el fluido produce sobre el cuerpo en el problema dual.

2.3.3. El teorema de Purcell

Debido a que la ecuación de Stokes 2.3 es lineal e independiente del tiempo, el movimiento de cualquier cuerpo a bajo número de Reynolds es *cinemáticamente reversible*. Esto quiere decir que si se multiplica la velocidad de movimiento del cuerpo por un factor α , los campos de velocidad y presión del fluido se multiplicarán por el mismo factor conservando su forma y por lo tanto las fuerzas y torques que actúan sobre el cuerpo también escalarán idénticamente. En particular, si $\alpha = -1$, las velocidades y fuerzas cambiarán de sentido pero las líneas de campo permanecerán inalteradas. Tal como notara Purcell, esta propiedad tiene dos consecuencias importantes para el movimiento de microorganismos y nadadores microscópicos en general [Purcell (1976)]. La primera es que la distancia que un cuerpo se desplaza deformando su superficie depende únicamente de la secuencia de formas por las que pasa el cuerpo del nadador, independientemente de la velocidad con la que se deforma. Esta característica del movimiento a bajo número de Reynolds implica que muchos aspectos del nado pueden investigarse en términos estrictamente geométricos [Shapere y Wilczek (1987, 1989); Yariv (2006); Avron y Raz (2008)].

La segunda consecuencia de la reversibilidad cinemática es el *Teorema de Purcell* que en inglés se conoce como *Scallop Theorem* debido a que Purcell ilustró las consecuencias de su teorema mostrando la imposibilidad de que un molusco similar a una ostra, que consigue propulsarse abriendo y cerrando sus valvas o caparazón, pudiera nadar en un régimen de número de Reynolds bajo [Purcell (1976)]. La conclusión del teorema es que si la secuencia de formas que atraviesa el nadador de forma periódica es idéntica ante una inversión temporal, entonces es imposible para éste conseguir un desplazamiento distinto de cero en promedio. Es importante resaltar que la condición no implica estrictamente que el movimiento sea invariante ante una inversión temporal, con la misma velocidad de deformación en un sentido y el otro, sino únicamente que la secuencia de formas se vea

igual en ambos sentidos. El teorema impone por lo tanto una fuerte restricción geométrica al tipo de deformaciones útiles para la autopropulsión, excluyendo a todas las posibles *deformaciones recíprocas*.

2.4. Métodos numéricos

La interacción entre estructuras flexibles y fluidos presenta una serie de dificultades para las implementaciones numéricas debido a que las tensiones estructurales producen desplazamientos en la superficie de los cuerpos, afectando el campo de velocidades y presiones del fluido, mientras que estos campos determinan el efecto que el fluido produce sobre el sólido y, por ende, determina también su trayectoria. Existe una gran variedad de métodos desarrollados para resolver este tipo de problemas, entre los que cabe destacar el método conocido en inglés como *Immersed Boundary Method* [Peskin (2002)] del cual puede verse una aplicación al movimiento de microorganismos en el trabajo de Cortez [Cortez et al. (2004)], y el *Boundary Element Method*, que si bien puede usarse también en otro tipo de problemas físicos fuera de la mecánica de fluidos, ha sido utilizado por ejemplo por Ishikawa para estudiar la interacción hidrodinámica entre dos bacterias del tipo *Escherichia coli* [Ishikawa et al. (2007)].

Una alternativa algo diferente fue presentada en años recientes [Swan et al. (2011)], introduciendo algunos cambios sobre el esquema original que desarrollara Brady para investigar propiedades reológicas de suspensiones coloidales [Brady y Bossis (1988)]. Una ventaja significativa del método de Brady es que consigue evaluar las interacciones hidrodinámicas en un sistema de muchos cuerpos en base al conocimiento analítico de la interacción entre dos esferas, y sin necesidad de determinar los campos de velocidad y presión en todo el fluido. Estas características convierten a la *Dinámica de Stokes* en un método muy eficiente para estudiar sistemas formados por esferas. Las modificaciones introducidas por Swan abrieron la puerta para la aplicación de este método al movimiento de microorganismos, dando la posibilidad de construir cuerpos flexibles en base a esferas. Con estas características, la Dinámica de Stokes se adapta perfectamente a nuestras necesidades, para investigar el movimiento del nadador de tres esferas, que se presenta en el capítulo siguiente.

Para investigar la dinámica de poblaciones numerosas de micronadadores bajo confinamiento se siguió el mismo método utilizado por Wan [Wan et al. (2008)]. Este se basa en resolver un sistema de ecuaciones diferenciales de tipo Langevin para las posiciones de los nadadores [Van Kampen (2007)], incorporando en el término de ruido las fluctuaciones de origen térmico y de las irregularidades del propio mecanismo de propulsión. De esta manera se representa adecuadamente la dinámica sobreamortiguada de los agentes individuales, haciendo abstracción de los detalles hidrodinámicos involucrados en la propulsión y en la interacción entre distintos nadadores y entre nadadores con las paredes que producen el confinamiento. Esta simplificación del problema posibilita la solución, en tiempos razonables, de sistemas formados por miles de nadadores y permite, además, la

evaluación directa de cantidades útiles para el diseño de experimentos.

Capítulo 3

Difusión de microorganismos nadadores

3.1. Introducción

La capacidad de nadar les ofrece a los microorganismos múltiples ventajas adaptativas, como la posibilidad de formar colonias, buscar alimentos, alejarse de predadores o ambientes nocivos y en el caso de los espermatozoides encontrar la región en donde se encuentra el óvulo para fertilizarlo. En la gran mayoría de los casos, el movimiento de microorganismos no es de tipo lineal puesto que por sus pequeñas dimensiones se encuentran sometidos a las fluctuaciones tanto del ambiente como de sus propios mecanismos de propulsión. El movimiento de los microorganismos es por lo tanto errático y para estudiarlo resulta conveniente investigar sus propiedades difusivas. En este capítulo presentaremos algunas herramientas analíticas que serán de utilidad para analizar los resultados de los capítulos siguientes.

3.2. Difusión

Como mencionamos anteriormente en la sección 2.3.1, el teorema de fluctuación-disipación relaciona el coeficiente de difusión de una partícula sumergida en un fluido a temperatura T con su movilidad en dicho fluido. De esta manera se obtienen, por ejemplo, los siguientes coeficientes de difusión translacional y rotacional para una esfera de radio a en un fluido de viscosidad η :

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}, \quad D_r = \frac{k_B T}{8\pi\eta a^3} \quad (3.1)$$

El valor de estos coeficientes se modifica si la partícula en lugar de dejarse llevar pasivamente por las fluctuaciones térmicas cuenta con algún medio de autopropulsión, con sus propias irregularidades, o es movida por un campo externo. El coeficiente de

difusión puede verse alterado, además, por la estrategia de movimiento particular que sigue el nadador. Por ejemplo, en el caso de un nadador que sigue una estrategia de corridas y tumbos, como es el caso de la *E. coli*, la difusión dependerá de la duración de las corridas y del ángulo que gira en un tumbo. Repasamos a continuación algunos de los métodos que se han empleado en el pasado para resolver analíticamente este tipo de problemas.

3.2.1. Caminatas aleatorias con persistencia

En un artículo publicado algunos años después de los primeros experimentos de Berg en relación a la quimiotaxis de bacterias *E. coli*, Lovely y Dahlquist desarrollaron un modelo teórico para investigar las consecuencias que el comportamiento microscópico de las bacterias tiene sobre cantidades macroscópicas medibles en el laboratorio [Lovely y Dahlquist (1975)]. La construcción de su modelo se basó en los siguientes supuestos:

1. La trayectoria de una bacteria se compone de una secuencia de tramos rectos unidos por giros instantáneos. Cada tramo se caracteriza por tener una dada velocidad, dirección y duración.
2. La velocidad es constante y siempre la misma para todos los tramos.
3. Cuando una bacteria gira, selecciona un ángulo de rotación con una distribución acimutalmente simétrica con respecto a la dirección de movimiento previa al giro.
4. El ángulo entre dos direcciones de movimiento consecutivas está gobernado por una distribución independiente de cualquier tipo de información, tal como la dirección o la duración de la corrida previa al giro.
5. La duración de cada corrida está gobernada por una distribución de probabilidad que puede depender de la dirección de movimiento, si hay un gradiente de una sustancia disuelta en el fluido, pero de ninguna otra información.
6. Cualquiera sea la dirección de movimiento, la función densidad de probabilidad de la duración de cada corrida es una exponencial decreciente.

En base a estas hipótesis, los autores calcularon el coeficiente de difusión de una bacteria identificando el desplazamiento cuadrático medio de la bacteria con la distancia que separa los extremos de una cadena polimérica. Si la longitud l de los enlaces de la cadena es constante y lo mismo sucede con el coseno del ángulo entre los enlaces, α , la separación cuadrática media entre los extremos está dada por:

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 \frac{1 + \alpha}{1 - \alpha} \quad (3.2)$$

Aquí n representa el número de enlaces de la cadena [Flory et al. (1969)] y el símbolo $\langle \rangle$ corresponde al promedio sobre todas las configuraciones posibles del sistema. Si se permite a los enlaces tomar diferentes longitudes con una distribución cuyos primeros momentos son $\langle l \rangle$ y $\langle l^2 \rangle$, y a los ángulos variar de modo que ahora el valor medio del coseno entre enlaces es α , entonces:

$$\langle r^2 \rangle = n \langle l^2 \rangle \frac{1 + (2\langle l \rangle^2 / \langle l^2 \rangle - 1)\alpha}{1 - \alpha} \quad (3.3)$$

Ahora bien, recordando que $\langle r^2 \rangle \simeq 2dDt$ para tiempos largos, donde d representa el número de dimensiones del problema y notando que el número de pasos n equivale a t/τ donde τ es la duración media de cada corrida, se obtiene la siguiente ecuación para el coeficiente de difusión:

$$D = \frac{v^2 s (1 + (2\tau^2/s - 1)\alpha)}{2d\tau(1 - \alpha)} \quad (3.4)$$

donde s es la duración media cuadrática de una corrida. Si la condición número 6 del modelo se cumple, es fácil ver que $s = 2\tau^2$, con lo cual el coeficiente de difusión rotacional toma una forma más sencilla dada por:

$$D = \frac{v^2 \tau}{d(1 - \alpha)} \quad (3.5)$$

Para una bacteria que cambia de dirección entre una corrida y la siguiente con un ángulo aleatorio uniformemente distribuido, $\alpha = 0$ y $D = v^2 \tau / d$ lo que corresponde al coeficiente de difusión para una caminata aleatoria regular. Por otro lado, el valor medio del coseno entre corridas, α , es positivo si el nadador tiene una tendencia a seguir moviéndose hacia adelante luego de girar y negativo en caso contrario. Para la *E. coli*, $\alpha \simeq 0,33$. Si tomamos $v = 14,2 \mu\text{m}/\text{s}$ y $\tau = 0,86 \text{ s}$ obtenemos $D \simeq 130 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Un mutante que cambia muy frecuentemente de dirección tendría una constante de difusión pequeña porque τ también lo sería. Podemos calcular también el coeficiente de difusión para una bacteria del mismo tamaño, pero incapaz de autopropulsarse, por medio de la Ec. 3.1, obteniéndose $D \simeq 0,25 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Esto representa un coeficiente de difusión 3 órdenes de magnitud menor que en el caso autopropulsado, lo que demuestra que la influencia de las fluctuaciones térmicas sobre la difusión *traslacional* de este tipo de bacterias es despreciable. Se verá, sin embargo, que el efecto térmico puede producir un efecto mucho más notorio al alterar la dirección de la trayectoria (en lugar de la posición del nadador), involucrando una difusión de tipo *rotacional*.

Cuanto mayor es la longitud de las corridas, más importante se vuelve el efecto de la difusión rotacional sobre la trayectoria. Eventualmente, la aproximación de que las corridas son rectas deja de ser válida porque las fluctuaciones que afectan a la dirección se encargan de rotar al nadador gradualmente. En el caso extremo de un mutante que nada sin tumbos, decimos que el movimiento de la bacteria está condicionado por la difusión

rotacional [Berg (1993)], sin la cual la bacteria se movería simplemente en una línea recta a velocidad constante. Es posible analizar esta situación partiendo de la ecuación 3.5 en el límite en que la duración de las corridas tiende a cero y el ángulo $\Delta\varphi$ entre una corrida y la siguiente también se hace muy pequeño. En efecto, para $\Delta\varphi \ll 1$ podemos aproximar $\cos(\Delta\varphi) \simeq 1 - (\Delta\varphi)^2/2$, de modo que $1 - \alpha = 1 - \langle \cos(\Delta\varphi) \rangle \simeq D_r\tau$. El coeficiente de difusión toma entonces la siguiente forma:

$$D = \frac{v^2}{dD_r} \quad (3.6)$$

En la presencia de fluctuaciones direccionales importantes la difusión translacional es reducida debido a los frecuentes cambios en la dirección del movimiento. Usando la ecuación 3.1 para una esfera de radio $1 \mu m$ a una temperatura de $25^\circ C$ se obtiene un coeficiente de difusión rotacional para la bacteria de aproximadamente $0,2 \text{ rad}^2/s$, con lo cual, considerando una velocidad promedio de $14,2 \mu m/s$ obtenemos un coeficiente de difusión $D = 200 \mu m^2/s$. Como cabía esperar, el coeficiente de difusión translacional de mutantes incapaces de dar tumbos es algo mayor que el de bacterias que siguen una estrategia de corridas y tumbos. Sin embargo, esta afirmación podría dejar de ser cierta si la difusión rotacional es suficientemente grande, tal como señala la ecuación 3.6.

El efecto de la difusión rotacional sobre la difusión total de un nadador puede ser significativa incluso si el nadador sigue una estrategia de corridas y giros. La figura 3.1 muestra claramente que considerar a las corridas como segmentos rectos es una aproximación válida sólo a primer orden. Para estudiar el efecto de las fluctuaciones sobre la dirección de nadadores que si dan tumbos es necesario seguir un procedimiento diferente al de Lovely y Dahlquist, como veremos a continuación.

3.2.2. Difusión con corridas curvas

Como se mencionó previamente, un aspecto importante a tener en cuenta acerca de los tramos de la trayectoria de una bacteria que corresponden a las corridas, es que no son estrictamente rectos. Sujeta a una constante difusión rotacional, la célula cambia ligeramente su dirección de movimiento debido a las fluctuaciones térmicas y a irregularidades en su mecanismo de propulsión. Si, pensando en dos dimensiones, designamos por φ la dirección de movimiento del nadador a un dado tiempo con respecto al eje x , el cambio medio en la dirección de una bacteria a lo largo de una corrida puede estimarse como $\sqrt{\langle \varphi^2 \rangle} = \sqrt{2D_r t}$, mientras que el coeficiente de difusión rotacional térmica puede aproximarse como el correspondiente a una esfera de radio a : $D_r = k_B T / 8\pi\eta a^3$. Tomando $a = 1 \mu m$ y la viscosidad dinámica del agua a 25° , $\eta \sim 0,9 \text{ Ns/m}^2$, obtenemos una rotación media de aproximadamente 34° en un segundo, que es la duración media de una corrida. Notablemente este resultado es una muy buena aproximación a las observaciones experimentales [Berg et al. (1972)], lo que implica que las fluctuaciones térmicas parecen ser suficientes para explicar la difusión rotacional observada en bacterias, sin necesidad de tener en cuenta las posibles fluctuaciones debidas al propio mecanismo de propulsión.

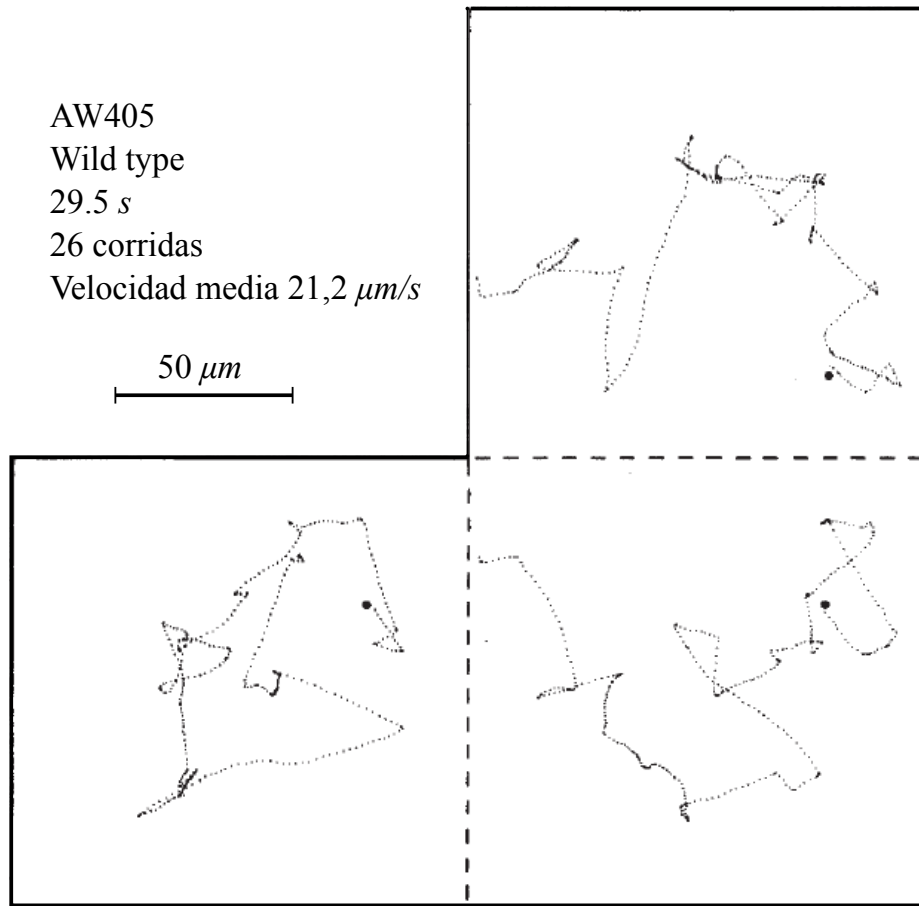


Figura 3.1: Trayectoria en tres dimensiones de una bacteria *E. coli* publicada por Berg [Berg et al. (1972)]. Cada uno de los paneles representa la proyección del movimiento sobre los distintos planos ortogonales de referencia.

Es interesante notar que el tamaño de las fluctuaciones provocadas por efectos térmicos sobre la dirección del movimiento aumenta mientras menor es el tamaño de los nadadores. Por ello las bacterias pequeñas deben moverse con gran rapidez de manera de derrotar a las fluctuaciones rotacionales y lograr desplazamientos sustanciales en cortos períodos de tiempo. Si consideramos además que la cantidad de energía disponible para el movimiento es proporcional al tamaño de la célula, es posible comprender que las fluctuaciones imponen a las bacterias de menor porte una presión significativa sobre el consumo energético [Condat et al. (2005); Condat y Di Salvo (2011); Di Salvo y Condat (2012)].

El movimiento translacional de una bacteria durante una corrida puede describirse por medio de una ecuación de Langevin [Condat et al. (2005)] como la siguiente

$$\frac{d\mathbf{v}}{dt} = -\gamma\mathbf{v} + \mathbf{F}(t) + G\hat{\mathbf{n}} \quad (3.7)$$

en donde γ es el coeficiente de fricción de la bacteria, G es la magnitud de la fuerza determinista de propulsión por unidad de masa debida a la rotación de los flagelos y $\hat{\mathbf{n}}$ es un vector unitario paralelo a la dirección de movimiento. La fuerza estocástica \mathbf{F} corresponde a un ruido blanco que cumple $\langle F_i(t)F_j(t') \rangle = A\delta(t-t')\delta_{ij}$. De manera similar, el ángulo instantáneo φ entre la dirección de movimiento y el eje x se ve afectado por un torque estocástico que cumple $\langle h(t)h(t') \rangle = B\Gamma^2\delta(t-t')$, de modo que su evolución está dada por

$$\Gamma \frac{d\varphi}{dt} = h(t) \quad (3.8)$$

A partir de este sistema de ecuaciones es posible calcular la función autocorrelación de velocidades, y con ésta el desplazamiento cuadrático medio utilizando la relación

$$\langle \Delta x^2 \rangle = \int_0^t dt_1 \int_0^t dt_2 \langle v_x(t_1)v_x(t_2) \rangle \quad (3.9)$$

En el límite de tiempos largos el desplazamiento cuadrático medio está dado por $Q_1 = \langle \Delta \mathbf{r}^2 \rangle \simeq 4D_1t$ con el coeficiente de difusión sin giros D_1 dado por

$$D_1 = \frac{k_B T}{m\gamma} + \frac{1}{2D_r} \left(\frac{G}{\gamma} \right)^2 \quad (3.10)$$

La difusión en ausencia de giros de una bacteria es por lo tanto igual a la suma de dos términos, uno correspondiente al movimiento debido a las fluctuaciones térmicas y el otro debido a la autopropulsión. Notando que el cociente G/γ no es otra cosa que la velocidad de avance \bar{v} a lo largo de la corrida podemos ver que el segundo término es equivalente al coeficiente de difusión en ausencia de giros que obtuvimos siguiendo el método de Lovely en la sección anterior, Ec. 3.6. Para la *E. coli* entonces el segundo término es 10^3 veces mayor que el primero, pero esta diferencia podría ser menor para nadadores cuyo tamaño y velocidad fueran más pequeños.

Para incorporar el efecto de los giros provocados por la descoordinación de los flagelos, los autores definen la probabilidad $c(t)$ de que durante un tiempo t no se haya producido ningún giro:

$$c(t) = 1 - \int_0^t p(t') dt' \quad (3.11)$$

donde $p(t) = \exp(-t/\tau)/\tau$ es la distribución de duración de las corridas, equivalente a la suposición 6 del modelo de Lovely. En base a esta definición, el desplazamiento cuadrático medio total del nadador, incluyendo los giros, puede calcularse como

$$Q(t) = c(t)Q_1(t) + \int_0^t p(t')(Q_1(t') + Q(t-t')) dt' \quad (3.12)$$

El primer término en el lado derecho de la ecuación contiene la contribución de las corridas ininterrumpidas, el segundo, la contribución de la primera corrida interrumpida a tiempo $t' < t$ y el último, la contribución de las corridas durante el tiempo $t - t'$ que sigue a la primer interrupción. Es posible resolver esta ecuación recurrente para $Q(t)$ en el espacio de Laplace. Luego de antitransformar y tomando el límite de tiempos muy largos, se obtiene $Q(t) \simeq 4Dt$ donde D es en general una función complicada de todos los parámetros del modelo. Esta función puede simplificarse bastante notando que para una esfera de radio $1 \mu m$ el coeficiente de fricción es aproximadamente $10^7 s^{-1}$, con lo cual se cumple casi siempre que $\gamma\tau \gg 1$. Si este es el caso, el coeficiente de difusión resulta ser aproximadamente

$$D \simeq \frac{1}{2\gamma^2} \left(\frac{2\gamma k_B T}{m} + \frac{G^2 \tau}{1 + D_r \tau} \right) \quad (3.13)$$

Esta expresión puede simplificarse todavía más notando como lo hicimos anteriormente que salvo para nadadores extremadamente lentos el primer término es siempre mucho más chico que el segundo, con lo cual se llega finalmente a la expresión

$$D \simeq \frac{\bar{v}^2 \tau}{2(1 + D_r \tau)} \quad (3.14)$$

Si el coeficiente de difusión rotacional o el tiempo entre giros son pequeños, entonces $D_r \tau \ll 1$ y reobtenemos $D = \bar{v}^2 \tau / 2$ correspondiente al caso de corridas completamente rectas. Por el contrario, si las fluctuaciones de la dirección o la duración de las corridas son muy grandes, entonces $D_r \tau \gg 1$ y obtenemos nuevamente la ecuación 3.6 correspondiente a una difusión translacional determinada por la difusión rotacional.

3.2.3. Difusión de nadadores con torque externo

Para estudiar la difusión de nadadores que siguen trayectorias aproximadamente circulares debido a la presencia de un campo externo, partimos de las siguientes ecuaciones de movimiento:

$$\frac{d\vec{r}(t)}{dt} = v_0 \hat{e}_v = v_0 (\cos(\varphi(t)) \hat{i} + \sin(\varphi(t)) \hat{j}) \quad (3.15)$$

$$\frac{d\varphi(t)}{dt} = \Omega + \sqrt{2D_r} \eta(t) \quad (3.16)$$

Aquí φ es el ángulo formado entre la dirección de avance del nadador y el eje x , Ω es una velocidad angular constante y η una variable aleatoria con distribución gaussiana de media cero y ancho uno. Si las fluctuaciones asociadas a D_r son nulas, el nadador seguirá una trayectoria perfectamente circular de radio $R = v_0 / \Omega$. En caso contrario, para valores de D_r distintos de cero el nadador se moverá sobre una trayectoria aproximadamente circular con pequeñas oscilaciones que la llevarán a moverse difusivamente a tiempos largos.

El desplazamiento cuadrático medio puede calcularse empleando la distribución de probabilidad de transición $P(\Delta\varphi, \tau)$ correspondiente a una distribución gaussiana desplazada del origen [Weber et al. (2011)]

$$\langle |\vec{r}(t) - \vec{r}_0|^2 \rangle = 2v_0^2 \int_0^t (t - \tau) \langle \cos(\Delta\varphi(\tau)) \rangle d\tau \quad (3.17)$$

la cual toma para el caso de un ruido blanco la siguiente forma:

$$\langle |\vec{r}(t) - \vec{r}_0|^2 \rangle = 2v_0^2 \int_0^t (t - \tau) e^{-D_r\tau} \cos(\Omega\tau) d\tau \quad (3.18)$$

Para tiempos cortos, el desplazamiento cuadrático medio presenta un comportamiento balístico oscilatorio, mientras que a tiempos largos el comportamiento pasa a ser difusivo. En este límite se obtiene de la solución de la última ecuación el siguiente coeficiente de difusión [Weber et al. (2011); van Teeffelen y Löwen (2008)]:

$$D = \frac{v_0^2 D_r}{2(D_r^2 + \Omega^2)} \quad (3.19)$$

Para torques nulos, este resultado es equivalente al de la ecuación 3.6, y muestra como la difusión disminuye para torques distintos de cero. Esta relación inversa entre el coeficiente de difusión translacional y la velocidad angular de un nadador circular se debe a que si la velocidad de giro es grande, el nadador tenderá a moverse en círculos de radio pequeños, disminuyendo su capacidad para explorar el espacio.

Capítulo 4

Optimización de un micronadador artificial

Resumen:

En este capítulo se estudian en detalle las propiedades de un nadador simple conformado tan solo por tres esferas que cambian sus posiciones relativas de manera cíclica y no recíproca. Este modelo de nadador se origina como una simplificación del nadador de Purcell de manera tal que facilite su estudio analítico. El uso de simulaciones basadas en Dinámica de Stokes permite investigar cómo los distintos parámetros geométricos del nadador y el tipo de ciclo empleado afectan cantidades relevantes, tales como su velocidad, potencia disipada y eficiencia. Comparamos las simulaciones con predicciones analíticas, encontrando el límite de validez de estas últimas. La conclusión principal de este estudio es que la región de parámetros que optimizan el movimiento del nadador no puede alcanzarse por medio de la aproximación de fuerzas puntuales empleada previamente por otros autores. La eficiencia es estudiada para dos ciclos de movimiento distintos y en función del tamaño de los nadadores.

4.1. Introducción

Como fue discutido en el capítulo anterior, las dimensiones y velocidades que caracterizan al movimiento de nadadores microscópicos imponen condiciones especiales sobre las deformaciones que les permiten desplazarse de un lugar a otro (ver sección 2.3). La naturaleza de este condicionamiento fue enunciada de manera sintética por Purcell, quien al mismo tiempo utilizó con fines didácticos un nadador imaginario para explicar sus ideas [Purcell (1976)]. Este nadador, al que se conoce en la literatura como nadador de Purcell [Lauga y Powers (2009)], está formado por tres cilindros delgados unidos entre sí por dos bisagras, como si se tratara de un cuerpo con dos extremidades. Moviendo alternativamente un brazo a la vez, el nadador de Purcell se deforma rompiendo las simetrías

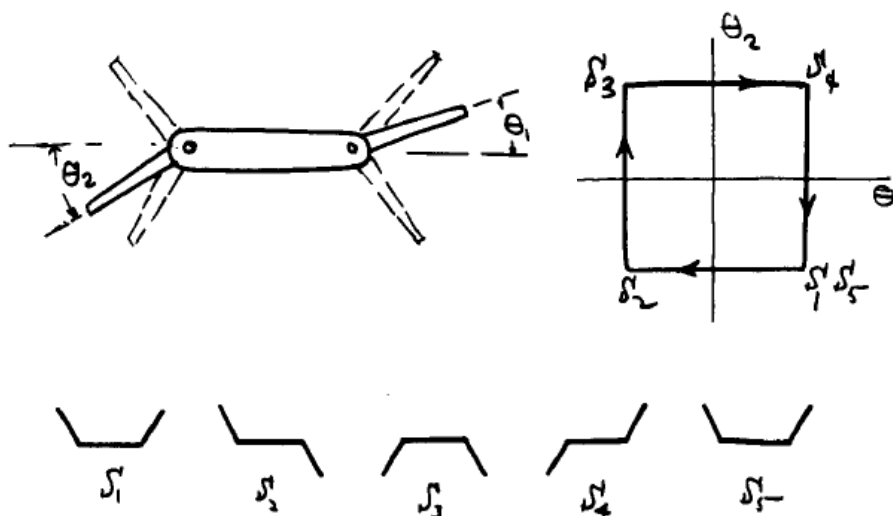


Figura 4.1: Nadador de Purcell formado por tres brazos unidos por dos bisagras. Los ángulos θ_1 y θ_2 cambian alternativamente entre sus valores máximos positivos y negativos produciendo un ciclo cuadrado en el espacio de las fases. Las configuraciones correspondientes a los vértices del ciclo S_1 a S_5 se suceden produciendo el desplazamiento lateral del nadador. (Imagen extraída de [Purcell (1976)]).

espacial y temporal, consiguiendo así autopropulsarse hacia un costado, tal como puede verse esquemáticamente en la figura 4.1. Este nadador fue el primero de muchos otros cuya característica distintiva es la de deformarse contando tan solo con un número finito de grados de libertad [Najafi y Golestanian (2004); Avron et al. (2005); Ledesma-Aguilar et al. (2012); Jalali et al. (2014)], a diferencia de aquellos en los que el cuerpo del nadador se deforma de manera continua [Dreyfus et al. (2005); Cēbers (2005); Gauger y Stark (2006); Roper et al. (2006); Keaveny y Maxey (2008)].

El *nadador de tres esferas*, objeto de estudio de este capítulo, es uno de los descendientes directos del nadador de Purcell. Se trata de un nadador artificial publicado por primera vez en 2004 [Najafi y Golestanian (2004)], el cual está constituido únicamente por tres esferas iguales (más recientemente se han estudiado algunas variantes, como nadadores con esferas de diferentes radios y distintos elipsoides [Pickl et al. (2012)]). Las esferas del nadador se acercan y se separan, desplazándose sobre una línea recta de manera cíclica y no recíproca. La ventaja evidente del nadador de tres esferas sobre el nadador de Purcell es su simplicidad. Al involucrar esferas en lugar de cilindros, y desplazamientos en una sola dimensión, la descripción matemática del nadador propuesto por Najafi y Golestanian resulta más accesible. Esta simplicidad permitió que en [Golestanian y Ajdari (2008)] se llevara a cabo un estudio completo del nadador de tres esferas, resolviendo las ecuaciones de movimiento analíticamente bajo ciertas aproximaciones que se discuten en las secciones

4.2 y 4.3.

Uno de los problemas más interesantes que surgen al estudiar el movimiento de nadadores microscópicos es el de su eficiencia [Becker et al. (2003); Avron et al. (2004); Alouges et al. (2009)]. Debido a que las ecuaciones de Stokes (ecuación 2.3) son independientes del tiempo, un nadador que deforme su superficie dos veces más rápido avanzará el doble en un dado tiempo, de modo que la velocidad no es un buen indicador de la eficiencia del mecanismo de propulsión empleado. Para poder optimizar el tipo de deformaciones implicadas en la autopropulsión de un nadador a bajo número de Reynolds es necesario elegir algún tipo de normalización. Una opción es determinar la distancia que avanza el nadador por período de deformación, con lo cual la optimización se realiza en términos puramente geométricos [Tam y Hosoi (2007)]. La otra alternativa, utilizada en este trabajo, consiste en definir la eficiencia como el cociente entre el trabajo útil obtenido en un ciclo y el trabajo total que hace el nadador para moverse en el interior del fluido [Lighthill (1976)].

Una limitación importante que presenta la aproximación analítica al estudio de la eficiencia del nadador de tres esferas, introducida por [Golestanian y Ajdari (2008)], es que restringe el espacio de configuraciones estrictamente a aquellas en las que la distancia entre las esferas es siempre mucho mayor que su radio. Para optimizar adecuadamente el ciclo del nadador es necesario eliminar esta restricción. Con este objetivo se realizó un estudio del movimiento del nadador por medio de simulaciones de tipo Dinámica de Stokes, DS, (Ver sección 2.4). Esto permitió estudiar el movimiento del nadador incluso cuando las esferas llegan prácticamente a tocarse. Los resultados que se presentan en este capítulo muestran que es justamente en este límite, inaccesible al método analítico, en donde se encuentran los parámetros que optimizan la eficiencia del nadador.

4.2. Descripción del nadador y su movimiento

La geometría del nadador de tres esferas (*NTE* de ahora en más) se describe en la figura 4.2. El *NTE* está constituido por tres esferas de radio a que cambian sus posiciones relativas de forma cíclica, como si estuvieran unidas por dos brazos que se contraen y estiran alternativamente. En lo que sigue se hablará por lo tanto de los *brazos* del nadador en referencia a estos *brazos virtuales*, que ayudan a imaginar el movimiento de las esferas, pero que no interactúan con ningún elemento del sistema. La longitud de cada uno de los brazos, $L_i(t)$, oscila entre un estado completamente contraído de longitud $l - d$ y otro completamente elongado de longitud $l + d$, siendo l la distancia promedio entre los centros de las esferas de los extremos y el de la esfera central, y d la amplitud de la oscilación. Consideraremos dos tipos de ciclos representativos, que llamaremos *ciclo cuadrado* y *ciclo circular* por su forma en el espacio de fases. La diferencia más importante entre estos dos ciclos es que mientras que en el ciclo cuadrado un brazo comienza a moverse con velocidad constante justo después de que el otro se detiene, en el movimiento circular los dos brazos se mueven de manera simultánea y con velocidades variables. En el caso del ciclo cuadrado,

C_a , la velocidad de contracción/expansión es igual a v_a , de modo que la duración de un ciclo completo está dado por $T_a = 8d/v_a$. Para el ciclo circular, C_b , definimos una velocidad angular ω_b tal que la duración de ciclo en este caso es $T_b = 2\pi/\omega_b$.

El desplazamiento del *NTE* es posible gracias a que el arrastre total producido por el fluido depende de la longitud instantánea de sus brazos, siendo mayor la resistencia opuesta al avance si ambos brazos se encuentran extendidos que si uno de ellos está contraído. Para comprender esto resulta útil simplificar un poco más el problema y pensar en un sistema formado únicamente por dos esferas. Si la separación entre las dos esferas tiende a infinito, la interacción entre ellas mediada por el fluido puede considerarse nula. En estas condiciones, la fuerza total externa que será necesario aplicar sobre el sistema para que las dos esferas se muevan con la misma velocidad V será el doble de la fuerza necesaria para impulsar a una sola esfera en ausencia de la otra a la misma velocidad. Es decir, si para mover a una única esfera de radio a con velocidad V es necesario aplicar una fuerza $f = 6\pi\eta aV$, será necesario aplicar una fuerza total igual a $F_T = 2f$ para mover dos esferas infinitamente separadas a la misma velocidad. Si, en cambio, las dos esferas se encuentran separadas por una distancia finita, además del efecto producido por las fuerzas externas, sus movimientos se verán afectados por la interacción que se produce entre ellas a través del fluido. Supongamos que en el centro de cada una de las esferas se aplica una fuerza f paralela a la línea recta que pasa por los centros de las dos esferas, y hagamos coincidir esta dirección con la del eje x de un sistema de coordenadas en reposo. Una de las esferas se encuentra en el origen de coordenadas y la otra a una distancia L . Las líneas de flujo que se producen en el fluido al impulsar la primera esfera en el sentido negativo del eje x se alejan en el sentido en el que es aplicada la fuerza y retornan por el lado opuesto de manera semejante a las líneas de campo de un dipolo eléctrico, produciendo una especie de succión sobre la segunda esfera. Del mismo modo, una fuerza aplicada en el sentido $-x$ sobre la segunda esfera tenderá a impulsar a la primera en la misma dirección en que se aplica la fuerza. Esta descripción intuitiva de lo que ocurre permite ver que la interacción entre las dos esferas facilita mutuamente, en este caso, el avance de cada una de ellas, lo que se traduce en que la fuerza F_T necesaria para que las dos avancen a una velocidad V será menor a $2f$ y tanto más pequeña será cuanto menor sea la distancia L entre ellas.

Existen diferentes métodos para resolver de manera cuantitativa el problema del movimiento de dos esferas en un fluido a bajo número de Reynolds. Sin embargo, se trata de soluciones elaboradas que quedan por fuera de los objetivos de este trabajo [Jeffrey y Onishi (1984)]. Se propone en cambio una solución aproximada del mismo que permite demostrar la validez del razonamiento enunciado en el párrafo anterior y, al mismo tiempo, introducir el método que será empleado en la sección 4.3 para investigar al *NTE*. La idea se basa en considerar que la distancia L entre las dos esferas es suficientemente grande de modo que el efecto causado por una de ellas sobre la otra sea aproximadamente igual al efecto que produciría una fuerza puntual aplicada en el mismo punto. Supongamos que sobre la esfera 1, ubicada en la posición \mathbf{r}_1 , se aplica una fuerza \mathbf{f}_1 . Simultáneamente sobre la esfera 2, ubicada en la posición \mathbf{r}_2 , se aplica una fuerza \mathbf{f}_2 . Si la distancia

$L = |\mathbf{r}| = |\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|$ es suficientemente grande, la velocidad de la esfera 1 estará dada por:

$$\mathbf{v}_1 = \frac{\mathbf{f}_1}{6\pi\eta a} + \mathbf{G}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{f}_2 \quad (4.1)$$

en donde $\mathbf{G}(\mathbf{r})$ es el tensor de Oseen introducido en la sección 2.2. Supongamos ahora que los centros de las esferas se encuentran sobre el eje x y que las fuerzas aplicadas sobre las esferas son paralelas a este eje. Es fácil ver, partiendo de la ecuación 2.5, que:

$$\mathbf{G}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{f}_2 = \frac{f_2}{4\pi\eta(x_2 - x_1)} \quad (4.2)$$

con lo cual se obtienen, tanto para la esfera 1 como para la 2, las siguientes velocidades:

$$\begin{aligned} v_1 &= \frac{f_1}{6\pi\eta a} + \frac{f_2}{4\pi\eta L} \\ v_2 &= \frac{f_1}{4\pi\eta L} + \frac{f_2}{6\pi\eta a} \end{aligned} \quad (4.3)$$

Estas ecuaciones pueden invertirse para obtener las fuerzas f_1 y f_2 en función de las velocidades v_1 y v_2 . Si ahora se impone la condición $V = v_1 = v_2$ es posible hallar la fuerza total $F_T = f_1 + f_2$ que debe aplicarse sobre el sistema, como si se tratara de una única fuerza actuando sobre un cuerpo rígido formado por dos esferas distantes. El resultado es:

$$F_T = 6\pi\eta a \frac{2}{1 + \frac{3a}{2L}} V \quad (4.4)$$

Esta solución, que no es válida para valores pequeños de L , permite ver sin embargo que el arrastre F_T/V es exactamente el doble del arrastre para cada una de las esferas por separado cuando L tiende a infinito, y que su valor se reduce a medida que el cociente L/a disminuye, tal como se había propuesto al principio.

Conociendo esta relación entre el arrastre y la separación de las esferas, podemos retornar al *NTE* para analizar su movimiento. Tomemos como ejemplo el caso de un nadador que contrae sus brazos siguiendo un ciclo cuadrado, tal como se muestra en la figura 4.2. Dado que inicialmente ambos brazos se encuentran extendidos, el centro de masa coincide con el centro de la esfera 2. En el primer intervalo del ciclo, desde (a) hasta (b), el brazo izquierdo se contrae a velocidad constante v_s desde $L_1(t) = l + d$ hasta $L_1(t) = l - d$. Esto no quiere decir que la velocidad de la esfera 1 sea igual a v_s , sino solamente que la diferencia entre las velocidades de las esferas 1 y 2 es v_s . Por otro lado, las esferas 2 y 3 se encuentran unidas rígidamente durante este intervalo, de modo que $v_2 = v_3$. A estas condiciones es necesario agregar que la suma de las fuerzas sobre las esferas debe ser nula, es decir que $f_1 + f_2 + f_3 = 0$, condición que define el movimiento autopropulsado. Estas restricciones en conjunto dan como resultado, durante la contracción del brazo 1, un desplazamiento del *cm* en la dirección $-x$. A continuación,

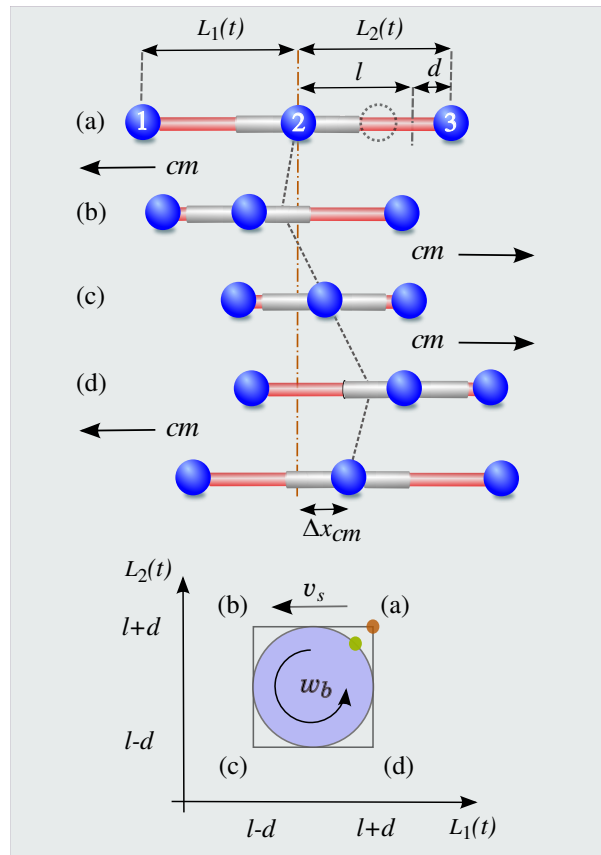


Figura 4.2: Geometría del nadador de tres esferas. Los paneles (a-d) muestran los cambios sucesivos en la configuración del nadador a lo largo de un ciclo cuadrado, comenzando con sus dos brazos estirados. La línea de puntos y rayas muestra la posición inicial del centro de masa del nadador, $x = 0$, y la línea de rayas representa la evolución del centro de masa del nadador, cm , a lo largo del ciclo. En el panel inferior se presenta un esquema de los dos tipos de ciclo investigados, el cuadrado y el circular. La velocidad lineal de contracción y expansión, v_s , y la velocidad angular con que se recorre el ciclo circular, ω_b , caracterizan el movimiento de cada uno de los ciclos. Se ha resaltado con un punto naranja (verde) la configuración inicial adoptada a lo largo de toda la investigación para el ciclo cuadrado (circular).

la contracción del brazo derecho produce un movimiento del cm en la dirección opuesta, pero como las esferas 1 y 2 se encuentran más cerca que las esferas 2 y 3 en el paso anterior, el arrastre que se opone a su movimiento es ahora menor y el avance del cm es en consecuencia mayor. El nadador obtiene de esta manera una pequeña ganancia en la dirección $+x$ debido a esta diferencia en el arrastre (ver figura 4.2 (c)). El movimiento de los brazos en el resto del ciclo produce una ganancia igual a la de la primera mitad, con lo cual el cm se encuentra al finalizar el ciclo a una distancia Δx_{cm} de su posición inicial

(figura 4.2 (d)). Si el ciclo se repite continuamente el *NTE* consigue avanzar de manera sostenida en base sólo a sus propias deformaciones e independientemente de la presencia de campos externos.

4.2.1. Adimensionalización

En las secciones restantes de este capítulo todas las cantidades serán presentadas en las siguientes unidades: distancias, $u_x = a$, tiempos, $u_t = T$, velocidades, $u_v = a/T$, fuerzas, $u_f = \eta a^2/T$, potencias, $u_P = \eta a^3/T^2$, donde $T = T_a = 8d/v_a$ para el ciclo cuadrado y $T = T_b = 2\pi/\omega_b$ para el ciclo circular. Considerando un periodo de 1 s, un radio de $1 \mu m$ y la viscosidad dinámica del agua a $20^\circ C$, $\eta = 0,001$ Pa.s, la unidad de potencia corresponde a $u_P = 10^{-21} W$. Al paso temporal dt empleado en la solución numérica de las ecuaciones lo adaptamos a la duración del ciclo. En el caso del círculo $dt = T/n_0$ donde el número de pasos temporales para completar un periodo es $n_0 = 50000$. En el caso del cuadrado usamos un dt mas chico para resolver bien los puntos en los que las esferas llegan muy cerca unas de otras y la potencia crece rápidamente. Elegimos $dt = T/4n_0$, donde el número de pasos necesario para completar un lado del cuadrado es $n_0 = 100000$. En todos los casos se utilizó RK4 para la integración de las ecuaciones del problema, tal como está implementado en el código abierto que acompaña a la publicación de Swan [Swan et al. (2011)].

4.3. Aproximación de fuerzas puntuales

Como primera aproximación a una descripción cuantitativa del movimiento del *NTE* seguiremos el trabajo de [Golestanian y Ajdari (2008)]. La estrategia que adoptaron estos investigadores es la misma que se utilizó en la sección anterior para deducir las ecuaciones 4.3. Esta consiste en simplificar el problema, reemplazando el campo de velocidades producido por cada esfera al moverse dentro del fluido por aquel causado por una fuerza puntual. Esta aproximación es válida únicamente en el límite $a/(l-d) \ll 1$, restringiéndose así, como se mencionó en la introducción, de manera importante el espacio de parámetros que puede ser investigado. La ventaja de este método es, por otro lado, que da como resultado un sistema de ecuaciones que puede investigarse analíticamente. Las velocidades v_i de cada esfera pueden relacionarse con las fuerzas f_i que cada una de ellas ejerce sobre el fluido de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \pi\eta v_1 &= \frac{f_1}{6a} + \frac{f_2}{4L_1} + \frac{f_3}{4(L_1 + L_2)} \\ \pi\eta v_2 &= \frac{f_1}{4L_1} + \frac{f_2}{6a} + \frac{f_3}{4L_2} \\ \pi\eta v_3 &= \frac{f_1}{4(L_1 + L_2)} + \frac{f_2}{4L_2} + \frac{f_3}{6a} \end{aligned} \tag{4.5}$$

Si imponemos sobre estas ecuaciones la condición de autopropulsión $f_1 + f_2 + f_3 = 0$ y notamos que la velocidad de contracción/expansión de los brazos se relaciona con las velocidades relativas de las esferas de modo que $\dot{L}_1 = v_2 - v_1$ y $\dot{L}_2 = v_3 - v_2$, es sencillo mostrar que:

$$\pi\eta \begin{bmatrix} \dot{L}_1 \\ \dot{L}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ -B & C \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} f_1 \\ f_3 \end{bmatrix} \quad (4.6)$$

Los coeficientes A , B y C están dados por:

$$\begin{aligned} A &= \frac{1}{2L_1} - \frac{1}{3a} \\ B &= \frac{1}{4L_1} + \frac{1}{4L_2} - \frac{1}{4(L_1 + L_2)} - \frac{1}{6a} \\ C &= \frac{1}{3a} - \frac{1}{2L_1} \end{aligned} \quad (4.7)$$

Si definimos ahora una nueva constante $D = AC + B^2$ y combinamos las ecuaciones 4.6 y 4.7 junto con la condición de autopropulsión, podemos escribir ecuaciones para las fuerzas que cada una de las esferas ejerce sobre el fluido en función de la velocidad de deformación del nadador:

$$\begin{aligned} f_1 &= \frac{\pi\eta}{D}(C\dot{L}_1 - B\dot{L}_2) \\ f_2 &= \frac{\pi\eta}{D}(-(B + C)\dot{L}_1 + (B - A)\dot{L}_2) \\ f_3 &= \frac{\pi\eta}{D}(B\dot{L}_1 + A\dot{L}_2) \end{aligned} \quad (4.8)$$

Las ecuaciones 4.5 y 4.8 son suficientes para calcular cualquier cantidad de interés, tales como la velocidad media del nadador, la potencia disipada por este en un ciclo y su eficiencia, siempre que se conozcan las longitudes de los dos brazos como función del tiempo y su primer derivada con respecto al tiempo. Para determinar la velocidad del centro de masa y la potencia disipada como funciones del tiempo se utilizan las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} v_{cm}(t) &= \frac{1}{3} \sum_1^3 v_i(t) \\ P(t) &= \sum_1^3 f_i(t)v_i(t) \end{aligned} \quad (4.9)$$

Los resultados obtenidos mediante este método se compararán a continuación con los resultados obtenidos numéricamente empleando Dinámica de Stokes.

4.4. Dinámica del nadador

Como se describió previamente, podemos investigar la evolución del nadador prescribiendo la longitud de cada uno de sus brazos como función del tiempo. En el caso del ciclo cuadrado, C_a , el estado de elongación de los brazos está definido por una función continua a trozos dividida en intervalos I_i de duración $T_a/4$:

$$\begin{cases} L_1(t) = l + d - v_s(t - t_{0,1}), & L_2(t) = l + d, & t \in I_1 \\ L_1(t) = l - d, & L_2(t) = l + d - v_s(t - t_{0,2}), & t \in I_2 \\ L_1(t) = l - d + v_s(t - t_{0,3}), & L_2(t) = l - d, & t \in I_3 \\ L_1(t) = l + d, & L_2(t) = l - d + v_s(t - t_{0,4}), & t \in I_4 \end{cases} \quad (4.10)$$

Mientras que las ecuaciones correspondientes para el ciclo circular, C_b , son:

$$\begin{aligned} L_1(t) &= l + d \cos(w_c t + \pi/4) \\ L_2(t) &= l + d \sin(w_c t + \pi/4) \end{aligned} \quad (4.11)$$

En la primera columna de la figura 4.3 se muestra la evolución temporal de la posición y velocidad del centro de masa y de la potencia disipada por un nadador de ciclo cuadrado caracterizado por una separación media entre esferas $l = 8$ y una amplitud de oscilación $d = 4$ en unidades de a . Los resultados correspondientes a un nadador de ciclo circular con las mismas dimensiones pueden verse en la primera columna de la figura 4.4. En los dos casos es interesante notar que para nadadores con estas dimensiones la aproximación de fuerzas puntuales (línea de rayas roja) arroja resultados que se corresponden muy bien con los obtenidos mediante Dinámica de Stokes (línea continua azul). La aproximación resulta menos apropiada para nadadores en los que las esferas se acercan a distancias $l - d < 4$, como se discutirá con más detalle en la próxima sección.

La evolución en el tiempo de la posición del centro de masas muestra, tal como se anticipó en el esquema de la figura 4.2, un pequeño retroceso durante el intervalo I_1 seguido de dos intervalos consecutivos en los que los desplazamientos positivos son mayores al retroceso inicial, y finalmente un nuevo desplazamiento en el sentido negativo del eje x que deja, de todas maneras, un saldo positivo de $\Delta x_{cm} \simeq 0,8$ para el nadador del ciclo C_a y de $\Delta x_{cm} \simeq 0,6$ para el nadador del ciclo C_b (primera columna de la figura). Esta misma sucesión entre avances y retrocesos puede notarse claramente en las transiciones de $v_{cm} < 0$ y $v_{cm} > 0$.

Es importante notar que para el ciclo cuadrado, la velocidad de los nadadores correspondientes a la segunda y la tercera columna presenta una importante discrepancia entre SD y FP, justo en el punto medio del ciclo, que es cuando todas las esferas se encuentran cerca unas de otras. La aparición de esta irregularidad se debe a haber mantenido todos los términos en la derivación de las ecuaciones 4.8. Este cambio inesperado de concavidad desaparece si se eliminan los terminos proporcionales a $1/L_i$ en las ecuaciones 4.7

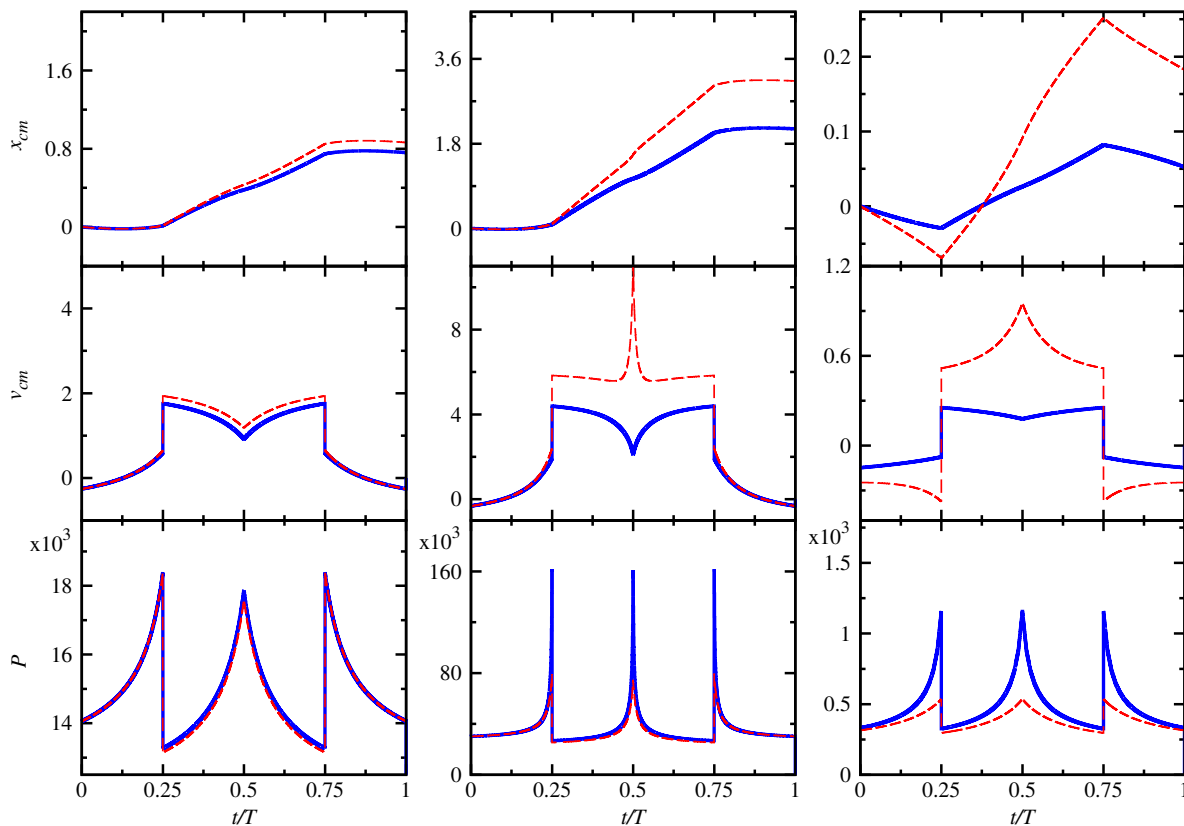


Figura 4.3: Evolución temporal en un ciclo cuadrado de x_{cm} , v_{cm} y P . Las líneas continuas corresponden a resultados obtenidos con Dinámica de Stokes (DS) y las líneas a trazos corresponden a la aproximación de fuerzas puntuales (FP). Cada columna corresponde a un nadador cuyos parámetros geométricos están dados, de izquierda a derecha, por $l = 8$ y $d = 4$, $l = 8$ y $d = 5,9$, $l = 2,6$ y $d = 0,5$.

(lo que equivale a asumir, falsamente en este caso, que $L_i \gg 2a$). La velocidad calculada con SD, en cambio, no presenta este problema porque tiene en cuenta otros momentos del desarrollo de la interacción y también las fuerzas de lubricación que en este punto se vuelven predominantes. En el caso del ciclo circular esta situación no se observa, debido a que las tres esferas nunca se encuentran cerca del contacto simultáneamente y porque la velocidad de contracción disminuye a medida que dos esferas se aproximan entre sí.

Mientras que los resultados para la posición y la velocidad del centro de masa son bastante similares entre los dos ciclos, excepto por la mayor suavidad de las curvas correspondientes a C_b , la potencia disipada presenta diferencias más notables. Para ambos casos la condición inicial coincide con un mínimo local de P y en ambos la potencia aumenta monótonamente hasta alcanzar un primer máximo cuando $t = T/4$. La diferencia en la concavidad de estos máximos se debe a que en el ciclo cuadrado la esfera 1 alcanza

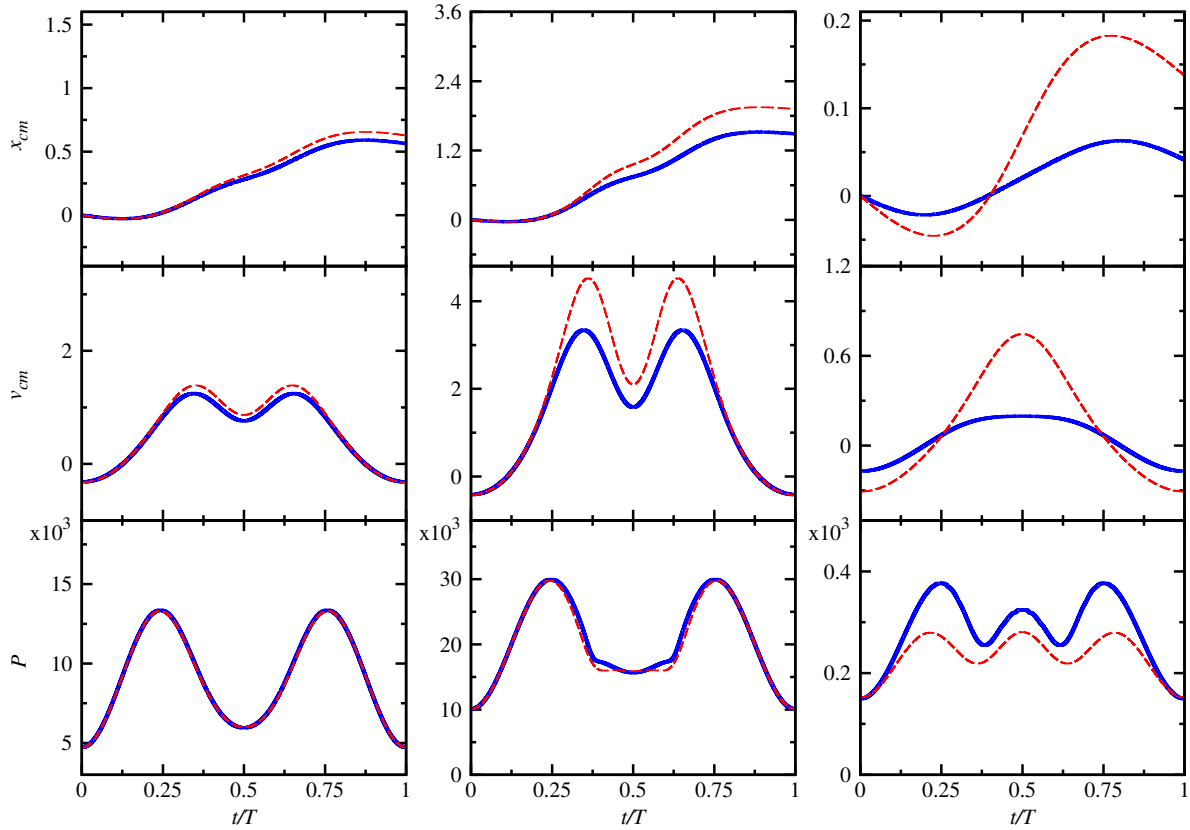


Figura 4.4: Evolución temporal en un ciclo circular de x_{cm} , v_{cm} y P . Las líneas continuas corresponden a resultados obtenidos con Dinámica de Stokes (DS) y las líneas a trazos corresponden a la aproximación de fuerzas puntuales (FP). Cada columna corresponde a un nadador cuyos parámetros geométricos están dados, de izquierda a derecha, por $l = 8$ y $d = 4$, $l = 8$ y $d = 5,9$, $l = 2,6$ y $d = 0,5$.

su distancia mínima a la esfera central con velocidad constante v_a mientras que en el ciclo circular, por el contrario, la esfera 1 se aproxima a la 2 con velocidad decreciente y tendiente a cero. La aproximación subsiguiente de la esfera 3 produce nuevamente un aumento monótono de P en el caso C_a , mientras que en el caso C_b se obtiene un nuevo mínimo local, siendo este mínimo, sin embargo, mayor al mínimo inicial. La existencia de un máximo ubicado justo en la mitad del ciclo no es exclusiva del ciclo cuadrado pues puede ocurrir en el ciclo circular para elecciones particulares de l y d , tal como se ve en la tercer columna de la figura 4.4.

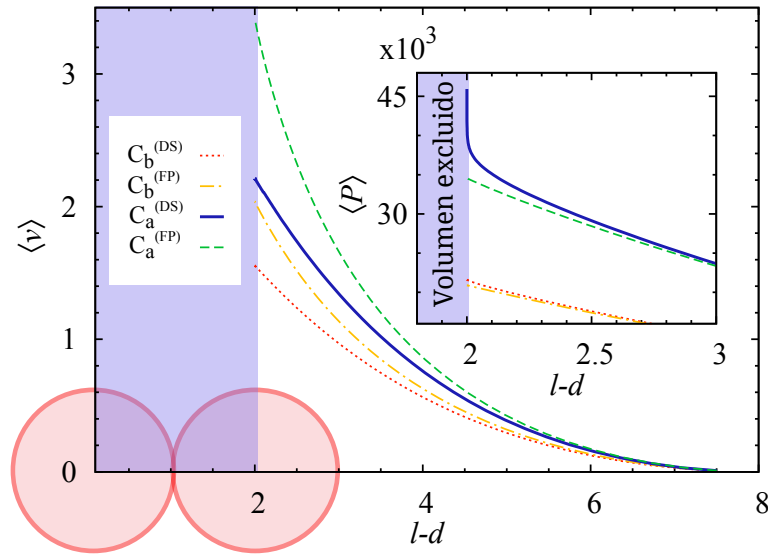


Figura 4.5: Velocidad media $\langle v \rangle$ (panel principal) y potencia media disipada $\langle P \rangle$ (panel interior) en función de la distancia mínima $l - d$ de separación entre las esferas para nadadores con $l = 8$. El área sombreada representa el volumen excluido debido al volumen finito de las esferas. Las líneas azul continua y verde a rayas corresponden al ciclo cuadrado, C_a , simulado empleando Dinámica de Stokes (DS) y fuerzas puntuales (FP) respectivamente. Las líneas rojas punteadas y las amarillas de rayas y puntos corresponden a un ciclo circular, C_b , simulado empleando DS y FP , respectivamente.

4.5. Validez de la aproximación puntual

El método empleado en nuestras simulaciones numéricas incluye tanto a los efectos de volumen finito de las esferas como a las fuerzas de lubricación que emergen entre ellas cuando se encuentran muy próximas unas de las otras. La mayor precisión del método permite evaluar los límites de validez de las aproximaciones empleadas por [Golestanian y Ajdari (2008)], e investigar con mayor profundidad aquellos rangos de parámetros a los que no es posible acceder sin recurrir a métodos más elaborados.

Tal como puede observarse en las columnas 2 y 3 de las figuras 4.3 y 4.4, los resultados que se obtienen empleando la aproximación de fuerzas puntuales se separan cada vez más de los resultados obtenidos empleando Dinámica de Stokes a medida que la distancia mínima entre los centros de las esferas, $l - d$, disminuye. La columna 2 corresponde a un nadador para el cual la distancia media entre las esferas externas y la central es igual a la de la columna 1, $l = 8$, pero cuya amplitud es $d = 5,9$, de modo que las superficies de las dos esferas de radio $a = 1$ llegan a estar separadas por una distancia igual a $a/10$. La separación es tan pequeña que la forma completa de la esfera no puede dejar de ser tenida

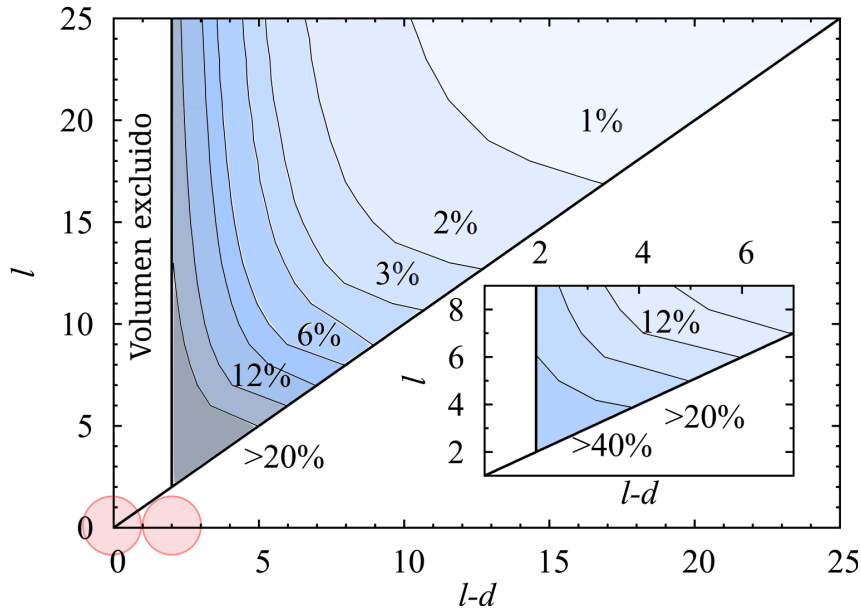


Figura 4.6: Diferencia porcentual entre el valor obtenido para $\langle v \rangle$ por Dinámica de Stokes y Fuerzas Puntuales. Los resultados corresponden a un nadador de ciclo circular en función de l y d .

en cuenta ni tampoco las fuerzas de lubricación. Lo mismo puede observarse en la tercera columna de las figuras, que corresponden al caso aún más extremo de un nadador en el que la distancia media entre las esferas es tan solo de $l = 2,6$ y la amplitud de la oscilación es $d = 0,5$, con lo cual las esferas se encuentran permanentemente cerca del contacto y la aproximación de fuerzas puntuales no puede considerarse válida en ningún punto del ciclo. Nuevamente se observa que la velocidad media estimada empleando la aproximación de fuerzas puntuales es más grande que el resultado correspondiente a la Dinámica de Stokes, lo que se evidencia por un mayor desplazamiento del centro de masas al final del ciclo, y que la potencia media disipada en el ciclo es menor. La sobreestimación de la velocidad media del nadador y la subestimación de la potencia media disipada resultan ser errores sistemáticos de la aproximación de fuerzas puntuales. Esto puede observarse en la figura 4.5, en donde se presentan $\langle v \rangle$ y $\langle P \rangle$ como funciones continuas de la mínima distancia $l - d$ entre las esferas del nadador, siendo $\langle \rangle$ el promedio temporal sobre un período. La figura 4.5 muestra también que, para el caso particular escogido, el ciclo cuadrado produce siempre una velocidad mayor que el ciclo circular, pero esto ocurre al costo de un mayor consumo de energía. El estudio de la eficiencia del *NTE* merece por lo tanto un análisis más detallado y será abordado en la sección siguiente.

Para determinar con mayor precisión cuál es el rango de validez de la aproximación de fuerzas puntuales tomamos como referencia los resultados correspondientes a la Dinámica de Stokes y calculamos el error porcentual cometido en la determinación de $\langle v \rangle$ para un

nadador de ciclo circular caracterizado por distintos valores de l y $l - d$. El dominio de la figura 4.6 en el que se presentan los resultados tiene forma triangular debido a que siempre $l \geq (l - d)$, mientras que la condición de volumen excluido implica $l - d > 2$.

El mapa de colores muestra como la diferencia entre los dos métodos empleados para la determinación de $\langle v \rangle$ aumenta a medida que disminuyen l y $l - d$. La ampliación del mapa mostrado en el panel interior de la figura permite ver que el error cometido al usar FP en el cálculo de la velocidad media del nadador de la primera columna de la figura 4.4, en apariencia válido al mirar aquella figura, es en realidad mayor al 10%, en tanto que los errores porcentuales para los nadadores de las columnas 2 y 3 son respectivamente mayores al 20% y al 40%. La figura muestra claramente que para emplear la aproximación de fuerzas puntuales con errores en la velocidad menores al 3% es necesario trabajar con nadadores cuya distancia mínima entre esferas sea por lo menos un orden de magnitud mayor al radio de las mismas. Esto, como veremos, pone importantes restricciones para optimizar la eficiencia de un nadador, implicando la necesidad de emplear métodos más precisos tales como Dinámica de Stokes.

4.6. Ciclo cuadrado vs. ciclo circular

En esta sección se presentan los resultados arrojados al investigar la eficiencia de los *NTE*, lo que sirve asimismo para comparar cuantitativamente las ventajas o desventajas de emplear el ciclo cuadrado o el ciclo circular respectivamente. Para estudiar la eficiencia del nadador en función de los parámetros geométricos relevantes empleamos una definición introducida originalmente por [Lighthill (1976)] que relaciona el trabajo realizado por una fuerza externa para mover al nadador a una dada velocidad sin que este se deforme, y la potencia que el nadador disipa cuando se mueve a esa misma velocidad por sus propios medios:

$$\varepsilon = C(l, d) \langle v \rangle^2 / \langle P \rangle \quad (4.12)$$

En esta ecuación $C(l, d)$ es el coeficiente de arrastre F/v del cuerpo del nadador, el cual depende de la configuración del mismo (por ejemplo si los brazos se encuentran estirados o comprimidos) y de sus parámetros geométricos. Para determinarlo se realizaron simulaciones independientes en las que se midió la velocidad resultante del nadador cuando este se encuentra con ambos brazos extendidos y actúa sobre él una fuerza conocida en la dirección paralela a su eje. La medición se repitió $2,5 \times 10^4$ veces para elaborar una tabla en la que es posible encontrar el valor de C para valores de $l + d$ desde 2 hasta 250 en incrementos de $a/100$. La elección de emplear el coeficiente de arrastre correspondiente al nadador con sus dos brazos extendidos ofrece la ventaja de poder pensar a los resultados mostrados de ahora en adelante como cotas máximas para la eficiencia. Se realizaron pruebas usando los brazos contraídos y se verificó que los resultados para la eficiencia en función de los parámetros geométricos del nadador no cambian su forma funcional sino sólo su magnitud, resultando por supuesto siempre menores.

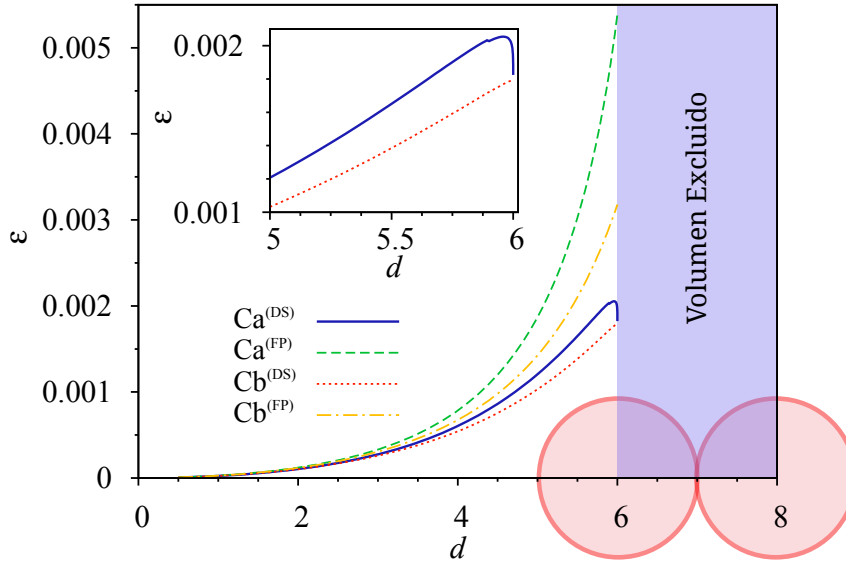


Figura 4.7: Comparación de la eficiencia de los nadadores como función de d para los dos ciclos estudiados y $l = 8$. Las líneas azul continua y verde a rayas corresponden a la eficiencia del ciclo cuadrado C_a obtenida usando Dinámica de Stokes y Fuerzas Puntuales, respectivamente. La línea roja de puntos y la amarilla de líneas y puntos corresponden al ciclo circular C_b , para cada uno de los métodos. El área sombreada representa la región prohibida por volumen excluido. En el recuadro se observa ampliado el comportamiento diferente de los dos ciclos cuando las esferas llegan cerca del contacto.

Como fue mostrado previamente en la figura 4.5, independientemente del ciclo empleado, se observa un aumento monótono de $\langle v \rangle$ y $\langle P \rangle$ a medida que aumenta la compresión (disminuye $l - d$). El aumento más rápido de $\langle v \rangle^2$ en proporción al incremento correspondiente de la potencia disipada implica también un aumento monótono de la eficiencia, tal como puede verse en la figura 4.7. Este crecimiento de la curva de eficiencia para los dos ciclos termina en puntos ligeramente diferentes. Mientras que para el ciclo circular el valor máximo de la eficiencia coincide con el valor más grande de d permitido por la condición de volumen excluido, en el caso del ciclo cuadrado se produce para un d un poco menor, cuando las esferas se encuentran aproximadamente a una distancia del 10% de a , como puede apreciarse en el recuadro de la figura 4.7. Esto ocurre debido a que las fuerzas de lubricación se vuelven preponderantes en el caso del ciclo cuadrado, ya que las esferas se aproximan a velocidad constante, produciéndose así un aumento exponencial de la energía disipada (ver recuadro de la figura 4.5). Es interesante notar que es justamente en esta región próxima a $l - d = 2$, correspondiente a los parámetros que optimizan la eficiencia del nadador para cualquiera de los dos ciclos, cuando mayor es la diferencia entre los dos métodos utilizados, siendo esta aproximadamente del 100% para el ciclo circular y del 150% para el ciclo cuadrado. Esta discrepancia no es sorprendente dado que en esta región la condición de validez para el método de Fuerzas Puntuales, $a/(l - d) \ll 1$, no se

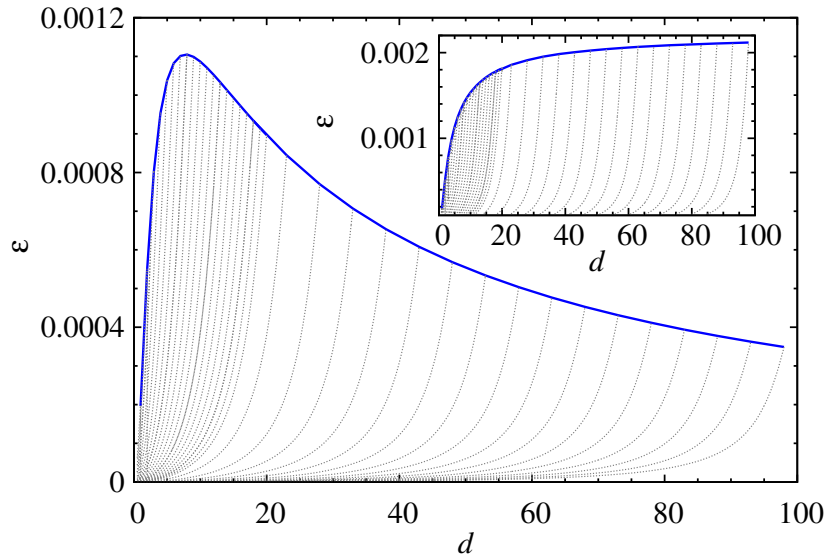


Figura 4.8: Eficiencia correspondiente al ciclo circular (panel principal) y cuadrado (recuadro). En ambos casos las líneas de puntos grises representan la curva de eficiencia en función de d para un dado l , de manera análoga a las curvas mostradas en la figura 4.7. Las líneas continuas azules unen los puntos de mayor eficiencia para cada l , mostrando la eficiencia del nadador en función de su tamaño.

cumple. Esto muestra la necesidad de emplear métodos como Dinámica de Stokes u otros similares si se intenta optimizar los parámetros de un nadador como el *NTE*.

La eficiencia como función de d mostrada en la figura 4.7 puede dibujarse para diferentes valores de l . Si se conectan todos los puntos de máxima eficiencia para cada l es posible construir la curva de eficiencia máxima para cada uno de los ciclos, como se muestra en la figura 4.8. Una diferencia notable entre las curvas correspondientes a cada uno de los ciclos es que, mientras el ciclo circular mostrado en el panel principal presenta un máximo para $d \simeq 8$, en el caso del ciclo cuadrado la eficiencia aumenta monótonamente, aproximándose asintóticamente a $\varepsilon \simeq 0,0021$.

Para investigar con mayor profundidad la diferencia entre los dos ciclos, comparamos la velocidad media y la potencia media disipada durante un período para los nadadores más eficientes de distintos tamaños. Como puede verse en las figuras 4.9 y 4.10 para los ciclos cuadrado y circular, respectivamente, la pendiente de $\langle P \rangle$ es la misma en los dos casos, si bien la potencia disipada por el ciclo cuadrado es siempre mayor a la del ciclo circular, siendo esta diferencia pasible de ser explicada por la velocidad constante con la que las esferas llegan al contacto en el ciclo cuadrado, como ya fue mencionado previamente. Por el contrario, las pendientes correspondientes a la velocidad media, mostradas en los recuadros interiores de las dos figuras, son iguales únicamente cuando la amplitud de

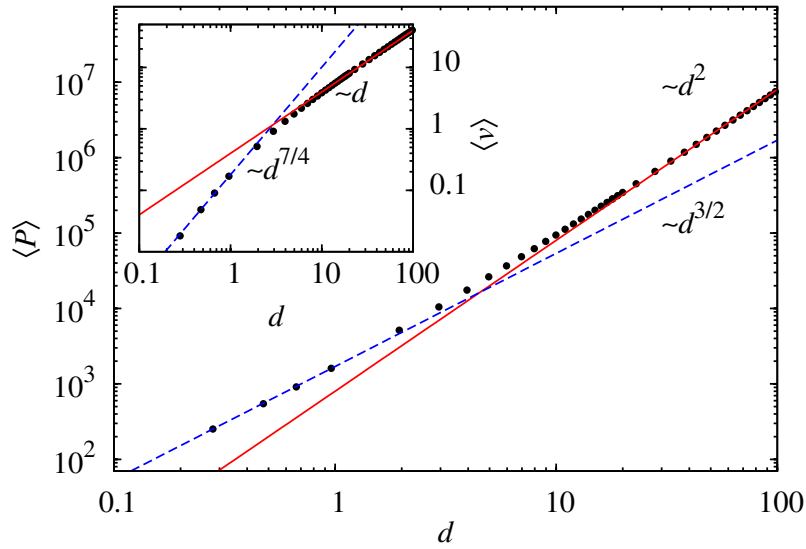


Figura 4.9: Potencia media disipada (panel principal) y velocidad media en un período (recuadro), correspondientes al nadador óptimo de cada tamaño para el ciclo cuadrado.

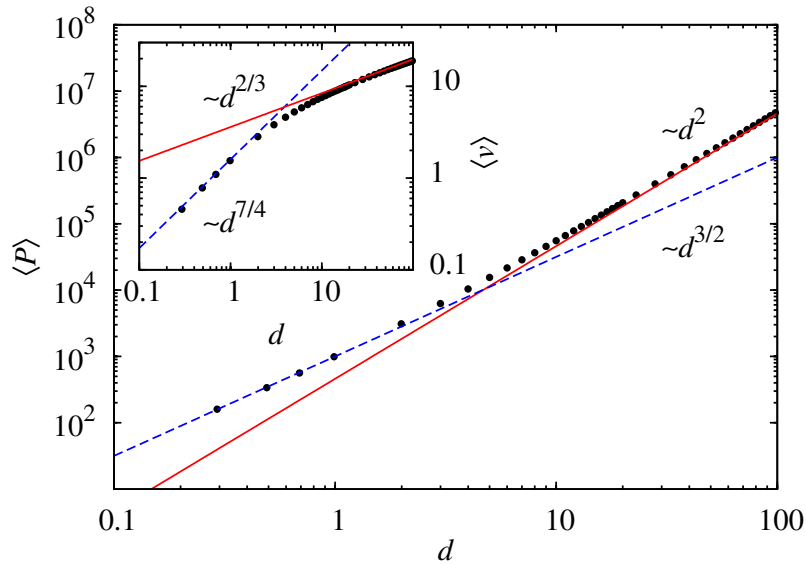


Figura 4.10: Potencia media disipada (panel principal) y velocidad media en un período (recuadro), correspondientes al nadador óptimo de cada tamaño para el ciclo circular.

oscilación d es muy pequeña, y la velocidad media crece como $\langle v \rangle \simeq d^{7/4}$. Cuando la amplitud del movimiento de sus brazos es en cambio muy grande, la velocidad media

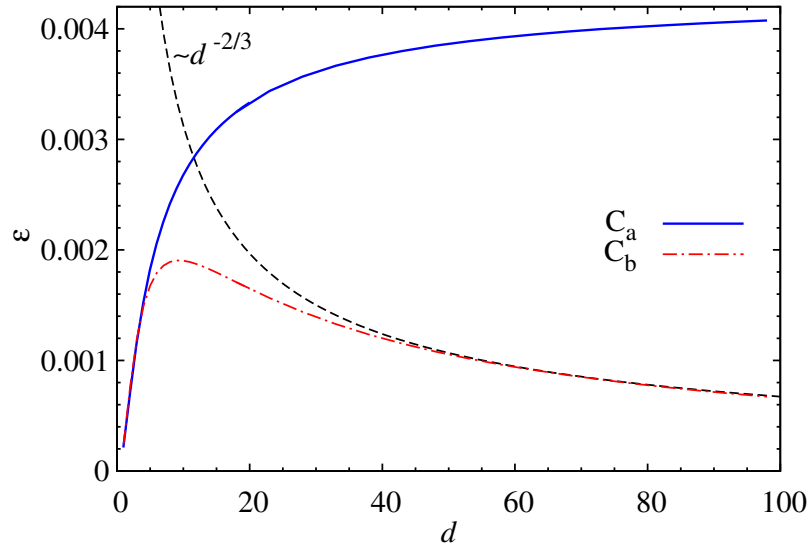


Figura 4.11: Comparación de las eficiencias correspondientes a los nadadores óptimos del ciclo cuadrado (línea continua azul) y circular (línea roja de líneas y puntos) como función del tamaño del nadador. La línea a rayas corresponde a $d^{-2/3}$.

crece de forma proporcional a d en el ciclo cuadrado y como $d^{2/3}$ para el ciclo circular, lo que produce la caída de la eficiencia para nadadores circulares grandes.

En la figura 4.11 se comparan las eficiencias para los dos ciclos. La eficiencia resulta ser aparentemente independiente del ciclo para nadadores pequeños, mientras que los nadadores grandes de ciclo cuadrado muestran una eficiencia mucho mayor a los de ciclo circular (recuérdese que estas curvas se construyen con los nadadores óptimos para cada valor de d , y este es $\approx l-2$, con lo cual existe una correlación directa entre d y el tamaño del nadador). Es posible conjeturar que el origen de esta discrepancia radica en que, mientras que el ciclo cuadrado le permite al nadador aprovechar contracciones completas de sus brazos en una configuración de mínimo arrastre para avanzar, en el caso del ciclo circular los tramos de avance ocurren a coeficientes de arrastre cambiantes y siempre mayores al mínimo. Es de esperar que esta diferencia en las condiciones de avance de los dos ciclos tienda a desaparecer cuando la amplitud del movimiento de los brazos sea muy pequeña, pues en tal caso las distintas configuraciones no afectarían notablemente al arrastre del nadador en conjunto. Esta hipótesis debería ser estudiada cuantitativamente, de todas maneras, para ser confirmada.

4.7. Conclusiones

En este capítulo se mostró la utilidad de complementar los estudios realizados hasta la fecha del movimiento del *nadador de tres esferas* utilizando la Dinámica de Stokes. Para esto, se empleó el código publicado por [Swan et al. (2011)], autores que habían probado el método con éxito para diversos nadadores. El trabajo presentado aquí contribuye a demostrar que el método es eficaz para investigar también las propiedades del *nadador de tres esferas*. Sistemas similares, que han sido previamente estudiados analíticamente, tales como nadadores formados por tres esferas pero que pueden rotar incorporando un grado de libertad extra [Ledesma-Aguilar et al. (2012)] o pares de nadadores interactuantes [Alexander et al. (2008)], podrían ser estudiados mediante Dinámica de Stokes. Un resultado importante fue la caracterización de los límites de validez de la aproximación analítica introducida por [Golestanian y Ajdari (2008)].

Las simulaciones fueron empleadas primeramente para analizar la dependencia temporal de magnitudes como la posición, la velocidad y la potencia disipada por un nadador durante un ciclo, variando los parámetros que definen la geometría del nadador (d y l), así como también el tipo de ciclo, que puede ser cuadrado o circular, descrito por las longitudes L_i de sus brazos. El estudio demostró que tanto la velocidad como la potencia disipada se incrementan para un l fijo cuanto mayor es d , es decir, mientras más cerca llegan a estar las esferas unas de otras cuando los brazos están contraídos, tal como puede verse en la figura 4.5. Asimismo, la velocidad y la potencia medias durante un ciclo son mayores empleando el ciclo cuadrado, C_a , para todo d . Este único resultado no es suficiente para decidir cuál de los dos ciclos es el más eficiente, pues la mayor rapidez tiene un costo energético adicional. En particular, la velocidad media para un ciclo circular obtenida con las simulaciones fue comparada con la que se obtiene analíticamente en la aproximación de fuerzas puntuales, encontrándose un mapa que permite determinar el grado de precisión de la aproximación empleada para distintos valores de l y d . Cabe destacar que tanto $v_{cm}(t)$ como $P(t)$ son funciones más suaves si se emplea un ciclo circular que uno cuadrado, debido a que en el primero la velocidad de aproximación entre dos esferas disminuye a medida que alcanzan su mínima separación, mientras que en el ciclo cuadrado la velocidad de aproximación es siempre la misma.

Como se dijo más arriba, debido a que en el ciclo cuadrado tanto $\langle v \rangle$ como $\langle P \rangle$ son mayores que en el ciclo circular, no puede decidirse con facilidad cuál de los dos es más eficiente. Un nadador caracterizado por un ciclo cuadrado avanzaría más en un período que otro impulsado con un ciclo circular, pero a un mayor costo energético (recordar que todas las mediciones fueron escaladas con la duración de un período, de lo contrario esta comparación no sería posible). Esta observación condujo a introducir la eficiencia definida por Lighthill, de modo de poder comparar las eficiencias de los dos ciclos. Así se encontró que en ambos casos la eficiencia es optimizada para un nadador con $\langle L_i \rangle = l$ cuando $d = l - 2a$ en el caso circular y $d \approx l - 2,1a$ en el caso cuadrado (ver figura 4.7). Con el fin de comparar las eficiencias entre los dos ciclos para diferentes l , se construyeron curvas uniendo los puntos de curvas correspondientes a diferentes valores de l cuyo valor de d

fuera óptimo (ver figura 4.8). Esta comparación (figura 4.11) mostró que para nadadores pequeños ($l < 8a$) no existe diferencia apreciable entre los dos ciclos. Sin embargo, para nadadores de mayor tamaño, el ciclo cuadrado presenta una notable ventaja, creciendo asintóticamente hasta una eficiencia $\varepsilon \approx 4,1 \times 10^{-3}$, en contraste con el ciclo circular cuya eficiencia decae como $d^{-2/3}$ luego de pasar por un máximo en $l \approx 12$. Esta diferencia tiene su origen en que la velocidad de un nadador con ciclo circular crece más lentamente que la de un nadador con ciclo cuadrado a medida que su tamaño se incrementa. La razón por la que esto ocurre no fue demostrada, pero es de esperar que se encuentre relacionada con que en el ciclo circular existen intervalos de tiempo en los que los dos brazos se mueven en sentido contrario, restando así eficacia al desplazamiento de las esferas. Es posible que la pérdida causada por este movimiento contrapuesto se haga menos notable cuando el tamaño del nadador, y por ende las diferencias en el arrastre a lo largo de un ciclo, sean más pequeñas. Si esto fuera así, se entendería porqué el ciclo cuadrado aprovecharía mejor las grandes diferencias de arrastre que surgen a medida que el tamaño del nadador es mayor [Berdakin et al. (2015)].

Para finalizar, es interesante destacar que el nadador de tres esferas ha sido realizado experimentalmente mediante el uso de pinzas ópticas [Leoni et al. (2009)]. En este experimento, la posición del nadador se mantuvo fija y se midió el campo de velocidades que causa a su alrededor. Este estudio demostró que es posible usar este mismo diseño para la fabricación de microbombas, cuya eficiencia debería, en principio, verse optimizada de manera análoga a la del nadador de tres esferas, lo que daría utilidad práctica a los resultados aquí expuestos.

Capítulo 5

Bacterias en medios microconfinados

Resumen:

En este capítulo se estudian algunos aspectos de la dinámica de microorganismos en medios confinados. En la primera parte del mismo se propone un modelo fenomenológico suficientemente flexible para adaptarlo a distintas estrategias de movimiento, tales como la empleada por bacterias *E. coli* o la que caracteriza al movimiento de espermatozoides humanos. El modelo contempla además la presencia o ausencia de posibles torques externos. Posteriormente se procede a limitar el modelo a casos particulares, con el fin de investigar las propiedades difusivas de poblaciones de distintos microorganismos y sus tendencias a acumularse en la proximidad de las paredes que confinan su movimiento. Para finalizar, se investiga como esta tendencia a nadar sobre las paredes puede emplearse en el direccionamiento de distintas poblaciones celulares.

5.1. Introducción

Los microorganismos se encuentran en muchas ocasiones reales obligados a desplazarse en ambientes reducidos y en cercanía de distintos tipos de obstáculos, como es el caso de las bacterias en el suelo húmedo o los espermatozoides en su camino al óvulo. Una de las consecuencias más evidentes del confinamiento es la tendencia de los nadadores a acumularse sobre las paredes que limitan su desplazamiento. La distribución de células acumuladas sobre paredes ha sido medida para las bacterias *E. coli* [Berke et al. (2008)] y *C. crescentus* [Li y Tang (2009)] y para espermatozoides de toro [Rothschild (1963)]. Si bien existió históricamente cierto consenso con respecto a que el origen de esta acumulación se hallaba en la interacción hidrodinámica entre los nadadores y la pared, trabajos más recientes como el de [Li y Tang (2009)] pusieron esta idea en duda. Li y sus colaboradores estudiaron el cambio de dirección de una célula de la especie *C. crescentus* nadando en dirección a una pared y encontraron que, con independencia del ángulo de incidencia, el cambio en la trayectoria adjudicable a las interacciones hidrodinámicas es pequeño

la mayoría de las veces, y que las células acaban por rotar para situarse paralelas a la pared cuando entran en contacto directo con esta. Esta explicación fue reforzada por el trabajo de [Drescher et al. (2011)] en donde se mostró que las interacciones entre una bacteria *E. coli* y una pared son de corto alcance y posteriormente por los resultados presentados en [Kantsler et al. (2013)] en donde se mostró evidencia directa de que el scattering de nadadores, tanto *pushers* como *pullers*, está gobernado principalmente por el contacto directo con la superficie, mientras que las interacciones hidrodinámicas podrían ser responsables de la duración del atrapamiento.

El trabajo publicado en 2007 por P. Galajda y sus colaboradores atrajo la atención de un público variado porque mostró por primera vez que la tendencia de los micronadadores a acumularse en las paredes de contenedores puede aprovecharse para dirigir su movimiento. Estos investigadores mostraron con su experimento que la concentración de bacterias *E. coli* en lados opuestos de una caja puede alterarse introduciendo una fila de obstáculos en forma de V que favorece el paso de las células en una dirección y lo dificulta en la dirección contraria. Sin embargo, en ese trabajo no se investigaron los efectos sobre el direccionamiento de los distintos parámetros geométricos involucrados, ni tampoco la dependencia con los parámetros de motilidad de las células. Este análisis fue realizado con posterioridad numéricamente [Wan et al. (2008)]. Aunque el trabajo de Wan y sus colaboradores capta cualitativamente los elementos principales del problema, no consiguió acercarse cuantitativamente a los resultados experimentales debido a una representación algo simplificada de la dinámica de las bacterias que siguen una estrategia de corridas y tumbos. En este capítulo se presenta un nuevo modelo que incorpora ciertos aspectos importantes del movimiento bacteriano al modelo de Wan, mejorando así los resultados numéricos que se aproximan mejor a las observaciones experimentales, sin la necesidad de utilizar parámetros de ajuste. En particular, los elementos que se agregan al modelo son la persistencia de la dirección de movimiento de las bacterias luego de un tumbo, la distribución exponencial de la duración de las corridas y el efecto de las fluctuaciones del medio sobre la dirección de movimiento en vez de afectar la posición de los nadadores.

5.2. Modelo

Para estudiar el comportamiento de una población numerosa de micro nadadores construimos un modelo fenomenológico del movimiento de cada agente que incorpora las características principales de diferentes especies sin tener en cuenta el detalle del mecanismo de propulsión. La simplicidad del modelo permite una eficiente evaluación numérica del problema, que involucra interacciones entre muchos agentes, sin que por esto se pierda en flexibilidad para representar el comportamiento de distintos tipos de nadadores. El modelo representa N nadadores en 2 dimensiones por medio de discos de radio a . La posición del i -ésimo nadador está dada en el plano xy por el vector posición \mathbf{r}_i y su dirección de movimiento al tiempo t forma un ángulo $\varphi_i(t)$ con respecto al eje x . Las ecuaciones de movimiento que definen la trayectoria del nadador son las siguientes:

$$\begin{aligned}\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} &= v_0 \hat{\mathbf{e}}_v + \frac{1}{\gamma} (\mathbf{F}_i^p + \mathbf{F}_i^n) \\ \frac{d\varphi_i(t)}{dt} &= (\Omega + \sqrt{2D_r} \eta(t)) \Theta + \Omega_g (1 - \Theta)\end{aligned}\tag{5.1}$$

En donde $\hat{\mathbf{e}}_v = \cos(\varphi_i(t))\hat{i} + \sin(\varphi_i(t))\hat{j}$, γ es el coeficiente de fricción del nadador, \mathbf{F}_i^p y \mathbf{F}_i^n son, respectivamente, las fuerzas sobre el nadador debidas a la interacción con una pared o con otros nadadores. En la segunda ecuación del sistema, Ω es una velocidad angular constante debida por ejemplo al torque ejercido por la interacción con interfaces sólido-líquido [Lauga et al. (2006)] o líquido-gas [Di Leonardo et al. (2011)] o a la presencia de un campo externo, Ω_g es la velocidad angular durante un tumbo de un nadador como la *E. coli*, capaz de cambiar de dirección por sus propios medios, D_r es el coeficiente de difusión rotacional y Θ es una variable de estado igual a 1 durante una corrida e igual a 0 durante un tumbo. Finalmente, $\eta(t)$ es una variable aleatoria con distribución gaussiana cuyo valor medio es 0 y cuya desviación estándar es 1, de tal manera que $\langle \eta(t)\eta(t') \rangle = \delta(t - t')$. De acuerdo con lo discutido en el capítulo 3, en nuestro modelo introducimos únicamente las fluctuaciones que afectan a la dirección de movimiento del nadador, pues la influencia de las fluctuaciones sobre el módulo de la velocidad es despreciable en todos los casos estudiados.

Con el fin de reproducir las propiedades estadísticas de las bacterias estudiadas por [Berg et al. (1972)], la variable Θ pasa de 1 a 0 con una tasa igual a $1/\tau$, de manera tal que la distribución de duración de las corridas es una exponencial que decae con el tiempo, $\exp(-t/\tau)/\tau$, cuyo valor medio es τ . En caso de que Θ tome el valor 0, se elige un valor al azar para Ω_g de forma tal que el nadador gire en un único paso temporal un ángulo $\Delta\varphi = \phi = \Omega_g \Delta t$ con ϕ distribuido normalmente. El valor medio $\langle \phi \rangle$ de la distribución y su ancho son parámetros característicos de la estrategia de movimiento de cada nadador. En particular, para distintos mutantes de la bacteria *E. coli*, Berg encontró que $\langle \phi \rangle$ es un ángulo agudo, lo que implica que estas bacterias guardan cierta memoria de la dirección previa al tumbo. Como se verá más adelante, este efecto de memoria tiene consecuencias notables sobre la difusión de una población y también para la posibilidad de direccionar su movimiento.

Para definir las interacciones introducidas en las ecuaciones de movimiento a través de los términos \mathbf{F}_i^n y \mathbf{F}_i^p nos hemos basado inicialmente en el modelo utilizado por [Wan et al. (2008)], mientras que se introdujeron algunos cambios posteriormente para modelar espermatozoides en base a las observaciones experimentales de nuestros colaboradores [Guidobaldi et al. (2014)]. En ambos casos, las interacciones entre nadadores incluyen términos correspondientes únicamente a la repulsión estérica entre los mismos, dejando de lado las interacciones hidrodinámicas mediadas por el fluido. Esta última aproximación se justifica por la baja densidad de las poblaciones simuladas con respecto a las concentraciones necesarias para observar cambios importantes en la dinámica poblacional [Henkes et al. (2011); Sokolov et al. (2007)] y por observaciones experimentales que sugieren que las interacciones hidrodinámicas entre nadadores son de corto alcance debido a las fluctua-

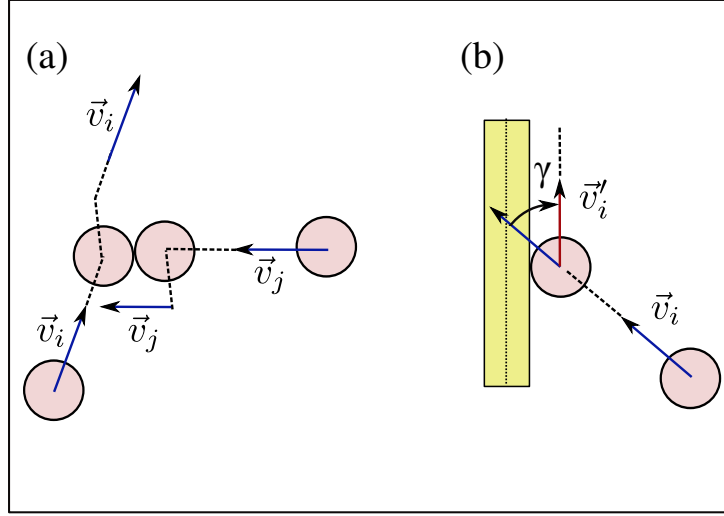


Figura 5.1: a) Interacción estérica entre dos nadadores. La colisión produce una alteración en las trayectorias de los nadadores involucrados pero no un cambio en su dirección de movimiento. b) Interacción entre un nadador y una pared. En este caso la interacción sí produce una rotación del nadador.

ciones propias de su movimiento [Drescher et al. (2010)], contrariamente a lo que predice el análisis clásico de las mismas [Lauga y Powers (2009)].

En el modelo de Wan, tanto las interacciones con la pared como con otros nadadores se representan por interacciones elásticas. La interacción estérica entre nadadores está dada por

$$\mathbf{F}_i^n = F^n \sum_{j \neq i}^N \left(1 - \frac{r_{ij}}{2a}\right) \hat{\mathbf{r}}_{ij}, \quad \forall r_{ij} \leq 2a \quad (5.2)$$

aquí $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$ y F^n es la magnitud máxima de la fuerza. Esta fuerza de repulsión modifica la trayectoria de dos nadadores que se encuentran, evitando su solapamiento, pero dejando inalterada la dirección de movimiento de cada uno de ellos. Esta situación está esquematizada en la figura 5.1(a), y se corresponde con los resultados simulacionales de interacciones entre bacterias realizadas por Ishikawa et al. (2007). De manera similar, la interacción entre el nadador i y la pared k está dada por

$$\mathbf{F}_i^p = \begin{cases} F^p \left(1 - \frac{r_{ik}}{d_{min}}\right)^{0,1} \mathbf{n}_k & : r_{ik} \leq d_{min} \\ 0 & : r_{ik} \geq d_{min} \end{cases} \quad (5.3)$$

siendo r_{ik} la distancia entre el centro de la pared y el centro del nadador, \mathbf{n}_k un vector unitario normal a la pared, F^p la magnitud máxima de la fuerza y $d_{min} = a + w/2$, donde w es el ancho de la pared. El exponente 0,1 se utilizó para aumentar la pendiente del potencial, “endureciendo” de este modo la interacción con la pared. Luego de que el

nadador choca contra la pared, continúa moviéndose en la dirección paralela a la misma pero con una velocidad $\vec{v}'_i \leq \vec{v}_i$ dada por $\vec{v}'_i = \vec{v}_i \cos(\gamma)$ siendo γ el ángulo de incidencia del nadador, tal como puede verse en la figura 5.1(b). En todas las simulaciones, las ecuaciones espaciales fueron integradas empleando Runge-Kutta 4, mientras que la variable angular se integró utilizando el método de Euler. El paso temporal empleado fue $\Delta t = 0,01$.

En las simulaciones realizadas exclusivamente para estudiar poblaciones de espermatozoides la interacción con la pared fue modificada con el fin de representar con mayor fidelidad las observaciones experimentales. En estas simulaciones, los espermatozoides rotan de modo de situarse paralelos a la pared con la que interactúan y luego siguen nadando en esta nueva dirección sin que el módulo de su velocidad se modifique, con lo cual $\vec{v}'_i = \vec{v}_i$.

5.3. Corridas y tumbos

Si consideramos el caso de nadadores sin torque podemos adaptar las ecuaciones 5.1 para describir el movimiento de nadadores que siguen diferentes estrategias de corridas y tumbos (ver sección 1.2.1), eligiendo apropiadamente los parámetros para caracterizar a cada especie. Por ejemplo, un ángulo medio de giro debido a tumbos que toma el valor $\langle \phi \rangle = 0^\circ$ correspondería a un nadador de acentuada persistencia, tal como podría ser el caso de un mutante de *E. coli* incapaz de dar tumbos o un espermatozoide, mientras que $\langle \phi \rangle = 180^\circ$ reproduce el comportamiento de un nadador que se mueve por sucesivos avances y retrocesos, tal como ocurre con las bacterias de la especie *caulobacter crescentus*. Por otra parte, nadadores con una duración media de corrida τ muy grande también representarían células incapaces de dar tumbos, mientras que valores muy pequeños de τ pueden usarse para representar células incapaces de autopropulsarse a las que llamaremos *brownianas* por ser su desplazamiento debido solamente a la influencia de fuerzas brownianas.

En la Tabla 5.1 se listan los parámetros utilizados en las simulaciones. Los nadadores s_1 , s_3 y s_4 corresponden, respectivamente, a los mutantes de la bacteria *E. coli* CheC497 (corridas largas), AW405 (corridas intermedias) y Unc602 (corridas cortas) estudiados en [Berg et al. (1972)], mientras que s_2 , s_5 y s_6 representan nadadores idealizados pensados para estudiar algunos otros casos particulares. Para todas las poblaciones estudiadas se utilizó $D_r = 0,1 \text{ rad}^2/s$, aproximadamente el valor observado experimentalmente para la *E. coli* AW405 [Berg (1993)].

5.4. Difusión

Para estudiar las propiedades difusivas de las poblaciones presentadas en la Tabla 5.1 analizaremos el caso en el que las mismas se encuentran suficientemente diluidas y en

	Cambio medio de dirección $\langle\phi\rangle$ [°]	Duración corridas τ [s]	Velocidad media $\langle v\rangle$ [$\mu\text{m/s}$]
s_1	33 ± 15	6,3	$20 \pm 4,9$
s_2	0 ± 36	100	$14,2 \pm 3,4$
s_3	68 ± 36	0,86	$14,2 \pm 3,4$
s_4	74 ± 33	0,42	$14,4 \pm 3,9$
s_5	180 ± 36	0,86	$14,2 \pm 3,4$
s_6	68 ± 36	0,01	$14,2 \pm 3,4$
s_7	90(c.a.)	0,86	$14,2 \pm 3,4$

Tabla 5.1: Parámetros de movilidad asociados a diferentes nadadores. s_1 , s_3 y s_4 son mutantes de la bacteria *E. coli* usados en [Berg et al. (1972)]; s_2 , s_5 , s_6 y s_7 son nadadores idealizados (c.a.= caminata aleatoria).

ausencia de confinamiento. En estas condiciones, tanto \mathbf{F}_i^p como \mathbf{F}_i^n pueden considerarse nulas con lo cual las ecuaciones 5.1 toman la siguiente forma más sencilla

$$\begin{aligned}\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} &= v_0 \hat{\mathbf{e}}_v \\ \frac{d\varphi_i(t)}{dt} &= (\sqrt{2D_r\eta(t)})\Theta + \Omega_g(1 - \Theta)\end{aligned}\tag{5.4}$$

La simulación se inicializó con $N = 1000$ nadadores con orientaciones al azar y se promedió para cada tiempo el desplazamiento cuadrático medio sobre toda la población.

En el caso de micronadadores que siguen estrategias de corridas y tumbos, existen dos procesos independientes que degradan la correlación de la dirección de movimiento: la difusión rotacional y los tumbos. Su efecto conjunto puede observarse en la función correlación de velocidades $C_{vv}(t) = \langle \mathbf{v}(t) \cdot \mathbf{v}(0) \rangle$. Debido a que imponemos la constancia de la velocidad de traslación, la función correlación corresponde en este caso a $C_{vv}(t) = v_0^2 C_{\varphi\varphi}(t)$. En la figura 5.2 es posible observar cómo aquellos nadadores cuyas corridas son de mayor duración, como s_1 y s_2 , presentan tiempos de correlación mayores que los demás nadadores. Algo similar puede concluirse con respecto al ángulo medio de giro en un tumbo. Aquellos nadadores para los que $\langle\phi\rangle$ toma valores más pequeños y por lo tanto cuentan con una persistencia mayor, muestran tiempos de correlación más grandes que los nadadores con menor persistencia, tal como cabía esperar. Esto puede verse claramente al comparar las curvas correspondientes a los nadadores s_3 , s_7 y s_5 , cuya persistencia disminuye en ese orden, mientras que sus velocidades y la duración de sus corridas son iguales en los tres casos. Es interesante notar que esta diferencia entre s_3 y s_7 , la cual como veremos afecta notablemente al coeficiente de difusión y a la interacción con las paredes, proviene únicamente de tener en cuenta la persistencia del movimiento. Es posiblemente la ausencia de este elemento lo que explica la diferencia de los resultados obtenidos por [Wan et al. (2008)] con respecto a los experimentos de direccionamiento realizados por [Galajda et al. (2007)], como veremos en la sección 5.6.

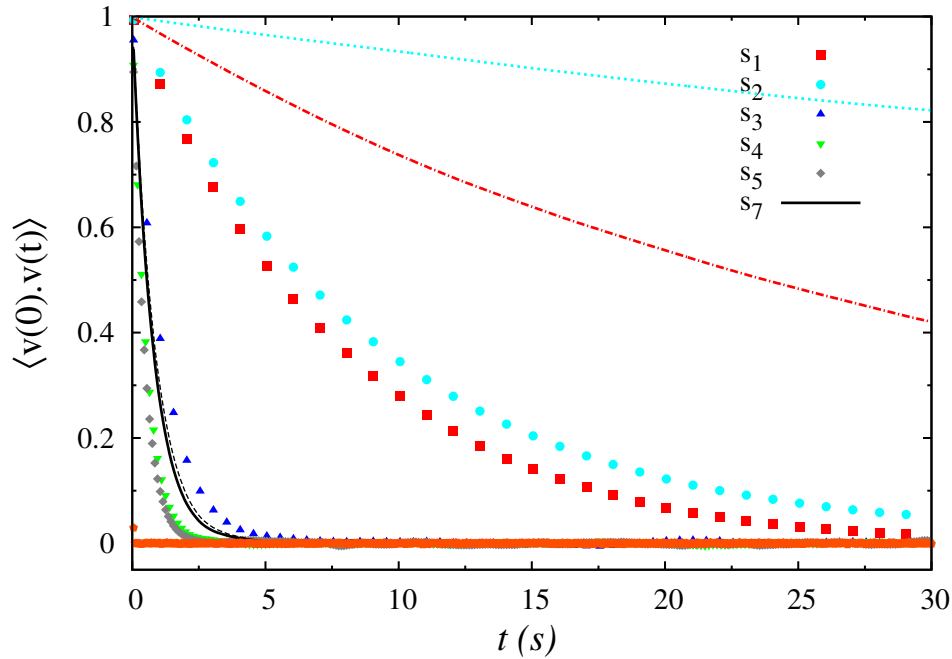


Figura 5.2: Función correlación de velocidad para diferentes nadadores autopropulsados. Los parámetros de motilidad para cada s_i pueden verse en la Tabla 5.1. La línea de puntos y rayas, la de puntos y la de rayas corresponde respectivamente a los nadadores s_1 , s_2 y s_7 en el límite de D_r cuando tiende a cero.

La figura 5.2 nos da al mismo tiempo información sobre la importancia relativa de la difusión rotacional para distintos nadadores. La línea sólida correspondiente a s_7 con difusión rotacional muestra una correlación apenas menor a la línea a trazos correspondiente al mismo nadador en ausencia de fluctuaciones. La pequeña diferencia entre estas dos curvas muestra que para este tipo de nadadores el tiempo de correlación es marcadamente dependiente de la duración de las corridas. De hecho, ajustando los resultados por una función exponencial de la forma $e^{-t/\tau_{vv}}$ se obtiene un tiempo de decorrelación $\tau_{vv,s7} = 0,8 s$, que es prácticamente igual a la duración media de las corridas para este nadador ($\tau_{s7} = 0,86 s$). El extremo opuesto es ejemplificado por los nadadores s_1 y s_2 , para los cuales los tiempos de decorrelación son respectivamente $\tau_{vv,s1} = 7,9 s$ y $\tau_{vv,s2} = 8,9 s$. Estos tiempos son mayormente determinados por las fluctuaciones de la dirección, tal como queda demostrado si se estudia el comportamiento de la función correlación en ausencia de ellas. En este límite, los tiempos de correlación aumentan significativamente, siendo para el primer nadador $\tau_{vv,s1} = 43,2 s$ y para el segundo $\tau_{vv,s2} = 138,7 s$.

En base al análisis precedente podemos decir que los microorganismos autopropulsados que siguen una estrategia de movimiento de corridas y tumbos pueden dividirse en dos grupos. En un grupo estarían los nadadores cuya difusión es limitada por los efectos de la

difusión rotacional, tal como sucede con s_1 y s_2 . Para calcular el coeficiente de difusión de estos nadadores emplearemos por lo tanto la ecuación 3.6. Los demás nadadores considerados hasta aquí se ubicarán en un segundo grupo para el cual el tiempo de decorrelación es fuertemente dependiente de la estrategia de movimiento. Para este segundo grupo emplearemos por lo tanto en el cálculo del coeficiente de difusión la ecuación 3.5. En la figura 5.3 puede verse el desplazamiento cuadrático medio para todas las especies. Para todos los nadadores, excepto s_6 , el desplazamiento cuadrático medio aumenta como $\sim t^2$ a tiempos cortos y $\sim t$ a tiempos largos. La transición entre estos dos regímenes ocurre para cada nadador a un tiempo diferente, aproximadamente cuando $t \simeq \tau_{vv,si}$. Esto explica porqué para s_6 el crecimiento es lineal a lo largo de todo el intervalo de tiempos mostrado en la figura, ya que $\tau_{vv,s6} \simeq 0,01$ s.

5.5. Acumulación

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, uno de los efectos más importantes que se observan al confinar una población de microorganismos es su tendencia a acumularse sobre las paredes que obstaculizan su movimiento. A continuación, se estudia este fenómeno dejando de lado las interacciones hidrodinámicas y poniendo el énfasis en

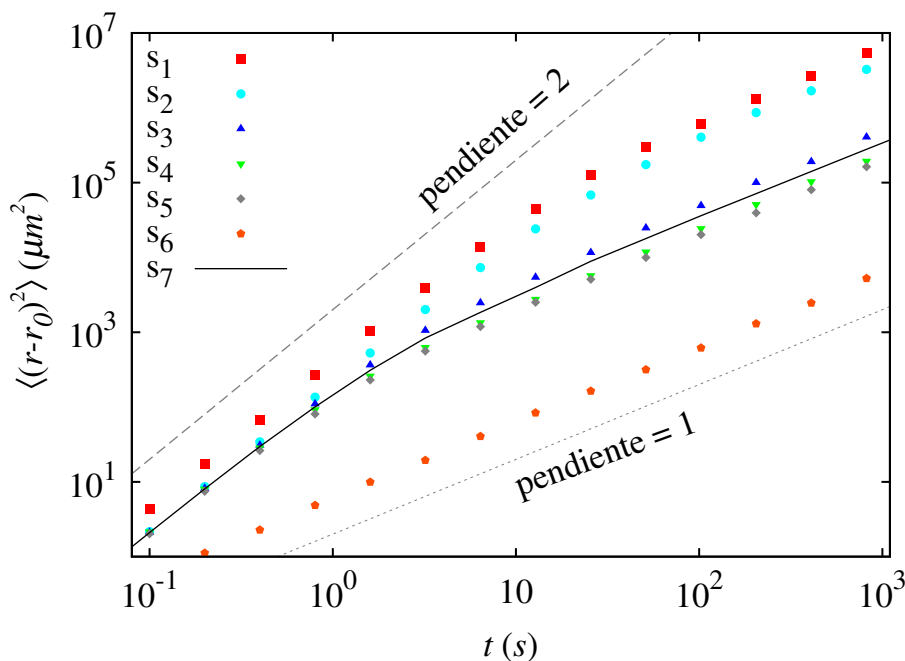


Figura 5.3: Desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para los nadadores de la Tabla 5.1.

los efectos producidos por las colisiones con la pared. En esta aproximación al problema, la difusión rotacional es la encargada de liberar al nadador de la pared por medio de pequeños cambios de dirección. En ausencia absoluta de difusión rotacional, si se deja de lado el efecto de los tumbos, los nadadores deberían llegar a una pared y quedarse nadando sobre ella por un tiempo indefinido, con lo cual, luego de un dado tiempo, todos los nadadores se encontrarían sobre las paredes del contenedor. Por el contrario, si la difusión rotacional es muy grande no pasaría mucho tiempo entre la llegada de un nadador a una pared y su escape, con lo cual la distribución de células en el espacio sería homogénea. Como veremos a continuación, la distribución final de nadadores que se obtiene para distintas poblaciones se ubica en algún punto intermedio entre estos dos casos extremos y es altamente dependiente de sus parámetros de movimiento.

Para este estudio volvieron a introducirse las interacciones con las paredes, de modo que las ecuaciones empleadas fueron:

$$\begin{aligned}\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} &= v_0 \hat{\mathbf{e}}_v + \frac{1}{\gamma} (\mathbf{F}_i^p + \mathbf{F}_i^n) \\ \frac{d\varphi_i(t)}{dt} &= (\sqrt{2D_r\eta(t)})\Theta + \Omega_g(1 - \Theta)\end{aligned}\tag{5.5}$$

En la figura 5.4 puede verse la distribución espacial de distintos nadadores en una caja cuadrada de $200 \mu m$ de lado. Los resultados fueron obtenidos por medio de simulaciones independientes para los distintos nadadores s_i enumerados en la Tabla 5.1. En cada caso se inició el sistema con una distribución homogénea de 1250 células en el interior de una caja cuadrada de $200 \mu m$ de lado y se lo dejó evolucionar durante 2×10^6 pasos temporales equivalentes a $\sim 16,6$ minutos reales usando un paso temporal de $5 \times 10^{-3} s$ de modo de asegurar que el sistema se encontrara en estado estacionario. Luego de terminado el transitorio, se dejó evolucionar el sistema durante otros 10^7 pasos temporales, durante los cuales se midió el número de células en función de la distancia a cada pared cada 2000 pasos, para asegurar que las mediciones fueran independientes. Los resultados graficados representan la densidad de probabilidad por unidad de longitud, promediada en el tiempo y sobre las dos direcciones x e y , de encontrar un nadador a una determinada distancia de una pared.

Las distribuciones graficadas en la figura 5.4 muestran una importante acumulación de nadadores cerca de las paredes de la caja. La única población que no presenta acumulación es la s_6 . El comportamiento de estos nadadores contrasta con la acumulación mostrada por la población s_3 , cuyos parámetros de movimiento son exactamente los mismos que los de la población s_6 excepto porque la duración media de las corridas son de $0,86 s$ y $0,01 s$ respectivamente. Esta comparación arroja luz sobre el mecanismo que conduce a la acumulación: mientras más prolongadas sean las corridas mayor será la acumulación, sencillamente porque una mayor frecuencia de tumbos facilita al nadador la elección de una nueva dirección de movimiento que lo aleje de la pared con la que interactúa. Algo similar ocurre con respecto a la persistencia del movimiento, es decir, con el cambio medio de dirección de un nadador durante un tumbo. Si prestamos atención a lo que ocurre con

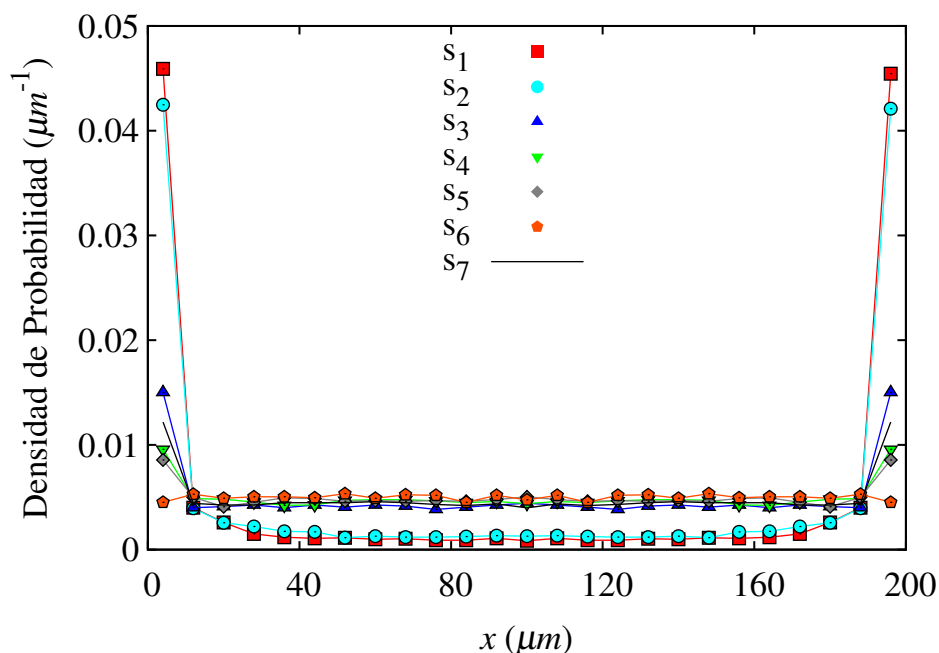


Figura 5.4: Acumulación de nadadores de diferentes especies sobre las paredes laterales de una caja cuadrada de $200 \mu\text{m}$ de lado. Los parámetros de movimiento de los distintos nadadores s_i corresponden a los datos de la Tabla 5.1.

los nadadores s_3 , s_4 y s_5 , para los cuales la velocidad y la duración de las corridas son muy similares, vemos que la acumulación en la pared de estos nadadores es tanto mayor cuanto menor es $\langle\phi\rangle$. Finalmente, cabe destacar que aunque la dimensionalidad del sistema no es la misma que en los experimentos, la acumulación obtenida para s_1 se compara bien con los resultados experimentales encontrados por [Berke et al. (2008); Li y Tang (2009)], mientras que la acumulación de s_3 se compara bien con los resultados experimentales encontrados por [Miño et al. (2011)].

Otro elemento interesante de estos resultados es que las poblaciones se ordenan de mayor a menor densidad sobre las paredes exactamente en el mismo orden que los hacen con respecto a la difusión mostrada en la figura 5.3. Esto no es de extrañar pues, como se discutió previamente, una mayor difusión está emparentada con una mayor correlación temporal de las direcciones de movimiento, mientras que la posibilidad de desprenderse de las paredes y disminuir la acumulación requiere de una correlación en las direcciones que no dure demasiado tiempo. De este modo, las poblaciones de nadadores con coeficientes de difusión mayores tendrán una capacidad limitada para desprenderse de las paredes, mientras que lo opuesto ocurrirá con aquellas poblaciones que se caractericen por un coeficiente de difusión menor.

5.6. Direccionamiento

En esta sección se investiga cómo depende la rectificación del movimiento de una población de bacterias, tal como fue propuesta originalmente por Galajda, con respecto a los parámetros geométricos del contenedor y de las características de movimiento de cada población, empleando parámetros de movimiento realistas. Para esto, se utilizó una geometría como la que se muestra en la Figura 5.5, la cual está basada en los experimentos realizados por [Galajda et al. (2007)]. Tal como fuera demostrado en dichos experimentos, la forma de las barreras facilita el desplazamiento de las bacterias desde la cámara izquierda (a la que indicaremos con el número 1) hacia la cámara derecha (número 2), y lo dificulta en el sentido contrario. Al igual que en [Galajda et al. (2007); Wan et al. (2008)] definimos un *coeficiente de rectificación* como el cociente entre las densidades de células a uno y otro lado de la barrera, $r(t) = \rho_2(t)/\rho_1(t)$, para cuantificar el direccionamiento.

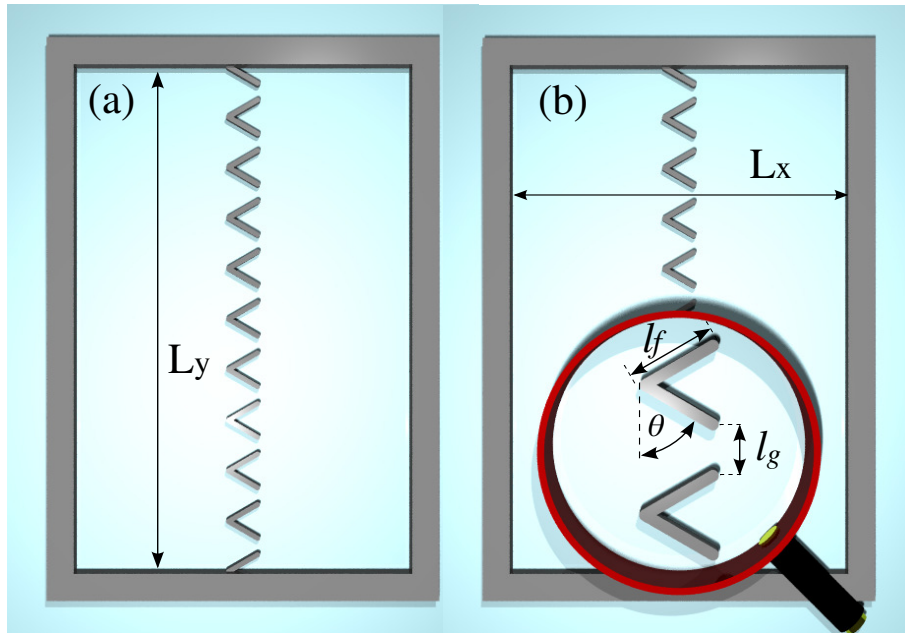


Figura 5.5: Vista superior de la cámara contenedora empleada en las simulaciones. (a) La cámara de tan solo $20 \mu\text{m}$ de profundidad está dividida en dos partes iguales por una barrera formada por N_f embudos equidistantes. El ancho L_y de la caja se adapta según sea necesario de acuerdo a las dimensiones de los embudos. (b) Imagen agrandada para mostrar el detalle de la geometría de cada embudo, caracterizada por la longitud l_f de las paredes que los forman, el ángulo θ y la separación l_g entre embudos sucesivos.

Cada simulación es inicializada con una distribución homogénea de células a ambos lados de la caja, $\rho_1(t) = \rho_2(t)$. La cantidad total N_c de células se elige de modo tal que la fracción de área $N_c A_c / A$ permanezca constante si las dimensiones del contenedor varían,

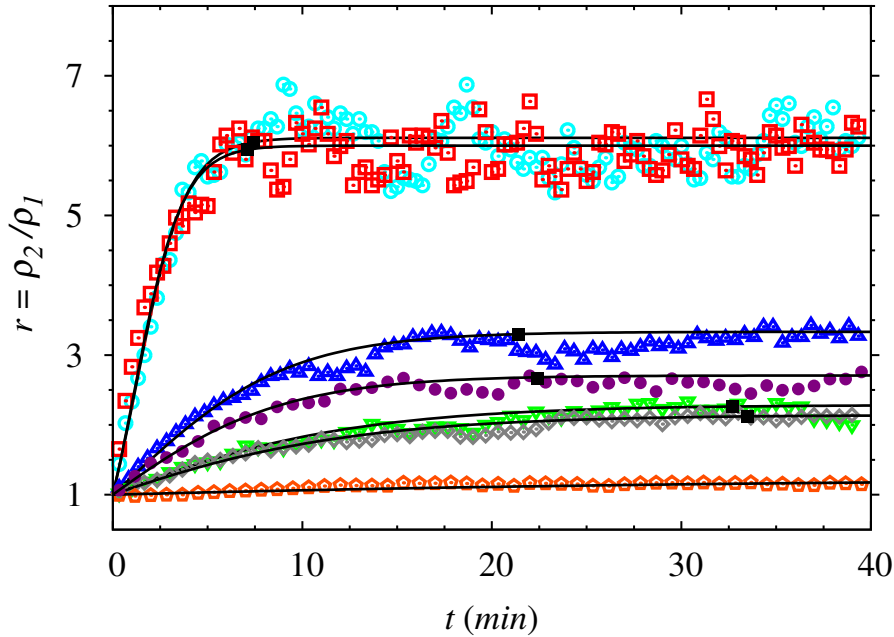


Figura 5.6: Rectificación en función del tiempo para los distintos nadadores: s_1 (cuadrados rojos), s_2 (círculos celestes), s_3 (triángulos azules), s_4 (triángulos verdes hacia abajo), s_5 (rombos grises), s_6 (pentágonos naranja) y s_7 (círculos violeta). Los parámetros geométricos fueron elegidos para representar las condiciones experimentales del trabajo de Galajda (Galajda et al. (2007)): $N_f = 13$, $l_f = 27 \mu m$, $l_g = 3,8 \mu m$, $\theta = 60^\circ$, y $L_x = L_y = 400 \mu m$. Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos empleando la ecuación 5.6. El final del período transitorio es indicado en todos los casos con un cuadrado negro, obtenido mediante la ecuación 5.7 para $\chi = 0,99$.

siendo A_c el área de una célula y A la del contenedor. Utilizando $r_c = 0,5 \mu m$ para el radio de los discos que representan a las células, la fracción de área fue fijada en 0,0785 para todas las simulaciones, de modo de asegurar siempre que el sistema se encuentra suficientemente diluido con el fin de evitar la aparición de fenómenos de movimiento colectivo [Henkes et al. (2011); Sokolov et al. (2007)]. En la Figura 5.6 puede observarse la evolución temporal de la rectificación para los nadadores descritos en la Tabla 5.1. En todos los casos se observa un período transitorio de duración variable durante el cual la rectificación aumenta monótonamente a medida que más células se acumulan en la cámara derecha de la caja. Eventualmente el número de células a la derecha de la caja es suficientemente mayor al número de células del lado izquierdo para que la cantidad de células que cruzan la barrera por unidad de tiempo sea igual en ambos sentidos, alcanzándose así el estado estacionario.

Resulta muy interesante notar que los distintos nadadores s_i se ordenan según su máxima rectificación exactamente de la misma manera que según su difusión y su acumulación

en paredes, tal como muestran las Figuras 5.3 y 5.4 respectivamente. Esta conclusión debe extrapolarse con cuidado, sin embargo, tal como demuestran los resultados de Kantsler et al. (2013) quienes mostraron experimentalmente que la interacción entre un nadador y una pared es fundamentalmente diferente según la posición de los flagelos respecto a la dirección de movimiento, hecho éste predicho por la teoría [Lauga y Powers (2009)].

Los nadadores caracterizados por corridas largas (s_1 y s_2) alcanzan aproximadamente el doble de rectificación que la *E. coli* sin mutaciones (s_3). La diferencia entre s_1 y s_2 es sin embargo sumamente pequeña teniendo en cuenta la gran diferencia que existe entre sus parámetros de motilidad, lo que parece indicar que la menor velocidad de s_2 con respecto a la de s_1 se compensa por la mayor duración de sus corridas. La rectificación que encontramos para los nadadores s_3 es $r \sim 3,3$, un resultado que se compara muy bien con su análogo experimental publicado en [Galajda et al. (2007)]. Esto representa una mejora importante con respecto al modelo presentado en [Wan et al. (2008)]. Por otro lado cabe destacar que la duración del transitorio para s_3 en nuestras simulaciones es 21,4 *min*, un tiempo considerablemente menor que los 80 *min* medidos experimentalmente. Las razones que pueden explicar esta discrepancia son diversas, entre las que cabe destacar la posibilidad de que la velocidad de las bacterias nadando sobre las paredes sea menor a su velocidad lejos de estas [Lauga y Powers (2009); Frymier et al. (1995)] y que la velocidad de las bacterias cambie a lo largo del experimento debido al confinamiento y los cambios ambientales asociados con el mismo, tal como hemos comprobado experimentalmente en el caso de células espermáticas. Otro punto que es importante resaltar es la rectificación nula obtenida para s_6 debido a la corta duración de las corridas que caracteriza a los nadadores de esta población, impidiéndoles registrar la geometría del substrato (Fig. 5.4).

Un modelo sencillo puede construirse para la rectificación de células en una geometría como la indicada en la figura 5.5. Si las concentraciones iniciales a ambos lados de la caja son iguales y se asigna una probabilidad por unidad de tiempo α de que las células que están en el lado izquierdo crucen al lado derecho y una probabilidad por unidad de tiempo β de que las células crucen la barrera en sentido contrario, es posible demostrar que la evolución de la rectificación estará dada por

$$r(t) = \frac{\rho_2(t)}{\rho_1(t)} = \frac{2\alpha + (\beta - \alpha)e^{-(\alpha+\beta)t}}{2\beta - (\beta - \alpha)e^{-(\alpha+\beta)t}} \quad (5.6)$$

Si bien este modelo es muy simple (para un modelo más elaborado véase [Tailleur y Cates (2009)]), nos permite obtener un muy buen ajuste de la rectificación buscando los valores adecuados de α y β , tal como se muestra en la figura 5.6 en donde las líneas continuas muestran el ajuste de los resultados de las simulaciones para cada tipo de nadador. En base a este resultado es fácil mostrar que la rectificación total obtenida en el límite de tiempos muy largos es $r(\infty) = \alpha/\beta$, y que el tiempo t_χ necesario para que el sistema alcance una fracción χ de la rectificación total está dado por

$$t_\chi = \frac{1}{\alpha + \beta} \ln \left(\frac{(\beta - \alpha)(\beta + \chi\alpha)}{2\alpha\beta(\chi - 1)} \right) \quad (5.7)$$

El final del transitorio para la rectificación de cada nadador es indicado en la figura 5.6 con un cuadrado negro que se obtuvo utilizando $\chi = 0,99$. Es interesante notar que hay una relación inversa entre la rectificación total y el tiempo que le lleva al sistema alcanzar el estado estacionario. Este elemento será retomado en el capítulo siguiente, cuando se investigue la posibilidad de emplear geometrías similares para separar poblaciones de nadadores según sus características de movimiento.

A continuación estudiamos el efecto que tienen sobre el proceso de rectificación los distintos parámetros geométricos. Partimos de una geometría definida por $N_f = 10$, $l_f = 15 \mu m$, $l_g = 2 \mu m$ y $\theta = 65^\circ$ y fuimos cambiando cada uno de manera independiente, manteniendo los demás valores fijos. La Figura 5.7 muestra los resultados correspondientes a la rectificación como función de (a) θ , (b) l_f y (c) l_g . Tal como se mencionó anteriormente, L_y se adapta a los cambios en la geometría y el número de partículas se ajusta de modo de mantener siempre la misma densidad promedio de células en el interior del contenedor. Cada punto de la figura corresponde a una simulación independiente y representa el valor final de la rectificación medido después de que el sistema alcanza su estado estacionario. Las barras de error corresponden a las fluctuaciones de r una vez terminado el período transitorio.

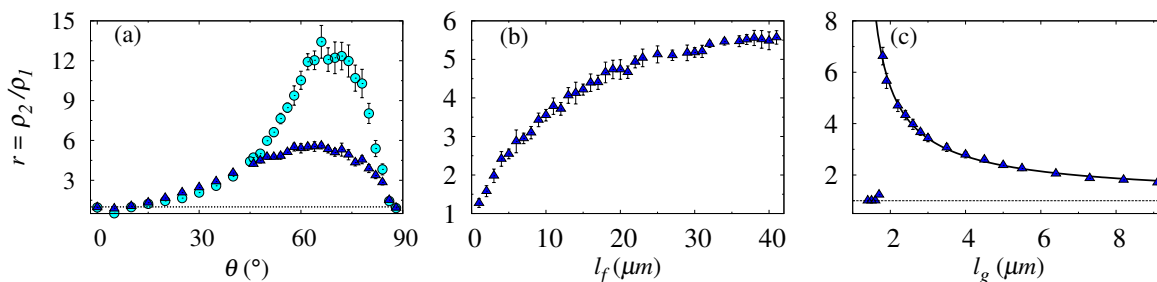


Figura 5.7: Rectificación en función de los parámetros geométricos que definen a los embudos. (a) Cambio de la rectificación debido al incremento de θ desde 0 hasta 90° para nadadores s_2 (círculos) y s_3 (triángulos). (b) Dependencia con el largo l_f de las paredes de los embudos para s_3 . (c) Dependencia de la rectificación con la separación l_g entre los embudos para nadadores s_3 .

En la figura 5.7(a) se puede ver que tanto la rectificación de los nadadores s_2 (círculos) como la de los nadadores s_3 (triángulos) muestran un valor óptimo para $\theta \sim 65^\circ$, si bien el valor máximo para la rectificación es marcadamente diferente. En el caso de la *E. coli* sin mutaciones, s_3 , la rectificación muestra un incremento monótono a medida que crece la longitud l_f de las paredes que conforman los embudos, tal como puede verse en la figura 5.7(b). El incremento de l_f disminuye la relación área-perímetro aumentando la capacidad de las paredes de guiar a las células; sin embargo, la rectificación alcanza un valor de saturación alrededor de $l_f = 40 \mu m$. Es posible conjeturar que este límite a la mejora de la rectificación tiene que ver con la duración de las corridas. Las paredes de

esta longitud son aproximadamente 3 veces más grandes que la longitud de una corrida típica de s_3 , con lo cual es esperable que tumbos intermedios degraden la probabilidad de que una célula que alcanza un embudo demasiado lejos de su abertura menor logren llegar hasta esta y atravesar la barrera. Finalmente, el panel (c) de la figura 5.7 muestra que una vez que la separación entre los embudos es suficientemente grande como para dejar pasar a las células a través de la misma, la rectificación es óptima y luego decrece como una ley de potencias con exponente $\gamma = 0,783$, valor este algo menor al $\gamma = 1$ predicho por Wan et al. (2008).

5.7. Conclusiones

En este capítulo se introdujo un modelo fenomenológico de la dinámica de microorganismos para investigar numéricamente las características del movimiento de distintas poblaciones de nadadores en el espacio libre de obstáculos y bajo confinamiento. El modelo incluye parámetros dinámicos importantes como la duración de las corridas, el ángulo de rotación provocado por tumbos y la alteración de la dirección de desplazamiento debida a fluctuaciones en el medio o al propio mecanismo de propulsión de cada nadador.

El modelo fue empleado en el estudio de la difusión de distintas poblaciones de nadadores. Los resultados mostraron que, dependiendo de los parámetros de movimiento que caracterizan a cada población, estas pueden clasificarse en poblaciones cuya difusión está limitada por la difusión rotacional o aquellas cuya difusión es aproximadamente proporcional a la duración de sus corridas. Independientemente de si se trata de poblaciones del primer o el segundo tipo, se encontró una correspondencia interesante entre la difusión de las poblaciones y su tendencia a acumularse sobre paredes cuando se encuentran bajo confinamiento. Estos dos elementos se combinan de modo tal que la misma correspondencia se observa entre el coeficiente de difusión de las poblaciones y el coeficiente de rectificación, r , que mide la eficiencia de obstáculos asimétricos como los empleados por [Galajda et al. (2007)] para el direccionamiento de las mismas. En particular, un resultado que cabe destacarse es que para la población s_3 , correspondiente a la *E. coli* empleada por Galajda en sus experimentos, se obtuvo un coeficiente de rectificación aproximadamente igual al valor encontrado experimentalmente sin la necesidad de utilizar parámetros de ajuste, lo que representa una clara mejora con respecto al trabajo de [Wan et al. (2008)]. Las simulaciones se utilizaron también para estudiar el efecto de la geometría de los obstáculos sobre la rectificación, hallándose un ángulo óptimo de apertura alrededor de los 65° y una dependencia de r con la separación entre embudos de $\approx l_g^{-0,783}$ distinta de la relación $\approx l_g^{-1}$ propuesta por [Wan et al. (2008)].

Para estimar la duración del período transitorio que el sistema requiere para alcanzar el estado estacionario, se derivó una ecuación que relaciona al coeficiente de rectificación con las tasas de salto entre los compartimentos del contenedor en el sentido fácil y difícil definido por la geometría de los obstáculos. En la tabla 5.2 pueden verse las tasas obtenidas del ajuste de los datos graficados en la figura 5.6 y los valores de r y t_χ que de ellos

	Tasa de salto (sentido fácil)	Tasa de salto (sentido difícil)	Rectificación	Duración transitorio	Difusión
	α	β	$r = \alpha/\beta$	t_χ [min]	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
s_1	0.0114	0.0018	6.33	7,1	1788
s_2	0.0110	0.0018	6.1	7,4	1293
s_3	0.0030	0.0009	3.3	21,4	128
s_4	0.0016	0.0007	2.3	32,7	48
s_5	0.0015	0.0007	2.1	33,5	51
s_6	0.0003	0.0002	1.5	95,9	1,6
s_7	0.0026	0.0010	2.6	21,7	87

Tabla 5.2: Tasas de salto en los sentidos fácil (α) y difícil (β) obtenidas ajustando la ecuación 5.6 con los datos de la figura 5.6. Rectificación final, duración del tiempo transitorio, t_χ , correspondiente a $\chi = 0,99$ y coeficiente de difusión para cada población investigada.

se derivan. La tabla muestra la correlación mencionada entre D y r , así como la relación inversa que existe entre r y t_χ . Esta característica del direccionamiento puede ser aprovechada, como se verá en el capítulo siguiente, para separar poblaciones caracterizadas por parámetros de movimiento diferentes.

Capítulo 6

Direccionamiento y Separación de bacterias *E. coli*

Resumen:

En este capítulo se investiga la posibilidad de aprovechar el mecanismo de direccionamiento estudiado en el capítulo anterior para la separación de poblaciones que se diferencian entre sí por sus características de movimiento. Inicialmente se reconoce la posibilidad de multiplicar la capacidad de concentración de los dispositivos utilizando múltiples filas de embudos y, luego, que el tiempo requerido para que el sistema alcance su estado estacionario es altamente dependiente de los parámetros de motilidad de las poblaciones involucradas. La capacidad de separación de dispositivos con estas nuevas geometrías se demuestra primero observando los perfiles espaciales de concentración de cada población como función del tiempo. Finalmente se definen dos cantidades, el tiempo de extracción y la eficiencia de extracción, para evaluar cuantitativamente la eficiencia de separación de los dispositivos estudiados.

6.1. Introducción

Inspirados por el desarrollo de microgeometrías capaces de separar bacterias nadadoras en función de su tamaño y edad [Hulme et al. (2008)], se propuso investigar la factibilidad de emplear las propiedades de la rectificación por medio de microgeometrías, que se estudiaron en el capítulo anterior, para separar células con distintas características de movimiento. Como se vio, tanto el valor final de la rectificación como la duración del período transitorio dependen fuertemente de los parámetros de motilidad. A continuación se mostrará que el empleo de múltiples barreras de embudos produce un arrastre efectivo sobre la población en su conjunto en la dirección fácil de movimiento. Estas dos observaciones combinadas conducen a la siguiente pregunta: ¿qué ocurriría si en lugar de inocular una única población se inocularan poblaciones mixtas? En la realidad, incluso cuando la población inoculada se cree completamente uniforme, conviven células con capacidades

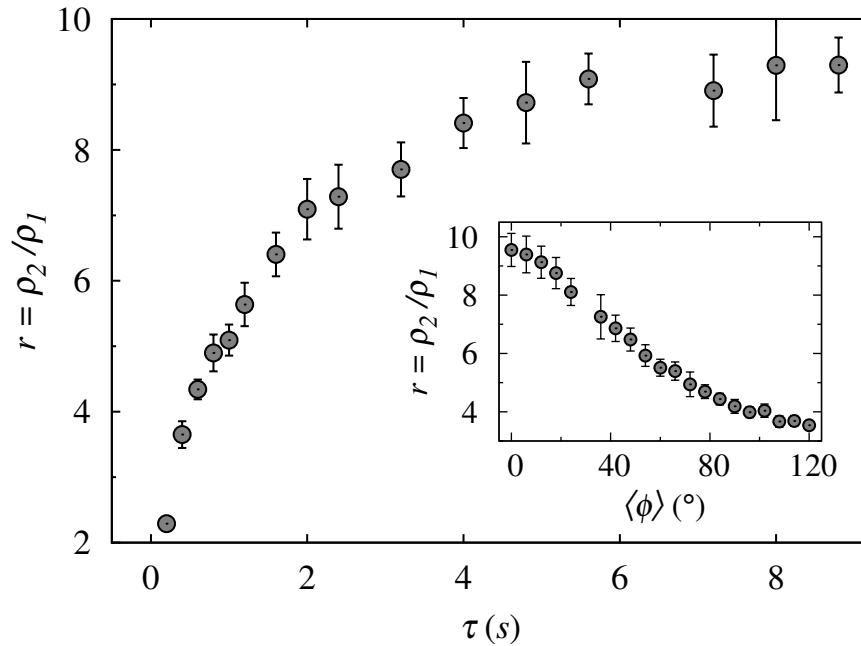


Figura 6.1: Dependencia de la rectificación con los parámetros de motilidad. Rectificación en función de τ para una persistencia $\langle \phi \rangle = 60^\circ$. Figura interior: r en función de $\langle \phi \rangle$ para $\tau = 1$ s. Los parámetros geométricos usados para estas simulaciones fueron $N_f = 10$, $l_f = 15 \mu m$, $l_g = 2 \mu m$ y $\theta = 60^\circ$.

de movimiento distintas unas de otras. ¿Podría emplearse el tipo de geometrías estudiadas hasta aquí para seleccionar, por ejemplo, células de una determinada velocidad, o caracterizadas por duración definida de sus corridas?

6.2. Direccionamiento vs. parámetros dinámicos

En el capítulo anterior se estudió el direccionamiento de distintas poblaciones y se observó que para cada una de ellas el coeficiente de rectificación variaba de acuerdo con sus parámetros de movimiento. Para investigar esta dependencia con más detalle, se estudiará a continuación como cambia la rectificación al variar de manera continua la duración de las corridas τ y de la persistencia $\langle \phi \rangle$, pues de estas respuestas dependerá la eficiencia con que se puedan separar distintas poblaciones. Los resultados se muestran en la figura 6.1. Al igual que en la figura 5.6 puede observarse cómo la rectificación se incrementa a medida que aumenta la duración de las corridas. El incremento es considerable en la primer parte de la curva, pasando de $r = 1$ a $r = 6,5$ para τ en el intervalo de 0 a 2 s. Para valores de τ mayores a 5 s la rectificación muestra una saturación, siendo esta consistente con el resultado presentado previamente para los nadadores s_1 y s_2 (ver Capítulo 5). Como

vimos, la rectificación máxima para estos nadadores es aproximadamente igual a pesar de que $\tau_{s1} = 6,3$ s mientras que $\tau_{s2} = 100$ s. En el panel interior de la misma figura se observa por el contrario una disminución de r en función de $\langle\phi\rangle$. Este es claramente el motivo de las diferentes rectificaciones obtenidas para los nadadores s_3 y s_7 , cuyos parámetros de motilidad son todos exactamente iguales excepto por $\langle\phi\rangle$ que es de 68° para el primero y 90° para el segundo (ver sección 5.6), y posiblemente uno de los elementos que disminuyen la capacidad del modelo original de Wan para reproducir los resultados experimentales utilizando parámetros de movimiento realistas [Wan et al. (2008)].

6.3. Separación de bacterias

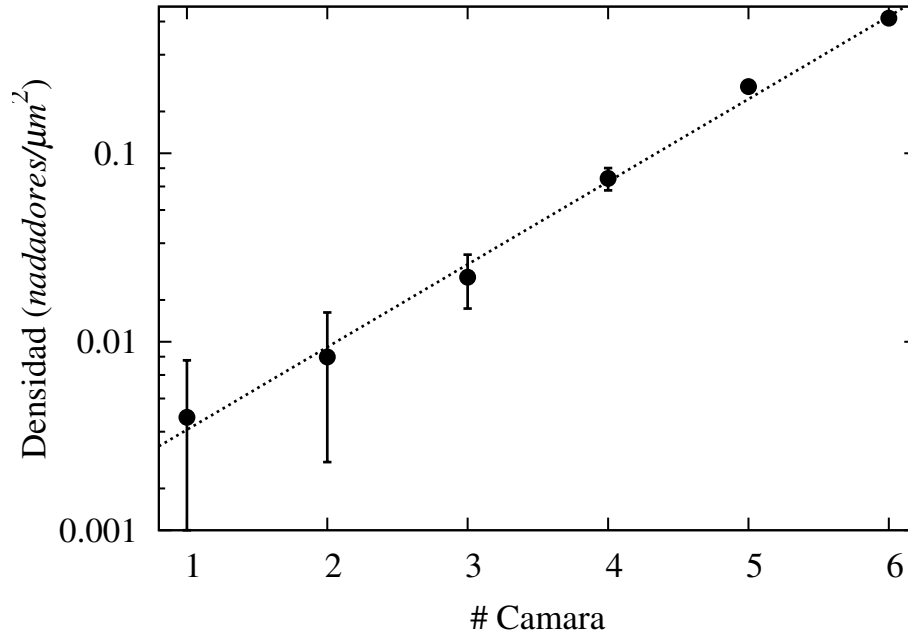


Figura 6.2: Acumulación exponencial de nadadores s_3 en un contenedor dividido en 6 cámaras por 5 barreras de 10 embudos cada una. La geometría corresponde a los siguientes parámetros: $l_f = 10 \mu\text{m}$, $l_g = 2 \mu\text{m}$, $\theta = 60^\circ$. La distancia entre barreras sucesivas es de $10 \mu\text{m}$.

Tal como se mostró experimentalmente en [Galajda et al. (2007)], si en lugar de utilizarse una única barrera de embudos se divide el contenedor empleando múltiples barreras, se produce un incremento exponencial de la concentración de células en la dirección fácil de movimiento definida por los embudos. Para comprobar este punto se realizaron simulaciones en un contenedor compuesto por 6 cámaras separadas entre sí por 5 barreras de

10 embudos cada una y se inocularon células del tipo s_3 a tiempo $t = 0$ en la cámara 1. La rectificación generada por cada una de las barreras conduce a una distribución final de la población en la que la concentración de células aumenta exponencialmente de una cámara a la siguiente, tal como se muestra en la figura 6.2. Esta distribución deja de ser estrictamente exponencial si el contenedor es suficientemente largo, pues en tal caso la población de nadadores comienza a desplazarse en conjunto siguiendo la dirección fácil de movimiento.

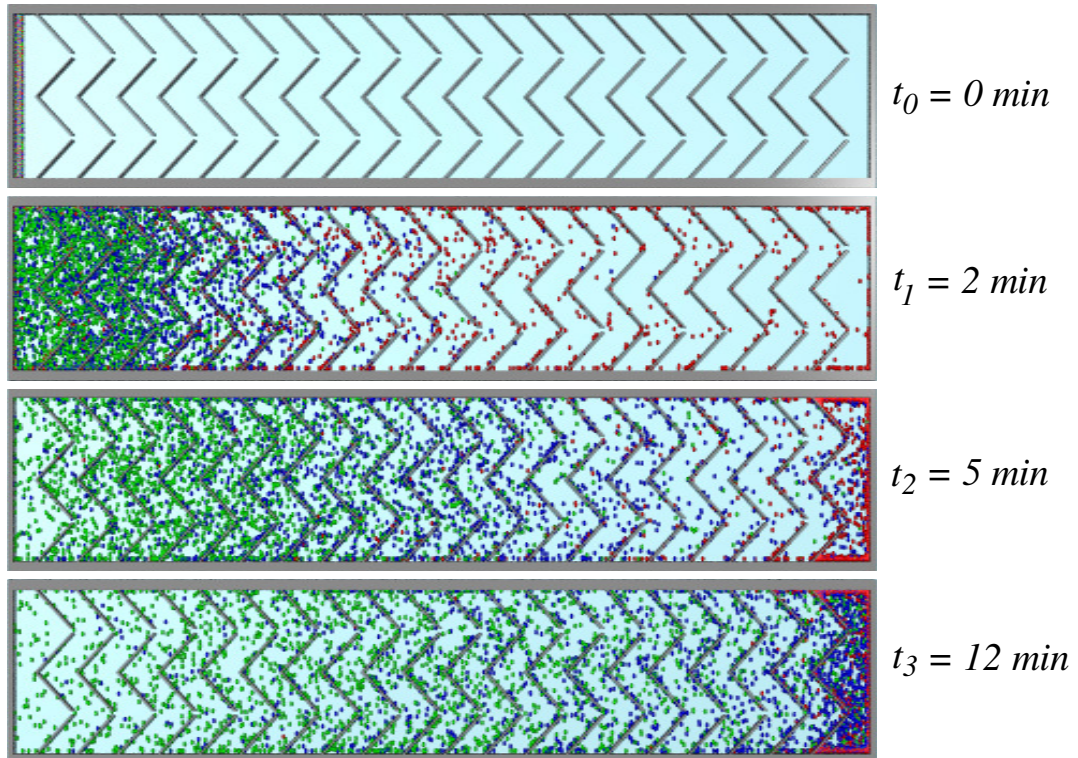


Figura 6.3: Distribución espacial de una mezcla de 3 poblaciones diferentes de bacterias *E. coli* en el interior de un contenedor con 20 barreras de 2 embudos cada una. Las distribuciones se muestran para 4 tiempos distintos. Las bacterias de la población s_1 , CheC497, están representadas por círculos rojos, la población s_3 , AW405, por círculos azules y la población s_4 , Unc602, por círculos verdes. Los parámetros geométricos son $L_x = 630 \mu m$, $L_x = 64 \mu m$, $l_f = 30 \mu m$, $l_g = 2 \mu m$, $\theta = 60^\circ$.

En la misma línea, aunque en un contexto algo distinto caracterizado por la preponderancia de efectos quimiotácticos, [Lambert et al. (2010)] mostró, también empleando contenedores con múltiples barreras, cómo una población de bacterias *E. coli* se desplaza cohesionada formando una onda viajera que avanza a lo largo del contenedor.

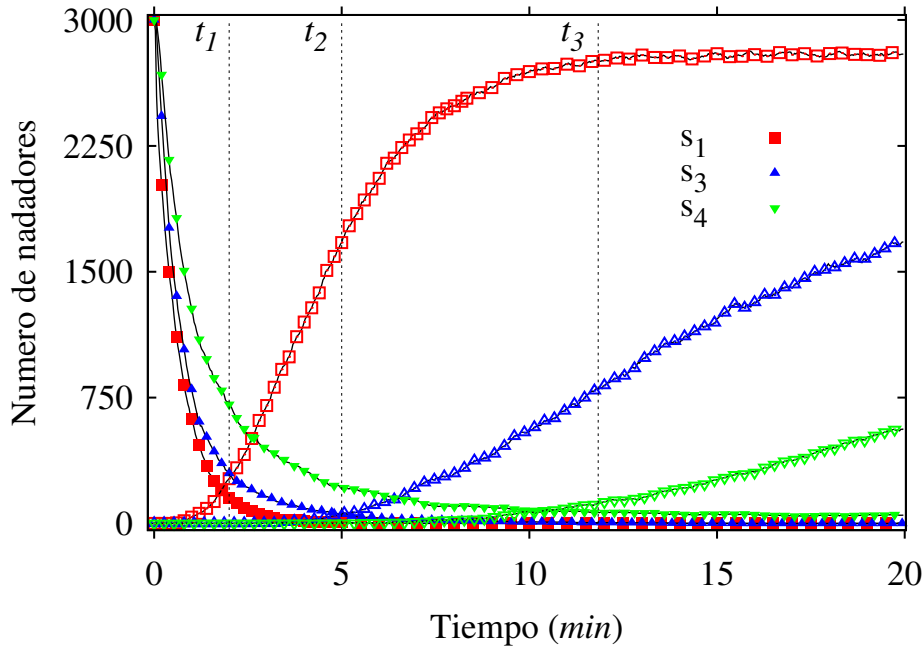


Figura 6.4: Distribución de las tres poblaciones como función del tiempo. Las curvas decrecientes con cuadrados llenos, s_1 , triángulos hacia arriba llenos, s_3 , y triángulos hacia abajo llenos, s_4 , corresponden a la distribución de nadadores en la primera cámara a la izquierda del contenedor, mientras que los símbolos vacíos muestran las correspondientes distribuciones en la última cámara a la derecha del contenedor. Los parámetros geométricos corresponden a los enumerados en la figura 6.3.

Para investigar la posibilidad de aprovechar los fenómenos mencionados en la separación de poblaciones se realizaron simulaciones de un sistema compuesto por tres tipos diferentes de nadadores, todos ellos inoculados en un extremo de una caja alargada y dividida por múltiples barreras de embudos. Las poblaciones elegidas fueron las s_1 , s_3 y s_4 descritas en el capítulo anterior, correspondientes a las tres clases de *E. coli* estudiadas por Berg et al. (1972). La geometría empleada puede verse en la figura 6.3. Está constituida por un contenedor de $630\mu\text{m} \times 64\mu\text{m}$, dividido en 21 cámaras por 20 barreras de 2 embudos cada una. La simulación se inicializa con proporciones iguales de los tres tipos de nadadores ubicados todos en el extremo izquierdo del contenedor. En ausencia de embudos la evolución del sistema concluiría con una distribución uniforme de nadadores a lo largo de todo el contenedor, pero la presencia de las barreras produce un avance efectivo en dirección al extremo opuesto cuya velocidad promedio depende de las características de motilidad de cada población. En la figura 6.3 puede verse el estado del sistema a distintos tiempos. 2 minutos después de la inoculación, las primeras células de la población más rápida, s_1 , comienzan a llegar al extremo opuesto del contenedor. Pasados los primeros 5

minutos se observan en la cámara de inoculación únicamente células del tipo s_4 , mientras que las otras dos poblaciones ya la han abandonado por completo. Pasados 12 minutos, prácticamente la totalidad de las células s_1 han atravesado el contenedor completo, mientras que las primeras células s_3 empiezan a llegar al final del recorrido. Todo esto puede observarse con más precisión en la figura 6.4 en donde se muestra la concentración de cada una de las poblaciones en la cámara de inoculación (símbolos llenos) y en el extremo opuesto del contenedor (símbolos vacíos), como función del tiempo. Si se observan las curvas ascendentes que muestran la acumulación de células de cada especie en el extremo derecho de la caja, es posible comprobar la existencia de una ventana temporal de unos 4 minutos durante los cuales sería posible extraer células s_1 en estado puro. Por supuesto, la duración de estos tiempos depende de la longitud total de la caja y del número de barreras. A la hora de diseñar las dimensiones para separar poblaciones específicas habrá que tener en cuenta tanto la necesidad de obtener ventanas temporales suficientemente grandes para la extracción de las poblaciones de interés en estado puro como los tiempos de vida, muerte y reproducción celular. Si bien la eficiencia del separador podría incrementarse por medio de una caja más grande, el tiempo de separación podría volverse prohibitivamente grande en virtud de estos fenómenos que no han sido incluidos en nuestras simulaciones (nacimiento, reproducción y muerte celular).

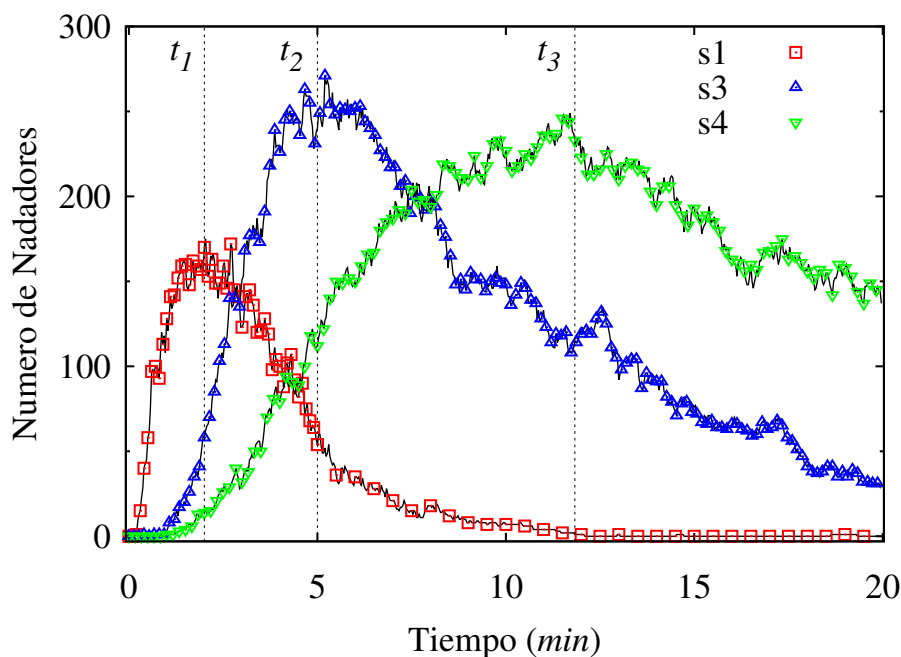


Figura 6.5: Distribución de las tres poblaciones, s_1 , s_3 y s_4 , como función del tiempo medidas en el centro del contenedor (cámara 11) como función del tiempo. Los parámetros geométricos corresponden a los enumerados en la figura 6.3.

En principio, la extracción de células podría no estar limitada a los extremos del contenedor, pues los avances en el diseño de dispositivos para el control microscópico de fluidos tales como válvulas y bombas permiten actualmente la fabricación de circuitos complejos capaces de manipular células individuales [Squires y Quake (2005); Leung et al. (2012)]. La extracción podría realizarse desde alguna cámara intermedia también, permitiendo una mayor flexibilidad al proceso de purificación. La figura 6.5 muestra la evolución de la concentración de células de cada una de las poblaciones en el punto medio entre ambos extremos del contenedor. En los tres casos, la cantidad de células es cero para el tiempo inicial, comienza a aumentar con una tasa proporcional a la velocidad de avance a lo largo del contenedor, alcanza un máximo y luego comienza a disminuir a medida que la mayor parte de la población se acerca al final del contenedor. En esta figura puede verse que los tiempos escogidos para mostrar el estado del sistema en la figura 6.3 corresponden respectivamente a los tiempos en que cada una de las poblaciones alcanza su concentración máxima en la mitad de la caja (tiempos señalados con líneas de puntos en las figuras 6.4 y 6.5).

6.4. Eficiencia del dispositivo

Los resultados de la sección anterior demuestran que es efectivamente posible separar poblaciones con características de movimiento diferentes empleando geometrías apropiadas. En esta sección se introducen dos cantidades que resultan útiles para evaluar bajo qué condiciones la separación es eficiente: el *tiempo de extracción* t^* y la *eficiencia de extracción* $\varepsilon\%$. Es evidente que la eficiencia de la separación no puede ser determinada en términos absolutos sino que será siempre una cantidad relativa dependiente de las poblaciones involucradas. Resulta necesario por lo tanto definir a t^* y a $\varepsilon\%$ en relación a una población que será tomada como referencia. En los resultados que se discuten a continuación, esta población de referencia será la *E. coli* wild type, s_3 . El *tiempo de extracción* de una población s_x distinta de s_3 se definirá como el intervalo de tiempo disponible para la extracción de células s_x en estado puro, en la última cámara del contenedor. Este intervalo es contado desde el tiempo t_1 de arribo a dicha cámara de la primer célula de la población más rápida (ya sea s_x o s_3) hasta el tiempo t_2 de arribo de la primera célula de la población que avanza más lentamente a lo largo del dispositivo. Esta definición determina por lo tanto el tiempo disponible para la extracción en estado completamente puro de células de la población que avanza a mayor velocidad. Sería por supuesto posible trabajar con una definición menos estricta del tiempo de extracción en la que, por ejemplo, se contemplara la posibilidad de extraer poblaciones con un cierto grado de pureza menor al 100%. Por su parte, la *eficiencia de extracción* será el porcentaje de células de la población más rápida que hayan arribado a la última cámara del contenedor entre t_1 y t_2 , con respecto al número de células totales de esa misma población que se inocularon inicialmente. El tiempo de extracción ofrece información muy útil a la hora de estudiar experimentalmente el sistema porque define la viabilidad o no de realizar la extracción en base a las dificultades que

se encuentren en el laboratorio. El tiempo de extracción debe ser suficientemente grande para posibilitar el vaciado de la cámara, según las características del mecanismo que se implemente a tal fin, pero a su vez debe cuidarse que el tiempo t_1 sea suficientemente corto para no generar otro tipo de dificultades, tales como requerir que las células pasen demasiado tiempo en el interior del contenedor con respecto a su tiempo de vida, o que se reproduzcan. También deben considerarse las tareas que se intenten realizar con ellas una vez depuradas. El porcentaje de células extraídas determina la utilidad del proceso de extracción y el número de células que deben inocularse, influyendo asimismo en las dimensiones de la cámara si se desea mantener la condición de baja densidad celular.

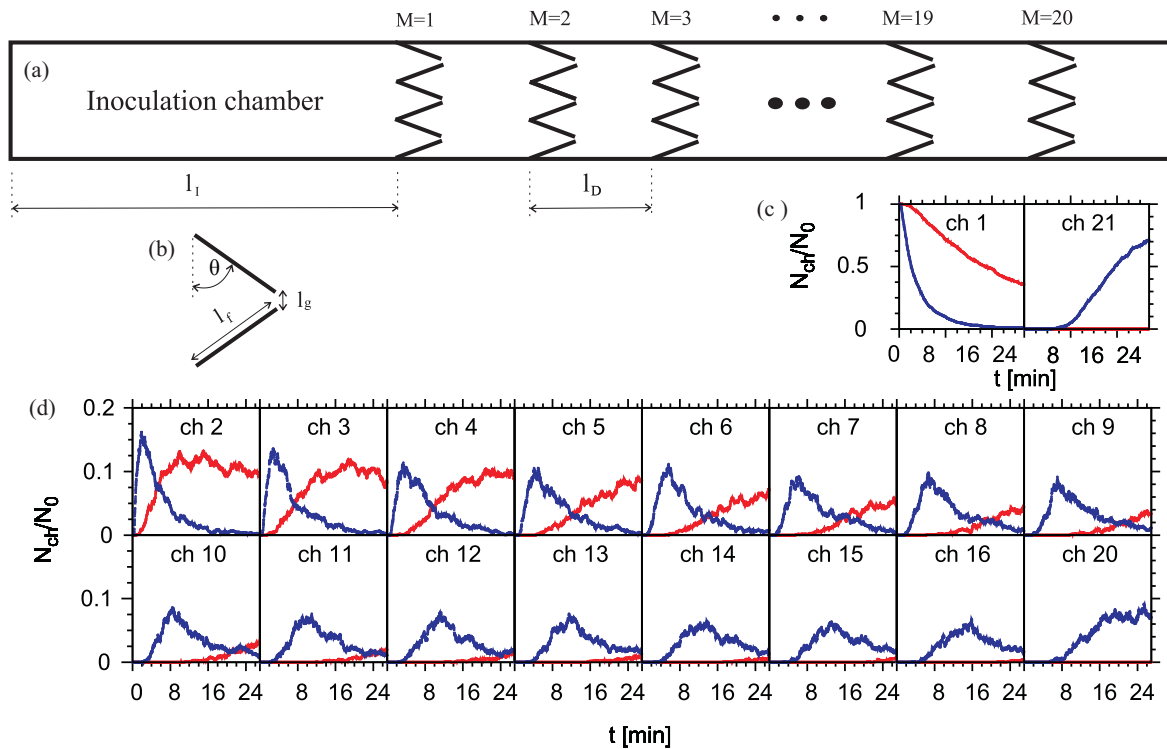


Figura 6.6: Esquema de la geometría empleada en las simulaciones. (a) El contenedor se divide en $M + 1$ cámaras por medio de M barreras de 3 embudos cada una. La primera cámara de la izquierda tiene una longitud l_i más grande que las demás l_D para asegurar la baja densidad de células en la inoculación. (b) Parámetros geométricos de los embudos. (c) Evolución temporal de la cantidad de células normalizada por el número de células inoculadas N_0 , en la primera y última cámara del contenedor. Las líneas azules corresponden a la población s_1 mientras que las líneas rojas corresponden a la población s_3 . (d) Idem a (c) para cada una de las cámaras restantes.

En la figura 6.6(a) y (b) se presenta la geometría empleada en las simulaciones. El esquema corresponde a un contenedor con 21 cámaras separadas por $M = 20$ barreras de 3 embudos cada una. La separación entre las barreras es de $l_D = 150 \mu m$ mientras que la cámara de inoculación (en el extremo izquierdo del esquema) tiene una longitud $l_i = 450 \mu m$ para asegurar la baja densidad inicial de las poblaciones. El número N_0 de células de cada población se elige de manera tal de iniciar la simulación con una fracción de ocupación de área igual a 0.05, calculada como el cociente entre el área total ocupada por las células y el área de la cámara de inoculación. Los parámetros correspondientes a la geometría de los embudos son $l_g = 2 \mu m$, $l_f = 30 \mu m$ y $\theta = 68^\circ$, que son los que optimizan el direccionamiento de s_3 , como se mostró en la sección 5.6.

En los paneles (c) y (d) de la figura 6.6 se puede observar la evolución temporal del número normalizado N_c/N_0 de células en cada cámara para dos poblaciones, s_1 y s_3 . Inicialmente las dos poblaciones son distribuidas homogéneamente en la cámara de inoculación. A medida que el tiempo transcurre, las células comienzan a salir de la cámara de inoculación (ver figura 6.6(c)) y viajan a lo largo del contenedor manteniendo una forma de onda aproximadamente constante, tal como se describe en [Lambert et al. (2010)]. En la figura 6.6(d) puede observarse la progresiva separación de las dos poblaciones a medida que avanzan a lo largo del contenedor. Repitiendo la simulación 30 veces tomando cada vez condiciones iniciales aleatorias para las posiciones y velocidades de cada nadador, se obtuvo un tiempo de extracción promedio $\langle t^* \rangle = 16 \text{ min}$ y una eficiencia $\varepsilon\% = 67 \pm 19\%$. Esta gran eficiencia en la separación se basa en que los nadadores de la población s_1 aventajan a los de la población s_3 por su mayor velocidad, la duración de corridas más prolongadas y su mayor persistencia, puesto que los primeros rotan tan solo 33° en promedio cada vez que dan un tumbo, lo que corresponde a menos de la mitad de los 68° rotados por los segundos. Esto asegura que la difusión translacional de los nadadores s_1 sea mucho mayor que la de los s_3 (ver Tabla 5.2) y también que pasen más tiempo sobre las paredes (ver figura 5.4), lo que les permite aprovechar mejor la geometría del contenedor.

En la figura 6.7 se muestran imágenes instantáneas del sistema correspondiente a la figura 6.6 para distintos tiempos. La figura 6.7(a) muestra como las células se encuentran distribuidas de manera homogénea en la cámara de inoculación al iniciar la simulación y cómo luego cada población avanza sobre el contenedor con velocidades diferentes. La velocidad de avance estimada para la población s_1 es de $5 \mu m/s$ aproximadamente y para la población s_3 es de $\sim 1 \mu m/s$, lo que explica la progresiva separación entre ambas. En la figura 6.7(b) puede verse que, en ausencia de los embudos, las poblaciones también tienden a separarse; sin embargo, la tendencia de ambas poblaciones a ocupar todo el espacio disponible de manera homogénea hace que solo una pequeña fracción de las células llegue a la región de extracción, disminuyendo drásticamente la eficacia del método.

Como se mencionó previamente, la velocidad, duración de corridas y persistencia en la dirección dan una enorme ventaja a las células de la población s_1 por sobre las de la población s_3 con respecto a su capacidad de avanzar por el contenedor. ¿Cómo influyen en la eficiencia para separar a las poblaciones cada uno de estos elementos por separado?

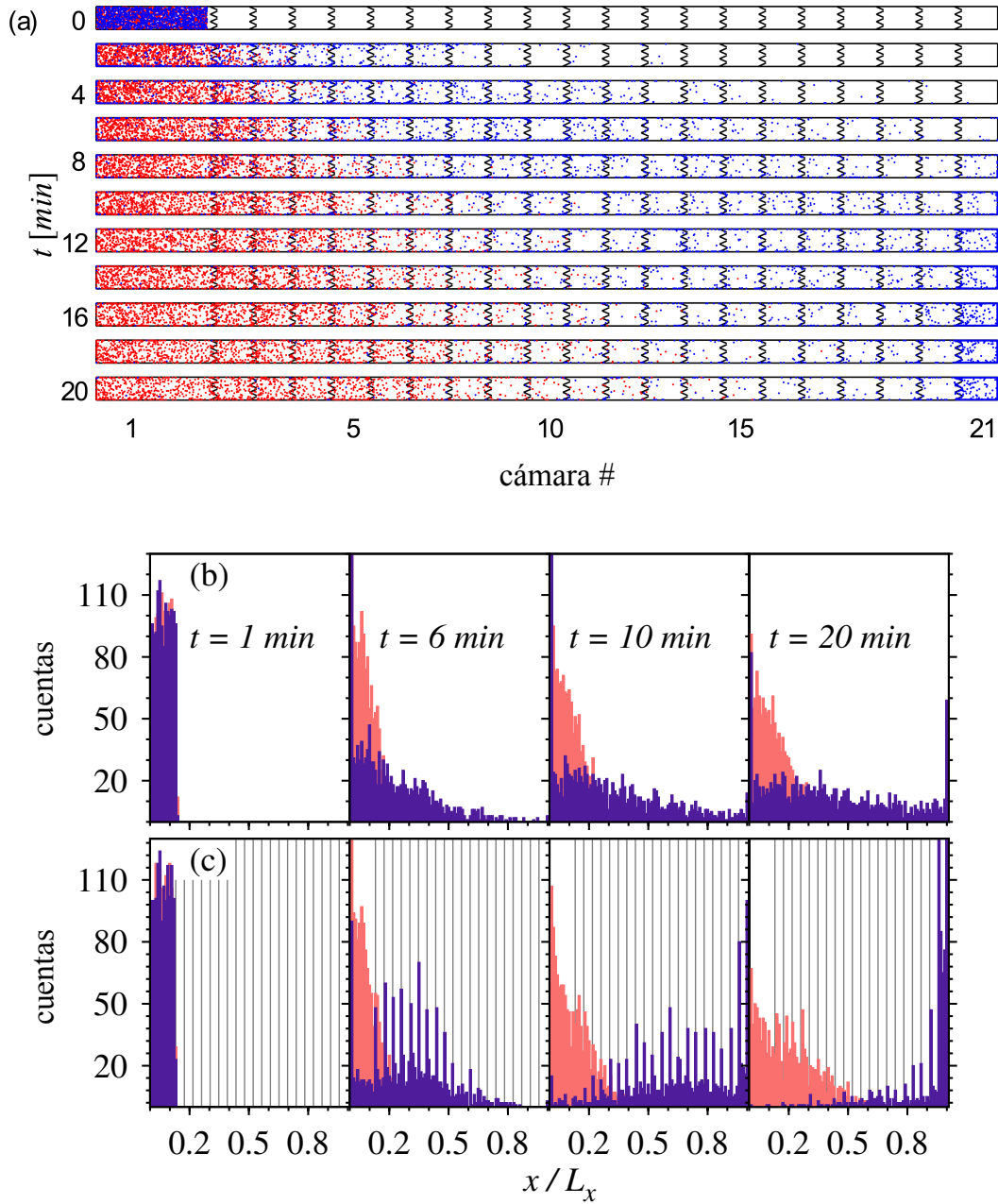


Figura 6.7: Distribución de dos poblaciones dentro del contenedor en función del tiempo. a) Imágenes instantáneas que muestran la ubicación de las células de la población rápida (color azul) y la lenta (color rojo) luego de la inoculación y cada 2 minutos. b) Evolución de la distribución de las poblaciones a lo largo de la caja sin obstáculos y c) con obstáculos.

Para investigar el efecto de estas variables con independencia de las demás se estudia a continuación la posibilidad de extraer una población hipotética s_x inoculada en el conte-

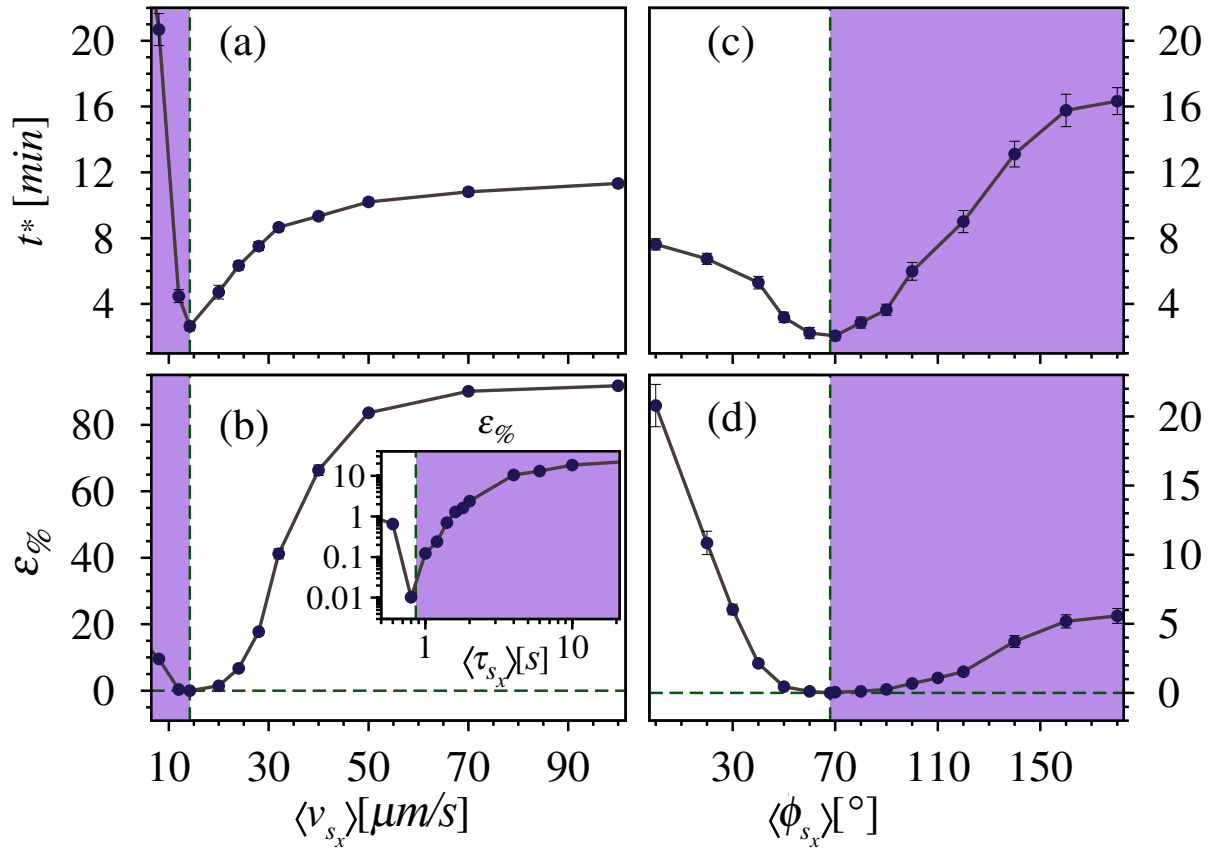


Figura 6.8: Eficiencia y tiempo de extracción en función de los parámetros de motilidad de una población hipotética s_x con respecto a la población s_3 . a) Tiempo de extracción t^* en función de la velocidad de la población s_x y b) en función de su persistencia. c) Eficiencia de extracción en función de la velocidad y d) en función de la persistencia de s_x . El panel interior de (c) muestra la eficiencia de extracción en función de la duración de las corridas de la población hipotética. En todos los casos, el área sombreada indica aquellos casos en los que la población extraída es la s_3 , mientras que en los otros casos la población extraída es la s_x .

nedor conjuntamente con la población s_3 . La población s_x se caracteriza por tener todos sus parámetros de movimiento iguales a los de la población s_3 excepto por uno de ellos a la vez. Los parámetros correspondientes a la velocidad $\langle v_{s_x} \rangle$, la persistencia $\langle \phi_{s_x} \rangle$ y la duración de las corridas $\langle \tau_{s_x} \rangle$ se modifican uno por vez de manera continua y los resultados pueden apreciarse en la figura 6.8.

En el panel (a) de la figura 6.8 puede verse como depende el tiempo de extracción t^* al variar la velocidad de nado de la población s_x . Para velocidades v_{s_x} menores a $v_{s_3} = 14,8 \mu\text{m/s}$ (región sombreada), la población s_3 llega primero al final del contenedor y será por lo tanto la población extraída. Como es lógico, el tiempo t^* es divergentemente

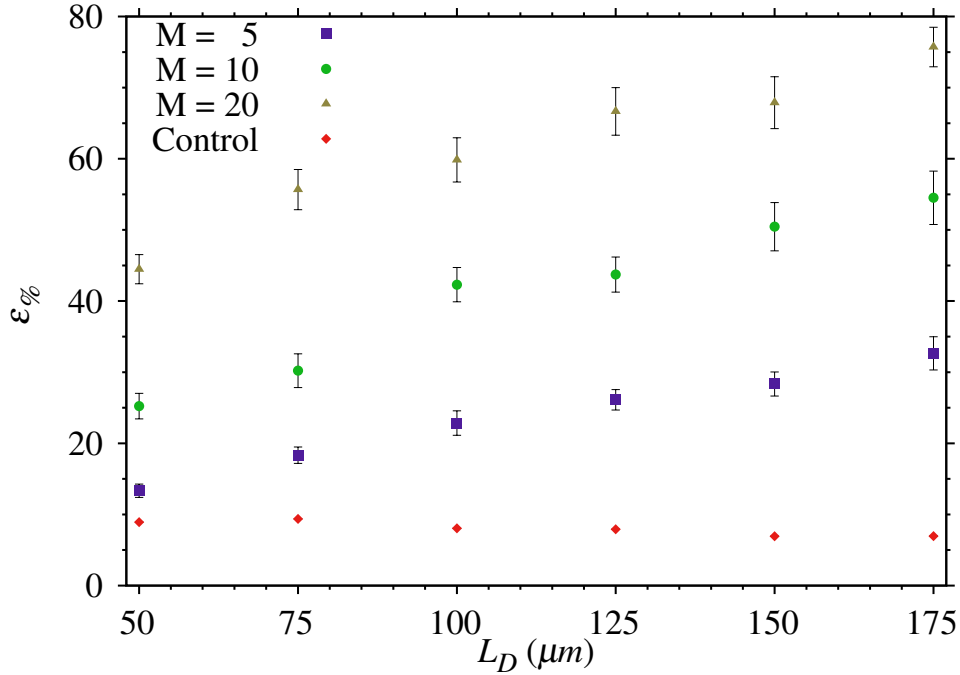


Figura 6.9: Eficiencia de extracción para células s_1 en dispositivos con diferentes números de barreras, M , y variando la separación, l_D , entre las mismas.

grande cuando la velocidad de traslación de la población s_x tiende a cero. En particular, para $v_{sx} = 8 \mu\text{m}/\text{s}$ el tiempo disponible para extraer células s_3 será aproximadamente de 20,3 minutos. A pesar de que este es un tiempo relativamente grande, se puede ver en la figura 6.8(b) que la cantidad de células disponibles para ser extraídas es tan solo del orden del 10% de la cantidad inoculada. Esto se debe a que por más que las células s_3 consiguen llegar al final del contenedor mucho antes que las células s_x , ellas mismas son muy lentas como para arribar de manera abundante. Esto sugiere que en una situación como esta sería conveniente trabajar con un contenedor más corto, cuidando que el tiempo de extracción no se achique demasiado. Por el contrario, cuando las velocidades de la población hipotética son mayores a las de s_3 el tiempo de extracción está acotado por el tiempo que le lleva a la población de referencia alcanzar el final del contenedor, siendo siempre menor a los 12 minutos. El panel (b) muestra que a pesar de esto la eficiencia puede ser muy elevada, y lo será tanto más cuanto mayor sea la velocidad v_{sx} . Esto implica que en tales condiciones sería útil diseñar contenedores más largos para mejorar el tiempo de extracción si fuera necesario.

Algo similar ocurre cuando el ángulo de rotación en un tumbo se modifica entre 0° y 180° . Cuando la persistencia de la población s_x es mayor a la de s_3 , es decir, cuando su ángulo de rotación promedio en cada tumbo es menor a los 68° , sus nadadores llegan primero al final del contenedor y serán por lo tanto las células disponibles para realizar

la extracción. De manera análoga a lo que ocurre al cambiar la velocidad, el tiempo de extracción se encuentra acotado aún para la de mayor persistencia debido a que las células s_3 siempre tardan lo mismo en alcanzar el final del contenedor. A pesar de esto, la eficiencia puede ser bastante importante, llegando alrededor del 20% cuando $\bar{\phi}_{sx}$ tiende a cero. Este porcentaje podría mejorarse diseñando contenedores más largos, pero siempre al costo de aumentar el tiempo necesario para realizar la extracción. Finalmente, en el recuadro interior del panel (b) se muestra que la eficiencia de la separación nunca puede ser demasiado grande si hay únicamente diferencias en la duración de las corridas (notar la escala logarítmica). Esto puede comprenderse a la luz de lo analizado en la sección 5.4, en donde se vio que para nadadores con duraciones de corridas muy prolongadas la difusión rotacional impone un límite a su capacidad de difundirse traslacionalmente.

Por último, es interesante mencionar que en aquellos casos en los que el tiempo que pasan las células en el contenedor no sea restrictivo, es siempre conveniente prolongarlo aumentando la longitud total del dispositivo. Esta afirmación es verdadera tanto si el aumento de longitud se efectúa manteniendo fija la separación l_D entre barreras y aumentando el número M de divisiones, o sencillamente aumentando la separación entre las mismas. Esto puede observarse en la figura 6.9, en la que se ha graficado la eficiencia de separación de células s_1 tomando como siempre a las células de la población s_3 como referencia. En ella se muestra que la eficiencia porcentual de extracción es una función monótonamente creciente tanto de l_D como de M . Cabe destacar que lo contrario ocurre si no se introducen embudos en el contenedor, tal como se muestra en el caso control. Debido a que el número de células inoculadas en todos los casos es el mismo, se observa una leve pérdida de eficiencia a medida que aumenta el tamaño de la caja. Esto es esperable pues la misma cantidad de células se distribuye de manera homogénea en una superficie mayor, reduciéndose así la cantidad de células disponibles en la región de extracción. Este contraste resalta nuevamente la importancia de las barreras para obtener una separación que resulte de utilidad práctica.

6.5. Conclusiones

En este capítulo se ha demostrado por medio de simulaciones que es posible emplear microestructuras asimétricas para la separación de poblaciones celulares caracterizadas por distintos parámetros de movimiento. Para esto, primeramente se estudió la dependencia de la rectificación de una población de células s_3 en un contenedor dividido en dos cámaras iguales por una única barrera de obstáculos. La simulación se repitió cambiando gradualmente la duración media de las corridas de los nadadores, τ , y la rotación media durante tumbos, $\langle\phi\rangle$, con lo cual se comprobó de manera más general un resultado enunciado ya en el capítulo anterior: la rectificación es una función monótonamente creciente de τ y monótonamente decreciente de $\langle\phi\rangle$. Considerando que el tiempo que se requiere para alcanzar el estado estacionario es inversamente proporcional a r , estas relaciones implican también que la velocidad de avance a lo largo de un contenedor con más de una

barrera de embudos será más grande cuanto mayor sea τ y más chica mientras mayor sea $\langle\phi\rangle$. Estos resultados, sumados a la observada acumulación exponencial de células en presencia de múltiples barreras de obstáculos, fortalecen la hipótesis de que una mezcla de dos o más poblaciones puede ser separada espacialmente con un dispositivo como el mencionado.

Para poner a prueba esta hipótesis se efectuaron simulaciones en un contenedor con 20 barreras sobre el cual se inocularon tres poblaciones de nadadores con parámetros de movimiento correspondientes a mutantes reales de la bacteria *E. coli*. Estas primeras pruebas sirvieron para verificar que la velocidad de avance de cada una de estas poblaciones es diferente a lo largo del contenedor, lo que abre una ventana de tiempo durante la cual es posible extraer células de alguna de las tres poblaciones en estado puro. Para investigar la utilidad del dispositivo se introdujeron dos cantidades a las que se llamó *tiempo de extracción* y *eficiencia de extracción*. En ambos casos se trata de cantidades relativas a una población tomada como referencia, que en este estudio fue siempre la población s_3 . En base a estas dos cantidades fue posible determinar que la velocidad v resulta ser el parámetro de mayor peso para definir la separabilidad de dos poblaciones, seguido por $\langle\phi\rangle$ primero y τ después. Dado un caso concreto de dos poblaciones que se quiera separar, las cantidades t^* y $\varepsilon\%$ permiten determinar a priori la geometría a utilizarse, incluyendo el número de barreras y la separación entre las mismas. En referencia a esto último se destacó que si bien la eficiencia es una función creciente del tamaño del contenedor, una longitud total demasiado grande puede producir tiempos prohibitivamente prolongados con respecto a variables que no fueron tenidas en cuenta para el estudio como la mortalidad celular. Asimismo, se enfatiza que si bien la separación puede producirse en ausencia de obstáculos asimétricos, la eficiencia de la separación se ve reducida enormemente, siendo el direccionamiento de las barreras un elemento fundamental para que la separación se posible en términos prácticos.

Dado el grado de desarrollo alcanzado en los últimos años por la tecnología de actuadores para la microfluídica, tales como microbombas y microválvulas, no es difícil imaginar la implementación de dispositivos para la separación que combinen tramos de separación mecánica tales como las geometrías descritas en este capítulo, con la posibilidad de cambiar alternativamente la dirección de movimiento por medio de compuertas. Sería posible en base a los resultados mostrados en este capítulo separar totalmente a las células de dos poblaciones inicialmente mezcladas dejándolas avanzar con velocidades distintas y redirigiéndolas en una dirección durante una ventana temporal igual a t^* y luego en otra dirección diferente para las células que lleguen más tarde. Este ciclo podría repetirse tantas veces como fuera necesario para obtener una separación completa de las dos poblaciones inicialmente mezcladas.

Capítulo 7

Direccionamiento de espermatozoides

Resumen:

En este capítulo se investiga el movimiento bajo microconfinamiento de espermatozoides humanos. Para esto se modifica el modelo fenomenológico utilizado en los capítulos anteriores, en base a observaciones experimentales específicas para esta especie. Se estudia la acumulación de células en los bordes de los contenedores y la posibilidad de usar este efecto para su direccionamiento. Se encuentra que, para células espermáticas, los obstáculos semicirculares son más efectivos que los con forma de V utilizados en capítulos anteriores.

7.1. Introducción

Al igual que ocurre con otros microorganismos como las bacterias, el estudio del movimiento de espermatozoides en medios confinados es sumamente interesante tanto desde el punto de vista de sus posibles aplicaciones tecnológicas como por su aporte al campo teórico. Cabe esperar que en un futuro no muy lejano la microfluídica sea empleada en aplicaciones médicas y veterinarias para solucionar distintas afecciones relacionadas con la infertilidad. Por otra parte, la capacidad de los sistemas microfluídicos para generar gradientes químicos [Jeon et al. (2000)] facilitará sin dudas el estudio de la respuesta quimiotáctica de espermatozoides [Guidobaldi et al. (2008)] y permitirán crear en el laboratorio con complejidades similares a las que enfrentan las células *in vivo* [Burkitt et al. (2011); Shin et al. (2012)].

Con el fin de estudiar numéricamente el movimiento de espermatozoides bajo microconfinamiento, se procede inicialmente a modificar el modelo empleado en los capítulos 5 y 6 para representar más adecuadamente las características específicas de esta especie y su interacción con las paredes contendedoras. Los parámetros de movimiento se obtienen

por medio del análisis directo de trayectorias experimentales de manera tal que no es necesario utilizar parámetros de ajuste.

Una vez definido el modelo fenomenológico, se estudia la acumulación de células sobre los bordes de contenedores cuadrados y circulares, obteniéndose un buen acuerdo cualitativo con observaciones experimentales. La acumulación es estudiada en presencia y ausencia de torques efectivos sobre las células. La acumulación sobre las paredes es un indicador de que las células espermáticas también pueden ser dirigidas empleando geometrías apropiadas. Los primeros intentos muestran, sin embargo, que los obstáculos en forma de V utilizados para dirigir bacterias no son apropiados para espermatozoides, pues estos resultan atrapados en los vértices agudos. Para solucionar este inconveniente se estudia el efecto de redondear todos los vértices del diseño, tanto de obstáculos como de las paredes contenedoras. Los obstáculos en forma de semicírculo probaron ser efectivos para el direccionamiento, consiguiéndose una rectificación mayor al 90 % en simulaciones y de hasta un 80 % en experimentos.

7.2. Modelo

Para adaptar el modelo general correspondiente a las ecuaciones 5.1 se analizaron trayectorias de espermatozoides con patrones de movimiento *lineal* (véase sección 1.2.2) obtenidas por medio de microscopía de fluorescencia [Guidobaldi et al. (2014)]. Con el fin de obtener los parámetros de movimiento de las células se desarrolló un programa que analiza las coordenadas xy de trayectorias independientes observadas en el laboratorio. Este programa primero distingue entre trayectorias correspondientes a células *lineales* y células que se encuentran en estado *transicional* o *hiperactivado*, utilizando un método presentado en [Mortimer et al. (1996)] que se basa en determinar la dimensión fractal de las trayectorias. Una vez hecha esta distinción, el programa analiza únicamente las trayectorias de aquellas células *lineales* cuya duración sea mayor a un cierto tiempo a elección. Para este análisis se escogió una duración mínima de 4 s, lo que corresponde a filmaciones de 100 cuadros como mínimo. De las 557 trayectorias recogidas experimentalmente pudieron utilizarse únicamente 94 que cumplieron con los requisitos de duración y linealidad.

La figura 7.1 muestra en su parte superior el movimiento oscilatorio de la cabeza de un espermatozoide a medida que avanza. Este movimiento puede describirse aproximadamente por una función sinusoidal de amplitud A_h y frecuencia angular $\omega = 2\pi\nu$, cuya velocidad de avance lineal es v y cuya dirección de movimiento cambia de acuerdo con un coeficiente de difusión rotacional D_r . Los parámetros correspondientes a cada una de estas cantidades se eligieron como el valor medio y la desviación estándar de las funciones gaussianas que mejor se ajustan a las distribuciones obtenidas por el programa. Las distribuciones se muestran en los paneles (a-d) de la figura 7.1. Los resultados que se obtuvieron para los diferentes parámetros fueron: $\langle v \rangle = 28 \mu\text{m/s}$, $\sigma_v = 4 \mu\text{m/s}$, $\langle \nu \rangle = 10 \text{ Hz}$, $\sigma_\nu = 1 \text{ Hz}$ y $\langle D_r \rangle = 0,01 \text{ rad}^2/\text{s}$, $\sigma_{D_r} = 0,02 \text{ rad}^2/\text{s}$. Es interesante destacar que este

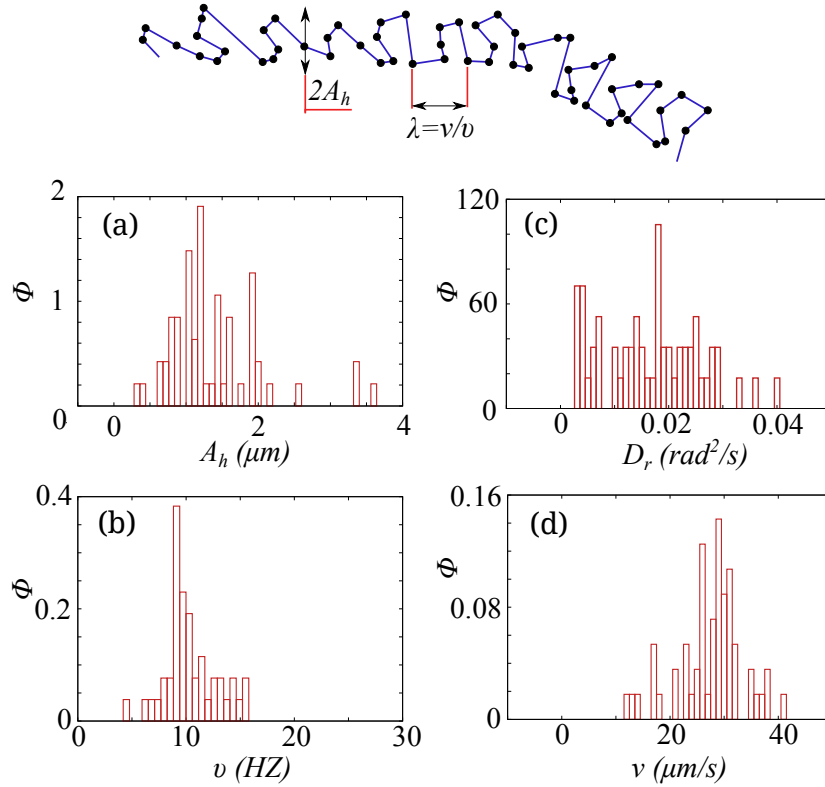


Figura 7.1: Parámetros dinámicos de espermatozoides lineales y sus respectivas distribuciones obtenidas del análisis de trayectorias experimentales. Los distintos paneles presentan respectivamente las distribuciones que se obtuvieron para (a) la amplitud y (b) la frecuencia de la oscilación de la cabeza, (c) el coeficiente de difusión rotacional y (d) la velocidad media de avance. En la parte superior de la figura se grafica la trayectoria oscilatoria típica de la cabeza del espermatozoide, especificándose la amplitud A_h y la longitud de onda λ medias de la oscilación.

valor medio obtenido para D_r es aproximadamente igual al que se obtiene para una esfera de radio $a = 2,5 \mu\text{m}$, en agua a 20°C empleando la ecuación 3.1, lo que implica que es posible que las fluctuaciones debidas al propio mecanismo de propulsión tengan un efecto despreciable en comparación con las fluctuaciones de origen térmico. Para todos los nadadores se utilizó la misma amplitud $\langle A_h \rangle = 1,5 \mu\text{m}$. El tamaño de la cabeza fue tomado de una distribución normal de radios $\langle R_h \rangle = 2,5 \mu\text{m}$ y $\sigma_{R_h} = 0,1 \mu\text{m}$. Estos parámetros se utilizaron luego en la solución numérica de la siguiente ecuación de movimiento:

$$\begin{aligned} \dot{r}_i &= v_i \hat{e}_i^\parallel + A_h \omega_i \cos(\omega_i t) \hat{e}_i^\perp + \frac{1}{\gamma} (\mathbf{F}_i^p + \mathbf{F}_i^n) \\ \dot{\phi}_i &= \sqrt{2D_r^i} \eta \end{aligned} \quad (7.1)$$

Donde r_i representa el centro de la cabeza del i -ésimo espermatozoide, $\hat{e}_i^{\parallel} = \cos(\varphi_i)\hat{e}_x + \sin(\varphi_i)\hat{e}_y$ y $\hat{e}_i^{\perp} = -\sin(\varphi_i)\hat{e}_x + \cos(\varphi_i)\hat{e}_y$ son, respectivamente, versores paralelos o perpendiculares a la dirección de avance. Empleando las variables adimensionales $x' = x/1\mu m$ y $t' = t\langle v \rangle/1\mu m$, se integraron las ecuaciones de movimiento utilizando el método de Euler con un paso temporal $dt' = 0,014$. En todas las simulaciones se emplearon condiciones iniciales homogéneas tanto para la posición como para la dirección de movimiento (φ). Los resultados finales se obtuvieron como el valor medio promediado sobre simulaciones independientes y el error como la desviación estándar de los resultados obtenidos en cada caso.

7.3. Acumulación

Para investigar la acumulación de espermatozoides en las paredes de los contenedores se depositaron poblaciones sobre cámaras de 2 mm de lado y $20\ \mu m$ de profundidad. Las células, distribuidas inicialmente al azar en toda la superficie del contenedor, tienden a nadar sobre las paredes del mismo generando una distribución inhomogénea con una densidad mayor sobre las paredes, tal como se discutió en el capítulo 5 para otros microorganismos. En el panel (a) de la figura 7.2 se puede observar este efecto en un vértice de una de las muestras. Para cuantificar la distribución de células se consideraron 5 regiones rectangulares de $18\ \mu m$ de ancho y tan largas como lo permitió el tamaño de la imagen. Las regiones rectangulares fueron escogidas en posiciones al azar entre los 250 y los 600 μm de la pared inferior del contenedor ($y = 0$). Cada una de estas regiones, de las cuales puede verse una como ejemplo en el panel (a) de la figura 7.2 en línea de rayas amarillas, fue dividida a su vez en segmentos cuadrados de $18\ \mu m$ (10 píxeles) de largo, cada uno formado por 100 px . A continuación se determinó la intensidad de gris promedio en cada uno de los segmentos cuadrados. Para hacerlo, se le asigna a cada uno de los píxeles de la imagen un valor numérico asociado a la intensidad de luz recibida en una única frecuencia predeterminada. De esta manera, a un píxel cuya intensidad de luz es nula le corresponde un 0 (color negro), mientras que a un píxel cuya intensidad es máxima con respecto a la calibración del instrumento de medición se le asigna un 255 (color blanco), si se trabaja con un byte por píxel. Todas las intensidades intermedias se representan con números mayores a 0 y menores a 255. La intensidad de gris en un cuadrado de $10 \times 10\ px$ se obtiene posteriormente promediando las intensidades de todos los píxeles que pertenecen a dicha región.

La densidad de células a una distancia dada de la pared ubicada en $x = 0$ se obtuvo promediando la intensidad de gris para cada uno de estos segmentos entre las 5 regiones rectangulares escogidas. Los resultados se muestran en el panel (b) de la figura 7.2, en donde se superpuso la curva teórica obtenida con el modelo 7.1 empleando exactamente la misma geometría utilizada en el experimento y promediando sobre 50 realizaciones independientes. Es importante remarcar que no existen motivos para esperar un mismo comportamiento cuantitativo entre estas observaciones y los resultados reportados en

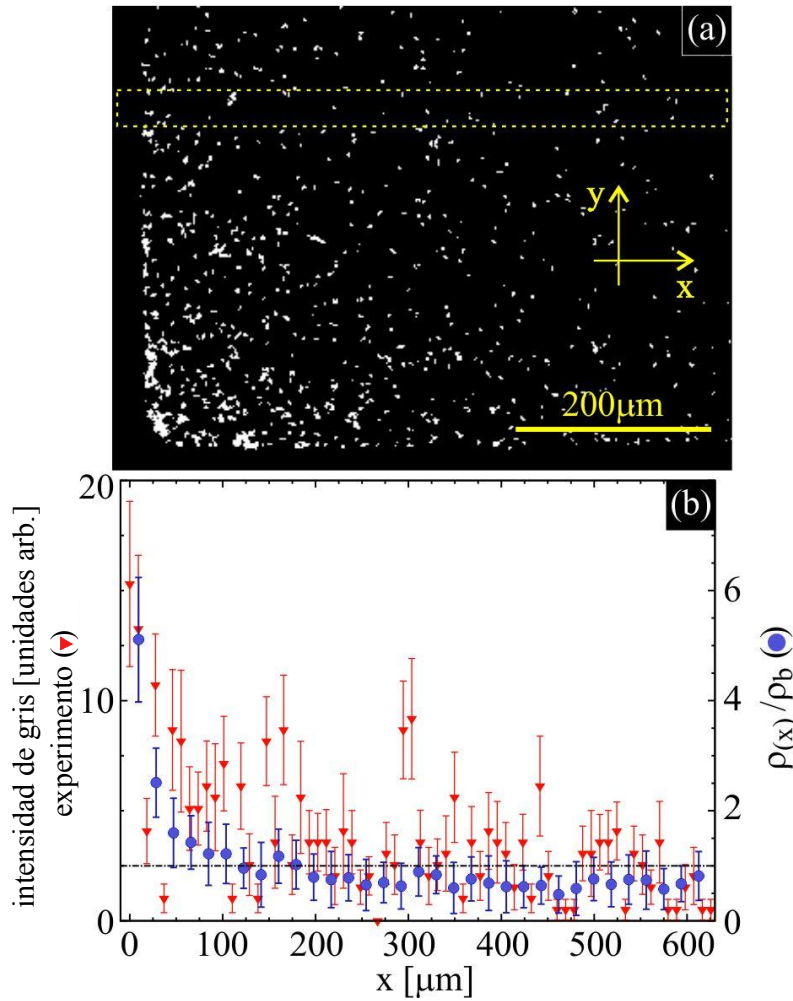


Figura 7.2: Acumulación de espermatozoides en las paredes de una cámara contenedora. (a) Fotografía obtenida por microscopía de fluorescencia. (b) Distribución de células como función de la distancia a una pared, medida experimentalmente (triángulos rojos) y obtenida por medio de simulaciones (círculos azules). Las barras de error indican la desviación cuadrática media entre las mediciones de las 5 regiones rectangulares, en el caso experimental, y entre los resultados de las 50 realizaciones independientes en la curva numérica. La línea de trazos representa la densidad promedio de células en la cámara.

[Rothschild (1963); Berke et al. (2008); Li y Tang (2009)], pues en este caso las células no están en contacto con una única pared sino que en realidad se hallan próximas a la pared lateral, el fondo del contenedor y el vidrio utilizado para el sellado. Más allá de esta observación, cabe destacarse el buen acuerdo que existe entre los resultados experimentales y las predicciones numéricas, ambos mostrando aproximadamente un decaimiento de la acumulación de células proporcional a la inversa de la raíz cuadrada de la distancia a

la pared. Nótese que los resultados numéricos y los experimentales no se corresponden en términos cuantitativos sino tan solo cualitativamente, y que han sido superpuestos en la figura 7.2(b) para su comparación aunque en un caso se mide número de células y en el otro intensidad de grises. La comparación es válida, desde luego, siempre que se suponga que la intensidad de gris de la fotografía es representativa del número local de espermatozoides.

7.4. Acumulación de células con torque externo

Algunos experimentos han demostrado que las bacterias *E. coli* nadan en círculos cuando se encuentran cerca de una superficie sólida [Lauga et al. (2006)] o de una interfase plana entre un líquido y un gas [Di Leonardo et al. (2011)]. Este comportamiento, que en el caso de las bacterias se debe al torque hidrodinámico que genera la rotación en sentidos opuestos de la cabeza y los flagelos, puede observarse también en espermatozoides nadando cerca de superficies planas, aunque su origen sea distinto [Woolley (2003)]. La figura 7.3 muestra este comportamiento para el caso de espermatozoides de humano (este comportamiento ha sido observado también en espermatozoides no humanos [Cosson et al. (2003); Corkidi et al. (2008); Guerrero et al. (2010)]). Tal como se describe en el trabajo de Woolley, no está del todo claro cómo se ve afectado el movimiento del flagelo y la cabeza del espermatozoide al estar cerca de una superficie, y, en general, su respuesta dependerá en gran medida de la especie de que se trate. De este modo, dependiendo del tamaño del nadador, la forma en que se propaga la onda sobre el flagelo y la morfología específica de la cabeza celular, es posible encontrar células que realizan trayectorias más o menos curvas u otras cuya dirección de movimiento no se ve afectada.

Una observación interesante, ya sea que se trate de espermatozoides cuyas trayectorias son lineales o circulares, es que su concentración en el centro de un contenedor circular tiende a disminuir luego de ser inoculados. Este efecto, cuya causa se relaciona con la acumulación de células en los bordes del contenedor, puede producir un error sistemático en el conteo de células cuando se utilizan técnicas comunes como cámaras de Makler. En tales circunstancias, resulta importante conocer los tiempos característicos y la magnitud de la acumulación, tanto para células que se desplazan en línea recta como para aquellas que lo hacen en círculos. Para investigarlo, se modificó la ecuación 7.1 agregando un término constante en la derivada temporal del ángulo:

$$\dot{\phi}_i = \sqrt{2D_r^i} \eta + \Omega \quad (7.2)$$

En esta ecuación, Ω representa la velocidad angular del nadador, de modo que en ausencia de ruido ($D_r = 0 \text{ s}^{-1}$) su trayectoria resultante es una circunferencia de radio $R_0 = v/\Omega$, y su coeficiente de difusión translacional se anula (ver ecuación 3.19).

Analicemos primero el caso $\Omega = 0$, para el cual el coeficiente de difusión estará dado por $D = \frac{v_0^2}{2D_r}$. Bajo esta condición se fuerza a las células a nadar en línea aproximadamente recta, lo que en la práctica podría corresponderse con el caso de células que en un

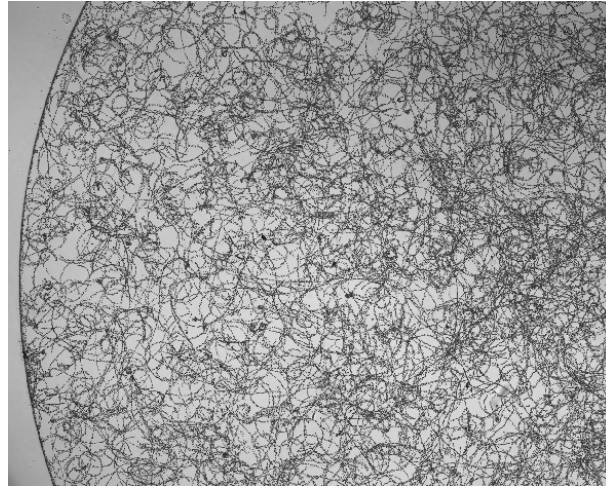


Figura 7.3: Superposición de fotografías realizadas en el microscopio a intervalos regulares para mostrar las trayectorias de espermatozoides humanos en una cámara circular de $20 \mu m$ de profundidad y $1.5 mm$ de radio. En la imagen se observan trayectorias lineales y circulares en una misma población. La imagen reproducida fue cedida por Alejandro Guidobaldi.

contenedor cerrado se encuentran a una distancia intermedia entre las superficies superior e inferior del mismo [Guidobaldi et al. (2015)]. Si se desprecia el término con ruido, a una célula que nada a $20 \mu m/s$ le llevará alrededor de un minuto llegar hasta el borde de un contenedor circular de $1000 \mu m$ de radio, en donde permanecerá indefinidamente, pues en ausencia de fluctuaciones no hay ningún mecanismo que le permita desprenderse de la pared lateral. El sistema pasaría en poco tiempo de una distribución inicial homogénea en todo el contenedor a otra en la que todas las células se encuentran acumuladas sobre el borde. A medida que aumente D_r , el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario se incrementará y la cantidad de células acumuladas en el borde del contenedor se verá reducida. Aún así, tal como muestra la figura 7.4, la acumulación de células puede provocar una disminución de la densidad en el centro del contenedor de hasta un 10% en un contenedor de radio $R = 1000 \mu m$, incluso si el ruido es elevado ($D_r = 0,1 s^{-1}$).

La situación se modifica cuando se considera una velocidad angular distinta de cero. Debido al movimiento circular de las células, su velocidad de difusión es mucho menor que en el caso lineal (ver sección 3.2.3) y el sistema tarda mucho más tiempo en alcanzar el estado estacionario. En la figura 7.5 puede verse como la distribución celular se ve alterada durante el período transitorio con respecto a la distribución de células observada en el caso lineal. Por un lado, la acumulación sobre el borde se ve reducida, por otro, se produce una depresión al lado de la pared del contenedor, cuyo ancho es aproximadamente $2R_0$.

Para comparar los tiempos implicados en la acumulación de células se realizaron una serie de simulaciones en contenedores de $300 \mu m$ de radio. En la figura 7.6(a-c) puede

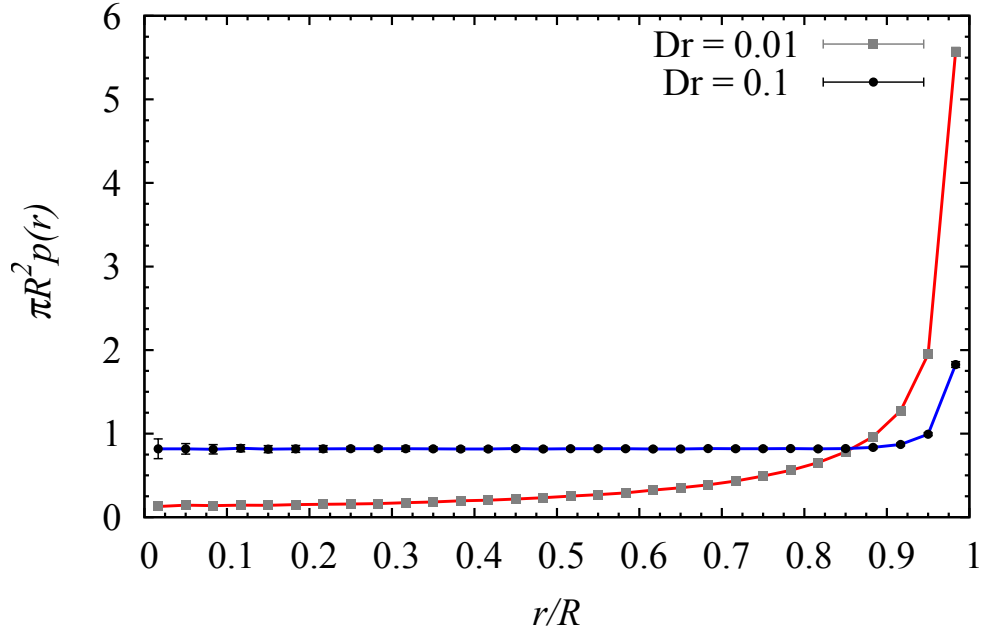


Figura 7.4: Distribución normalizada, en estado estacionario, de nadadores en el interior de una cámara circular de radio $R = 1000 \mu m$. Los cuadrados corresponden a un ruido pequeño $D_r = 0,01 s^{-1}$ y los círculos a un ruido 10 veces mayor.

observarse la concentración de células sobre el borde del contenedor como función del tiempo para distintos valores de D_r y Ω . Esta figura permite observar que la duración del período transitorio es mucho menor cuando las trayectorias de las células son lineales (a) que cuando no lo son (b,c). En este primer caso, la acumulación decrece a medida que aumenta D_r , como se había anticipado al comienzo de la sección. Sin embargo, este mismo comportamiento no se observa cuando $\Omega \neq 0$. Curiosamente, cuando las trayectorias son circulares, cierto nivel de ruido favorece la acumulación de células en el borde del contenedor. Para entender esto es útil pensar primero en el caso $D_r = 0$. Bajo esta condición, la trayectoria es determinista, cada célula tiende siempre a girar en el mismo sentido y es muy difícil que una de ellas quede atrapada en la pared por mucho tiempo pues su propia tendencia a girar le permitirá liberarse. Lo mismo ocurrirá si el ruido es muy grande, pues independientemente de su tendencia a nadar en círculos o en línea recta, el ruido se encargará de separar a las células de la pared. Entre estos dos límites existe cierto valor intermedio de ruido que es lo suficientemente grande como para “desenrollar” la trayectoria y favorecer su permanencia en la pared, sin llegar a convertirse en la causa para evitar la acumulación de células. Este valor intermedio del ruido es una función de la velocidad angular. Por ejemplo, para $\Omega = 0,2 s^{-1}$ (panel b), la acumulación final aumenta

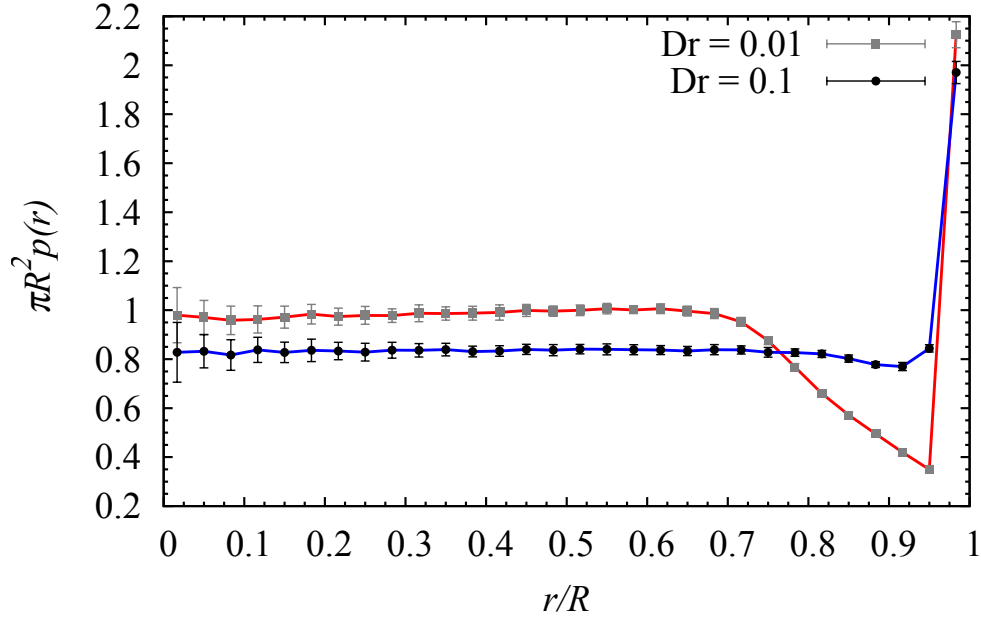


Figura 7.5: Distribución normalizada, en estado estacionario, de nadadores con trayectorias circulares ($\Omega = 0,2 \text{ s}^{-1}$) en el interior de una cámara circular de radio $R = 1000 \mu\text{m}$. Los cuadrados corresponden a un ruido pequeño $D_r = 0,01 \text{ s}^{-1}$ y los círculos a un ruido 10 veces mayor.

a medida que el ruido se incrementa desde $D_r = 0,1 \text{ s}^{-1}$ hasta $D_r = 0,3 \text{ s}^{-1}$, y luego vuelve a disminuir para valores de D_r mayores. En cambio, para $\Omega = 0,4 \text{ s}^{-1}$ (panel c), el ruido que produce una acumulación máxima se encuentra entre $D_r = 0,4 \text{ s}^{-1}$ y $D_r = 0,5 \text{ s}^{-1}$. El panel d) de la figura muestra la distribución celular completa en toda la caja para los tres casos, con $D_r = 0,5 \text{ s}^{-1}$ y en estado estacionario. Esta figura permite ver claramente cómo un valor apropiado de ruido puede favorecer la acumulación de células con velocidades angulares mayores, mientras que lo esperable a priori sería que siempre las células lineales fueran las más acumuladas.

Una última observación pertinente es que la duración del período transitorio disminuye a medida que aumenta D_r , y, de hecho, para valores pequeños de ruido puede requerirle al sistema tiempos muy largos alcanzar su estado estacionario. Esto no impide, sin embargo, que la distribución de células en el interior del contenedor pueda provocar los errores de conteo mencionados al comienzo, incluso a tiempos cortos, tal como se desprende de las distribuciones transitorias mostradas en la figura 7.5. Diseñar apropiadamente la forma del borde de contenedores podría reducir significativamente estas complicaciones.

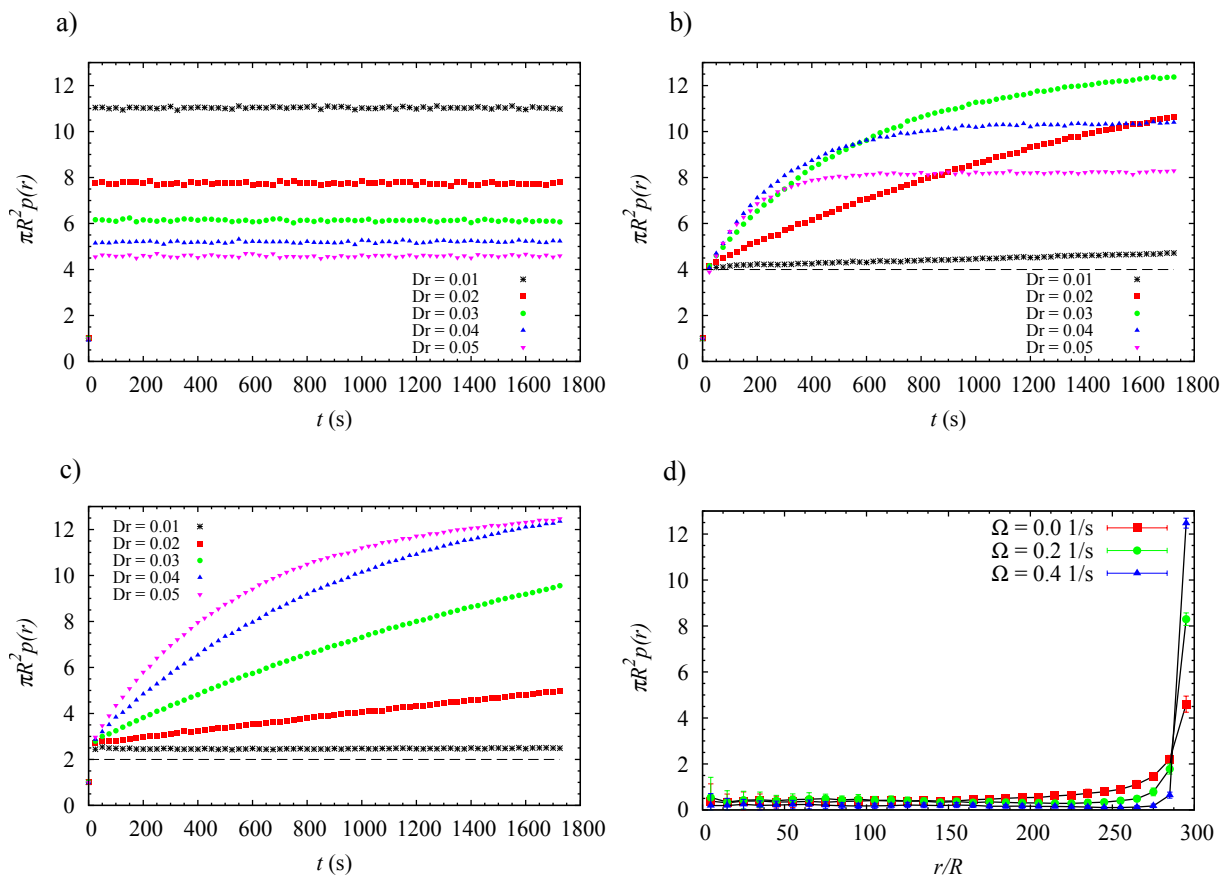


Figura 7.6: Acumulación de nadadores en el borde de un contenedor circular de $300 \mu\text{m}$ de radio para: a) $\Omega = 0 \text{ s}^{-1}$, b) $\Omega = 0,2 \text{ s}^{-1}$ y c) $\Omega = 0,4 \text{ s}^{-1}$. d) Comparación entre las distribuciones finales para los tres casos con $D_r = 0,5 \text{ s}^{-1}$.

7.5. Atrapamiento

A partir de la observación de que las células espermáticas son atraídas por las paredes al igual que, por ejemplo, las bacterias *E. coli*, pareció evidente que una geometría con obstáculos en forma de V debería servir para dirigir las. Inesperadamente, a pesar de que esta suposición resultó correcta, surgieron otras dificultades que disminuyen considerablemente la utilidad de un diseño de este tipo. Debido a que la estrategia de movimiento de los espermatozoides es muy diferente de la de las bacterias y, en particular, no producen cambios repentinos de dirección (tumbos), las células tienden a quedarse atrapadas en los vértices de los obstáculos, limitando así su potencial para dirigir el movimiento de una población. En la figura 7.7 se observan imágenes del primer experimento realizado, empleando un contenedor con dos filas de embudos. En las imágenes puede verse que aunque las células atraviesan las barreras con mayor frecuencia en el sentido fácil de movimiento

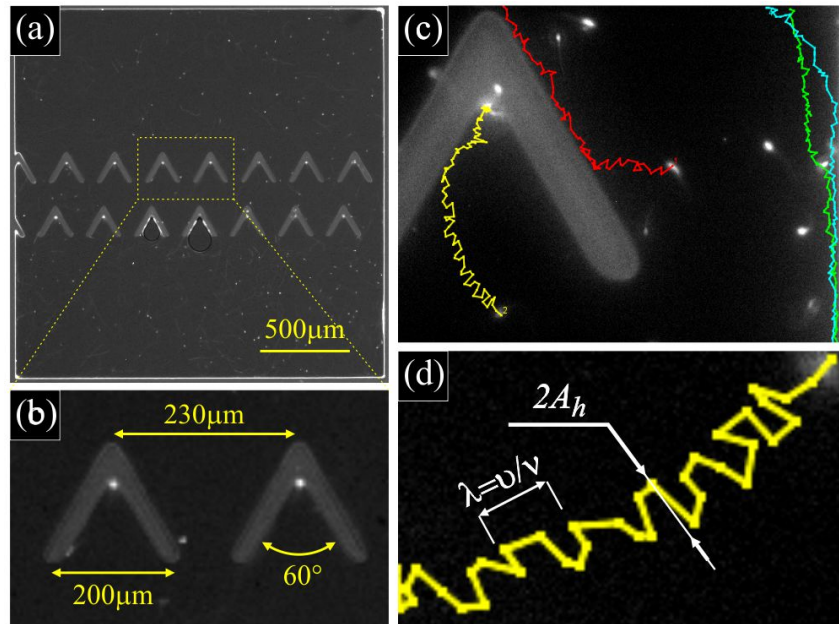


Figura 7.7: (a,b) Espermatozoides atrapados en los vértices de obstáculos en forma de V. (c) Un espermatozoide es guiado por la parte externa de la pared del obstáculo (rojo) mientras que otro es atrapado en el lado interno (amarillo). Dos células nadando sobre la pared del contenedor se despegan al chocar (verde y celeste). (d) Parámetros de movimiento de una de las células cuya trayectoria se muestra en el panel (c). La trayectoria ha sido rotada para que se acomode mejor a las dimensiones de la figura.

(en esta figura, de arriba hacia abajo), se produce también el atrapamiento mencionado (fig. 7.7 b y c). En el caso de las bacterias, incluso para aquellas poblaciones que se caracterizan por tener una gran persistencia en su dirección de movimiento, esto no resulta problemático pues un cambio de dirección al cabo de unos segundos es suficiente para liberarlas (véanse por ejemplo los resultados correspondientes a la población s_1 en los capítulos 5 y 6). Los espermatozoides, en cambio, pueden quedar atrapados indefinidamente, aumentando la concentración de células en la región interior de los embudos y dificultando potencialmente su manipulación para otros fines posteriores al direccionamiento. Inmediatamente después de estos primeros experimentos resultó evidente que la solución para este problema era sencillamente redondear las esquinas. Las simulaciones resultaron útiles en este caso para investigar la mejor manera de escoger la nueva geometría, ya que el diseño y la fabricación de los contenedores comprenden un proceso lento y costoso. Con el estudio numérico del problema se ayudó a escoger un diseño para los contenedores que evitara el atrapamiento indeseado de células en los vértices de las barreras y que al mismo tiempo optimizara el direccionamiento de las mismas.

Para investigar el efecto de atrapamiento se realizaron simulaciones con el modelo pre-

sentado en la sección 7.2, en un espacio bidimensional cuadrado de lado L con condiciones periódicas de contorno. En el centro del área simulada se colocó un embudo formado por dos paredes rectas de longitud $l_f = 100 \mu m$ formando un ángulo de 60° entre sí y unidas por un segmento circular de radio r_f , tal como se presenta en la figura 7.8. El área sombreada A corresponde al área encerrada por el segmento circular y un tercio de las paredes laterales. En ella se determinó la fracción de ocupación de células atrapadas NA_c/A en donde N es el número de células presentes en dicha región del espacio y A_c es el área de cada una de las células. La elección particular del área A es completamente arbitraria, pero resultó una solución práctica para determinar bajo qué condiciones geométricas y de densidad de células se produce o no el atrapamiento. Una vez definida la geometría que se emplearía, se incrementó sistemáticamente el área simulada variando L desde 500 hasta $1500 \mu m$ de modo de asegurar que los resultados fueran independientes de las condiciones de contorno periódicas. Estos resultados mostraron que la transición de atrapamiento resulta independiente del tamaño del área simulada para valores de $L \geq 1000 \mu m$, con lo cual se optó por realizar todas las simulaciones con $L = 1000 \mu m$. Las simulaciones se iniciaron con una distribución homogénea de nadadores en todo el espacio, dirigidos en direcciones también aleatorias y se midió la fracción de ocupación dentro del área A para distintos radios r_f y concentraciones ϕ .

La figura 7.8 resume los resultados obtenidos por medio de las simulaciones. En el panel principal de la misma puede observarse como la fracción de ocupación de área máxima se encuentra un poco por encima de 0,8, independientemente de la densidad de la población simulada. Para cada valor de la densidad de población, existe un valor crítico del radio de curvatura a partir del cual la acumulación de células disminuye abruptamente. Si la densidad de la población es disminuida sistemáticamente, tal como puede observarse en el panel interior de la figura, se encuentra un valor mínimo del radio necesario para evitar el atrapamiento, dado por $r_f \simeq 8 \mu m$. Este valor fue confirmado realizando la misma simulación pero en ausencia de interacciones estéricas entre los nadadores, de modo de representar el límite de dilución infinita (triángulos rojos y rombos azules). En el otro extremo, cuando las densidades simuladas son mayores, es posible observar que el radio crítico a partir del cual los nadadores atrapados consiguen liberarse depende de la densidad de la población y de la longitud de las paredes laterales del embudo. Esto ocurre porque el radio crítico de curvatura se caracteriza por el equilibrio entre la frecuencia promedio con la que una de las células atrapadas consigue escapar y la frecuencia con la que una nueva célula llega al vértice del embudo. La frecuencia de escape es en primera aproximación dependiente únicamente de r_f , aumentando para valores mayores del radio que ofrecen a las células mayor espacio para maniobrar. La frecuencia de arribos al vértice es proporcional a la densidad promedio de la población en todo el espacio y al tamaño de las paredes laterales que sirven de guías hacia el vértice. Por este motivo, el corrimiento del radio crítico hacia valores cada vez más grandes cuando aumenta la densidad de la población puede observarse también al aumentar el largo l_f de las paredes. Este resultado es presentado en la figura 7.9 para tres longitudes diferentes de las paredes del embudo y una fracción de ocupación $\phi = 0,02$. En esta figura es posible observar que la acumulación

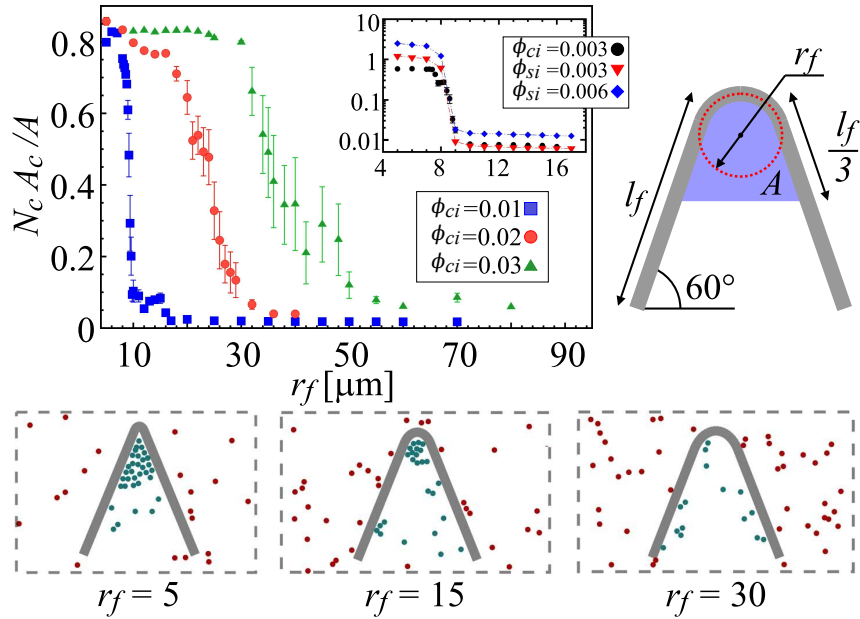


Figura 7.8: Resultados numéricos de las simulaciones usadas para investigar el efecto de atrapamiento. El panel principal muestra la disminución abrupta del número de células acumuladas en la región A cuando el radio r_f se incrementa más allá de un valor crítico dependiente de ϕ . El panel interior presenta los resultados en el límite extremadamente diluido, para una población simulada con interacciones estéricas y una densidad $\phi_{ci} = 0,003$ y dos poblaciones sin interacciones estéricas a diferentes diluciones, indicadas por sus densidades ϕ_{si} . En la parte inferior se muestran capturas del sistema para distintos valores de r_f y una fracción de ocupación $\phi_{ci} = 0,02$. Los círculos de color rojo muestran células nadando fuera del obstáculo y los círculos verdes corresponden a células en el interior del mismo.

de células es la misma independientemente de l_f cuando el radio r_f es muy pequeño (menor a $10 \mu m$). Cada una de las tres curvas, caracterizadas por valores distintos de l_f , presenta una disminución abrupta de la acumulación de células para un valor distinto del radio de curvatura. La primera transición se observa para la curva correspondiente al obstáculo con paredes más cortas ($50 \mu m$). En este caso, la transición ocurre para radios entre los 15 y los $25 \mu m$, mientras que la misma se traslada a radios cada vez mayores para paredes de $100 \mu m$ y $150 \mu m$ de largo respectivamente. En vista de estas consideraciones puede concluirse que la geometría que minimiza el atrapamiento estará dada por segmentos circulares de radios mayores a $8 \mu m$ sin paredes laterales, de modo de evitar en lo posible que las células se dirijan hacia el interior de los obstáculos.

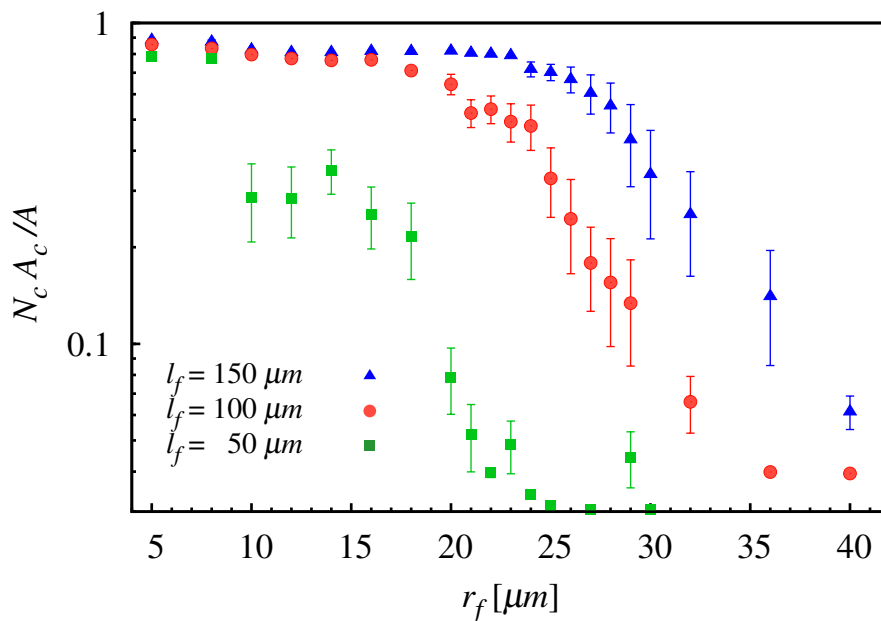


Figura 7.9: Efecto de la longitud de las paredes del obstáculo sobre el atrapamiento. Se muestran resultados correspondientes a $\phi = 0,02$ para $l_f = 50 \mu m$ (cuadrados), $100 \mu m$ (círculos) y $150 \mu m$ (triángulos), respectivamente.

7.6. Direccionamiento

De acuerdo con los resultados descritos en la sección anterior se realizaron simulaciones para estudiar el direccionamiento de espermatozoides pero esta vez empleando obstáculos semicirculares. En este caso no se utilizaron condiciones periódicas de contorno sino que el área simulada está definida por las paredes del contenedor. Se escogió una caja rectangular cuya longitud en la dirección del eje y se fijó en $L_y = 1885 \mu m$ mientras que la longitud en la dirección del eje x se adaptó en cada caso de acuerdo al ancho necesario para que cupieran en la misma 8 semicírculos de radio r_f variable. El ancho escogido para las paredes fue de $25 \mu m$ y la separación entre obstáculos se fijó en $10 \mu m$. En cada simulación las posiciones y las direcciones de movimiento de los nadadores se inicializaron con una distribución uniforme y aleatoria en todo el contenedor y se midieron los números de células $N1$ y $N2$ a uno y otro lado de la barrera como funciones del tiempo. La interacción con las paredes de la barrera producen el aumento de $N1$ y que el número de células $N2 = N - N1$ disminuya en la misma proporción, siendo N el número total de células en la caja. Una vez que el sistema alcanza su estado estacionario el valor medio de $N1$ deja de cambiar en el tiempo. En estas condiciones, se midió la rectificación definida como $r = N1/N$ y luego este resultado fue promediado entre 50 simulaciones independientes.

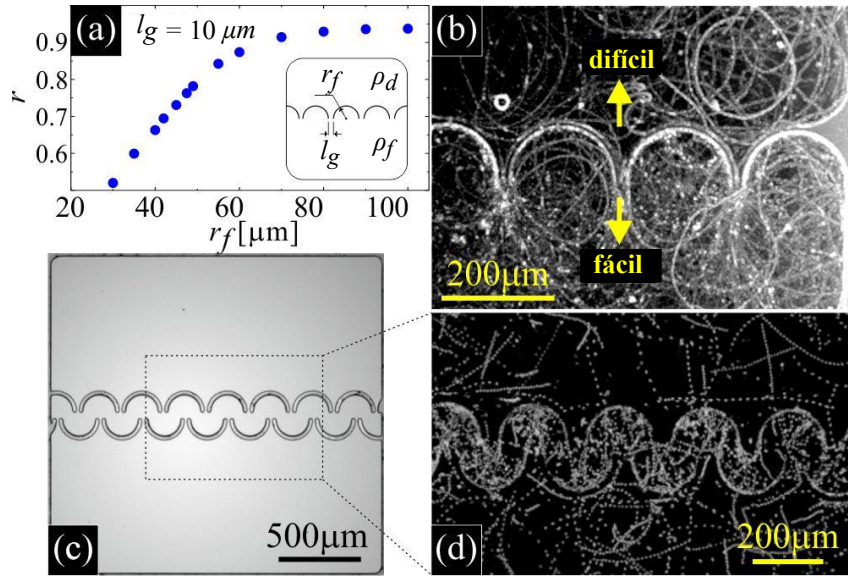


Figura 7.10: (a) Rectificación como función del radio de los obstáculos obtenida por medio de simulaciones. Panel interior: parámetros geométricos y las densidades de células en las regiones de acumulación (ρ_f) y depleción (ρ_d). (b) Trayectorias de células en la proximidad de una barrera de obstáculos semicirculares. Se indican las direcciones *fácil* y *difícil* para que las células atraviesen el obstáculo. (c) Detalle de la geometría de un diseño con dos barreras de semicírculos enfrentados y (d) su capacidad para concentrar a los espermatozoides en una región limitada del espacio.

En el panel (a) de la figura 7.10 es posible observar el valor promedio de la rectificación que se obtuvo usando este procedimiento para geometrías caracterizadas por distintos radios r_f (las barras de error no se grafican porque quedan adentro del punto dibujado). Para radios que van entre los 30 y los $50 \mu\text{m}$, aproximadamente, la rectificación crece de manera lineal con una pendiente $\sim 0,015 \mu\text{m}^{-1}$ y luego continúa aumentando en una proporción cada vez menor hasta alcanzar un amesetamiento alrededor de $r_f = 80 \mu\text{m}$. Para radios mayores a este la rectificación alcanza su valor máximo dado por $r \approx 0,95$, lo que representa una eficiencia altísima teniendo en cuenta que es imposible obtener un direccionamiento 100% eficaz pues siempre existe una posibilidad no nula de que las células concentradas a un lado del contenedor se filtren por los espacios ubicados entre los semicírculos.

En el panel (b) de la figura 7.10 se muestra una superposición de 100 cuadros tomados durante 4 s a intervalos regulares, obtenida en los experimentos realizados con la nueva geometría. Además de la excelente terminación de los contenedores construidos por nuestros colaboradores de Bélgica, es posible observar una notable acumulación de células en todos los bordes y una mayor proporción de las mismas en la región inferior de la caja. La calidad de la construcción de la muestra puede apreciarse también en el panel (c) de

la figura, en este caso para una geometría un tanto diferente, consistente en dos filas de semicírculos enfrentados con las filas desplazadas horizontalmente una con respecto a la otra (es decir, en la dirección del eje x). En el panel (d) puede verse que esta geometría trabaja como una trampa para las células inoculadas en el contenedor, lo que permite visualizar de una manera directa la eficacia de los semicírculos construidos para direccionar el movimiento de los nadadores.

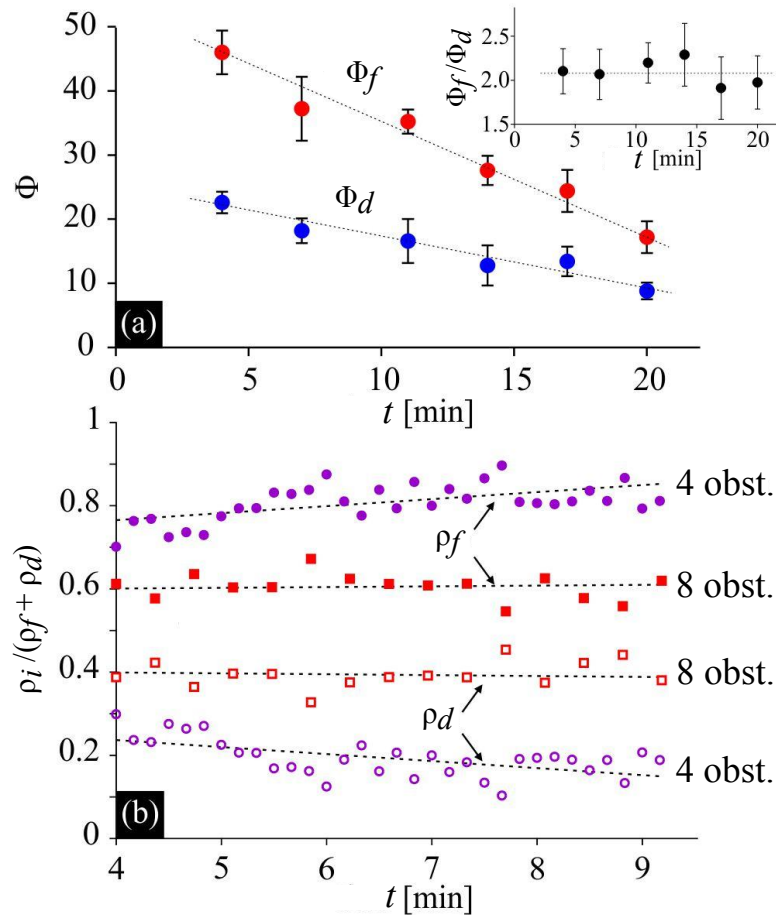


Figura 7.11: Cuantificación del direccionamiento de espermatozoides utilizando una barrera formada por semicírculos. (a) Evolución temporal del número de células por unidad de tiempo que cruzan la barrera en los sentidos fácil Φ_f y difícil Φ_d , respectivamente. El cociente entre estas dos cantidades permanece aproximadamente igual a 2 durante todo el experimento (ver panel interior). (b) Rectificación medida de manera directa contando el número de células en una región rectangular a uno y otro lado de la barrera. Los símbolos llenos representan la fracción de células contadas en la región de fácil acceso para una barrera de 4 (círculos) u 8 (cuadrados) obstáculos semicirculares. La fracción registrada en la región cuyo acceso es más difícil se representa con símbolos vacíos.

Para cuantificar la capacidad de direccionamiento de las cámaras construidas se emplearon dos métodos diferentes. En un contenedor con una única barrera de embudos como el mostrado en el panel (b) de la figura 7.10 se midió el flujo de células que atraviesan la barrera por unidad de tiempo en la dirección fácil Φ_f (hacia abajo en esta imagen) y en la dirección difícil Φ_d (hacia arriba). Los flujos en las dos direcciones se obtuvieron como el promedio entre las mediciones correspondientes a 5 bocas, siendo la barra de error la desviación estándar de las mediciones. Los resultados conseguidos por esta vía se presentan en la figura 7.11(a), en donde se puede ver que el flujo de células en la dirección fácil de movimiento es siempre aproximadamente el doble que el flujo en la dirección difícil (ver panel interior), a pesar de la disminución de los flujos que se observan en ambos sentidos a medida que pasa el tiempo. Esta disminución de los flujos puede deberse a una pérdida de movilidad general de la población y a la eventual muerte de parte de las células debido a una degradación de las condiciones ambientales en el interior del contenedor. Alternativamente, el direccionamiento fue medido definiendo dos regiones rectangulares con dimensiones idénticas a uno y otro lado de la barrera y midiendo la cantidad de células en cada región como función del tiempo. Los resultados obtenidos con este segundo enfoque se presentan en la figura 7.11(b). En esta figura es posible observar que, efectivamente, las barreras producen la acumulación de células a uno de los lados de la barrera y además que esta acumulación es mayor para una caja formada por 4 semicírculos en lugar 8, ya que en un contenedor más angosto la probabilidad de que las células se encuentren con las paredes del mismo es mayor, aumentando de este modo el potencial de direccionamiento. Siguiendo este razonamiento, es posible conjeturar que la geometría óptima para guiar células de espermatozoides corresponde a canales angostos con un único obstáculo en su interior.

7.7. Conclusiones

En este capítulo se introdujeron modificaciones al modelo presentado previamente para adaptarlo al movimiento de espermatozoides humanos. En particular, se agregó el movimiento oscilatorio de la cabeza celular y se cambió parcialmente la interacción con las paredes obligando a las células a moverse tangencialmente a estas cada vez que entran en contacto directo. Los parámetros de movimiento se obtuvieron analizando trayectorias experimentales por medio de un programa desarrollado especialmente con esa finalidad. El código permite clasificar automáticamente el tipo de movimiento celular, de modo que sólo fueron analizadas las células con movimiento de tipo lineal, dejando fuera del análisis a las células transicionales o hiperactivadas.

El primer uso que se le dió a este nuevo modelo fue el estudio de la acumulación celular en los bordes de contenedores. En el caso de contenedores cuadrados, se compararon los resultados numéricos con mediciones experimentales y se encontró un buen acuerdo entre ambos. Tanto la densidad de nadadores simulados como la intensidad de gris observada experimentalmente decaen aproximadamente como $d^{-1/2}$ en donde d es la distancia a una

pared del contenedor. La acumulación fue estudiada también en contenedores circulares, incorporando en este caso trayectorias circulares al análisis. Tal como cabe esperar, la introducción de un torque constante sobre el movimiento de las células produce un aumento del tiempo necesario para que el sistema alcance el estado estacionario. Menos intuitiva fue la observación de que, mientras la acumulación de células es inversamente proporcional a D_r para células lineales, un poco de ruido puede favorecer la acumulación de células con trayectorias circulares, siendo el D_r óptimo una función de la velocidad angular Ω .

La acumulación de células en los bordes de contenedores puede producir dificultades para la manipulación experimental de pequeñas cantidades de células y para realizar mediciones sobre pequeñas poblaciones de interés, afectando potencialmente algunas prácticas médicas como el diagnóstico clínico de infertilidad masculina. Con esto en mente, se realizaron simulaciones, que no se presentan aquí, con geometrías modificadas superponiendo pequeños semicírculos a lo largo del perímetro de contenedores circulares. La intención de agregar los semicírculos es incorporar cierta “rugosidad” al borde para disminuir la permanencia de los nadadores sobre este, de manera tal de mantener una distribución celular más homogénea en todo el contenedor. Si bien los resultados numéricos no fueron concluyentes sobre la mejor manera de introducir esta rugosidad, se construyeron contenedores y se realizaron pruebas experimentales que muestran que estas nuevas geometrías pueden ser una solución al problema de la acumulación [Guidobaldi et al. (2015)].

Por otra parte, se presentó evidencia numérica y experimental que muestra que el empleo de obstáculos en forma de V, usados con éxito para dirigir bacterias, resulta de poca utilidad para controlar el movimiento de poblaciones de espermatozoides. Para solucionar el problema se evaluó el efecto de redondear todos los ángulos de la geometría empleada. Las simulaciones mostraron que el radio necesario para evitar el atrapamiento en los obstáculos es proporcional a la densidad de células en el contenedor y a la longitud de las paredes planas del obstáculo, motivo por el cual se procedió a construir nuevos contenedores esta vez con obstáculos semicirculares (sin superficies planas). Las simulaciones sirvieron también para determinar que el radio de los obstáculos que optimiza el direccionamiento de los espermatozoides es mayor a $80 \mu m$. Las nuevas geometrías fueron probadas experimentalmente y demostraron ser eficaces para el direccionamiento de células espermáticas [Guidobaldi et al. (2014)].

Capítulo 8

Conclusiones

A lo largo de esta tesis se estudiaron distintos aspectos del movimiento de microorganismos, con el énfasis puesto en la posibilidad de controlarlo para distintos usos. Uno de los temas que se estudió con detalle fue el movimiento del nadador de Golestanian y su optimización, capítulo 4. Para ello, se emplearon simulaciones basadas en la Dinámica de Stokes, que permiten tener en cuenta las interacciones hidrodinámicas entre las esferas del nadador con buena precisión y bajo costo computacional. Este enfoque permitió estudiar las propiedades del movimiento incluso en configuraciones que implican el acercamiento de las esferas del nadador hasta el contacto, para distintos tamaños y ciclos de movimiento. El estudio realizado sirvió para demostrar que la máxima eficiencia se consigue cuando el recorrido de los brazos es suficientemente largo como para que las esferas de los extremos lleguen casi al contacto con la esfera central, un límite que no es posible alcanzar utilizando la aproximación analítica basada en fuerzas puntuales. Además, pudo comprobarse que, a medida que el tamaño del nadador se incrementa, el ciclo cuadrado resulta más conveniente que el ciclo circular, mientras que para nadadores muy pequeños la elección del ciclo no afecta demasiado a la eficiencia.

Posteriormente, desde el capítulo 5 en adelante, se empleó un modelo fenomenológico mucho menos detallado que el anterior, desde el punto de vista de las interacciones, cuya virtud es la de poder representar la evolución de poblaciones numerosas durante tiempos prolongados y en geometrías adaptables. Con este segundo enfoque se estudió el efecto que tienen para el direccionamiento de células, por medio de estructuras asimétricas, los parámetros de movilidad celular y el diseño particular de la geometría utilizada. El modelo implementado, más realista que el utilizado previamente por Wan, demostró ser capaz de reproducir los experimentos de Galajda más adecuadamente y sin la necesidad de ajustar parámetros. Las diferencias observadas en el direccionamiento de distintas poblaciones condujeron al estudio de la separación de poblaciones con parámetros de movimiento diferentes y se diseñó un método para la evaluación de la eficacia del método propuesto de acuerdo a las diferencias entre las poblaciones (capítulo 6). Finalmente, adaptando el modelo en base a observaciones experimentales para representar de un modo más preciso el movimiento de espermatozoides, se colaboró con el diseño de contenedores que fueron

utilizados en la práctica para direccionar células espermáticas humanas y para estudiar, y evitar en lo posible, la acumulación celular en los bordes del contenedor. Ambos son logros importantes, que podrán ser usados en el futuro para investigar la quimiotaxis de espermatozoides y, posiblemente también, para el diseño de ensayos más precisos que permitan detectar la infertilidad masculina o para mejorar las técnicas existentes de inseminación artificial.

El trabajo presentado hasta aquí puede ser continuado en diferentes direcciones en el futuro. La implementación del nadador de Golestanian por medio de la Dinámica de Stokes puede ser aprovechado para investigar las interacciones hidrodinámicas entre 2 o más nadadores, de manera similar a lo hecho por Ishikawa para dos bacterias monoflageladas [Ishikawa et al. (2007)]. Este trabajo ya fue realizado en el pasado por Pooley y sus colaboradores, pero empleando una aproximación de primer orden para evaluar las interacciones [Pooley et al. (2007); Alexander et al. (2008, 2009)]. Debido a que el nadador de 3 esferas produce un campo de velocidades variable en el tiempo (que en promedio decae a distancias grandes como $1/r^3$, a diferencia del campo dipolar), se observó que el efecto recíproco entre dos de estos nadadores puede producir distintos tipos de patrones de movimiento en función de sus posiciones y fases relativas. Esta fenomenología, más rica que la mera atracción o repulsión entre dos interacciones dipolares, merece ser estudiada con una representación del campo hidrodinámico más completo, sobre todo cuando las distancias entre los nadadores son del orden de sus tamaños. Debido a que la hipótesis de la interacción dipolar es utilizada en muchos modelos teóricos diseñados para el estudio del movimiento colectivo de nadadores en poblaciones densas [Marchetti et al. (2013)], el estudio detallado de las interacciones entre *NTEs* sería sumamente interesante, precisamente porque se conoce que los campos reales producidos por los microorganismos autopropulsados son dependientes del tiempo y sólo aproximadamente dipolares [Guasto et al. (2010); Drescher et al. (2010)]. Asimismo, la evaluación numérica de nadadores de tres esferas por medio de la Dinámica de Stokes puede ser empleada para la simulación directa de sistemas densos, lo que resultaría de gran interés para contrastar con las teorías existentes sobre el movimiento colectivo y su relación con propiedades emergentes.

El modelo empleado para el movimiento de micronadadores, introducido en el capítulo 5, es lo suficientemente general como para ser empleado en el estudio de otras especies, con pequeñas modificaciones. En particular, el modelo ya está siendo utilizado para investigar, en colaboración con el *Environmental Microfluidics Group* perteneciente al *Massachusetts Institute of Technology*, la posibilidad de controlar el movimiento de *coanoflagelados*, una especie importante en términos filogenéticos, pues se los considera como los antecesores más cercanos de las células animales [King et al. (2008)]. Estas células presentan patrones de comportamiento complejos que afectan sus características de movimiento en distintas etapas de su vida. Estas características harían especialmente interesante el uso de dispositivos capaces de separar células de la población en función de su tipo de movimiento, empleando contenedores como los que se estudiaron en el capítulo 6. Si esta separación se lograra, permitiría el estudio de las células en cada una de sus diferentes fases de comportamiento. Así mismo, el modelo ha sido empleado para estudiar la

difusión de bacterias en presencia de obstáculos con distintos grados de desorden. Dicho trabajo investiga las condiciones de movimiento de bacterias que habitan en el suelo y que pueden emplearse como biofertilizantes [Moyano Cortez y Marconi (2014)].

En lo referente al trabajo con espermatozoides, también quedan diferentes caminos a ser explorados. La posibilidad de emplear contenedores con paredes rugosas, tal como fue sugerido en el capítulo 7, ya ha comenzado a ser estudiada experimentalmente [Guidobaldi et al. (2015)]. En esta línea, un estudio sistemático, por medio de simulaciones, del efecto de distintas geometrías sobre la distribución espacial de células sería de gran ayuda, ya que los experimentos cuentan con diversas limitaciones, tanto por el costo de fabricación de los contenedores y los tiempos implicados en su producción, como por la cantidad de donantes necesarios para los ensayos y el trabajo posterior de procesamiento de datos. Las simulaciones numéricas, como se ha mostrado en esta tesis, resultan por todas estas razones de gran ayuda como complemento de los experimentos en el diseño de geometrías.

Finalmente, el control logrado por medio de microgeometrías sobre el movimiento de espermatozoides promete ser de gran utilidad para la investigación de quimiotaxis en espermatozoides humanos, un área de investigación en la que aún existen importantes preguntas abiertas. Una de las mayores complicaciones que enfrentan estos estudios es que solamente una subpoblación minoritaria de células capacitadas parece ser sensible a la atracción química producida por un gradiente. La dificultad radica en que no existe, hasta el momento, una manera no invasiva de determinar cuáles son los espermatozoides de una población que se encuentran capacitados, por ejemplo mediante el uso de marcadores moleculares. Esto genera que las mediciones deban ser extremadamente sensibles, pues resulta difícil distinguir un cambio en el movimiento de una subpoblación que ronda como máximo el 10 % del total de células. En este sentido, el direccionamiento demostrado en el capítulo 7 puede resultar extremadamente útil, oponiendo la atracción quimiotáctica a la dirección fácil de movimiento impuesta por la geometría, para conseguir una separación espacial de las células capaces de responder a la presencia del atractante. En este caso, para acompañar el diseño del experimento por medio de las simulaciones, sería necesario, primero, incorporar la respuesta quimiotáctica al modelo fenomenológico.

Apéndice A

Trabajos publicados y en preparación

PHYSICAL REVIEW E **87**, 052702 (2013)**Influence of swimming strategy on microorganism separation by asymmetric obstacles**I. Berdakin,¹ Y. Jeyaram,² V. V. Moshchalkov,² L. Venken,³ S. Dierckx,³ S. J. Vanderleyden,³ A. V. Silhanek,⁴
C. A. Condat,¹ and V. I. Marconi¹¹*Facultad de Matemática, Astronomía y Física, Universidad Nacional de Córdoba and IFEG-CONICET, X5000HUA Córdoba, Argentina*²*INPAC, Institute for Nanoscale Physics and Chemistry, Nanoscale Superconductivity and Magnetism Group, K.U. Leuven, Celestijnenlaan 200D, B-3001 Leuven, Belgium*³*Faculty of Bioscience Engineering, Department of Microbial and Molecular Systems, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium*⁴*Département de Physique, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Belgium*

(Received 8 February 2013; published 2 May 2013)

It has been shown that a nanoliter chamber separated by a wall of asymmetric obstacles can lead to an inhomogeneous distribution of self-propelled microorganisms. Although it is well established that this rectification effect arises from the interaction between the swimmers and the noncentrosymmetric pillars, here we demonstrate numerically that its efficiency is strongly dependent on the detailed dynamics of the individual microorganism. In particular, for the case of run-and-tumble dynamics, the distribution of run lengths, the rotational diffusion, and the partial preservation of run orientation memory through a tumble are important factors when computing the rectification efficiency. In addition, we optimize the geometrical dimensions of the asymmetric pillars in order to maximize the swimmer concentration and we illustrate how it can be used for sorting by swimming strategy in a long array of parallel obstacles.

DOI: 10.1103/PhysRevE.87.052702

PACS number(s): 87.17.Jj, 87.18.Hf, 05.40.—a

I. INTRODUCTION

In recent years there has been an increasing interest in the dynamics of microscopic agents confined to nanoliter-volume chambers [1,2]. These agents range from cancer [3–5], fibroblasts [6], and stem cells [7] to self-propelled bacteria [8,9], human spermatozoa [10], and microbots [11]. Each self-propelled agent has a specific propulsion mechanism and interacts in its own characteristic way with the confining walls [12–14]. A strong motivation for the study of these systems is the possibility to sort out, concentrate, and manipulate the movement and distribution of the swimmers or even to harvest their energy by using suitably designed microarchitectures [2,4–10,14–16].

In a pioneering work, Galajda *et al.* [8] experimentally demonstrated the possibility of achieving inhomogeneous bacterial concentrations by inducing an asymmetric average bacterial displacement with a microfabricated wall of funnel-shaped openings. This mechanically driven segregation seems to be threatened at sufficiently high bacterial concentrations when they can collectively migrate against the confining barriers by creating a chemoattractant gradient [17]. Very recently, a counterintuitive symmetry breaking of the strong bacterial concentration was observed under controlled flow as well, using a microfluidic channel with a symmetric single funnel [18]. Clearly, the ability to design these structures is highly dependent on our understanding of the key biophysical concepts: the motility mechanisms, the interactions between the agents and the walls, and the hydrodynamic agent-agent interactions.

Considerable attention has been devoted to motile bacteria propelled by rotary motors and exhibiting run-and-tumble dynamics. During the run mode, the flagella rotate counterclockwise and the microorganism moves in a forward, relatively straight direction, whereas during the tumble mode, one or more flagella rotate clockwise and the bacterium is reoriented towards a new direction [19,20]. In the case of

the paradigmatic bacterium *Escherichia coli*, the dynamics of its wild type and two mutants has been previously studied by Berg and Brown [21] using a three-dimensional tracking microscope. These authors found that (i) the run length is not a constant but follows an exponential distribution; (ii) the runs do not consist of strictly straight displacements but the cell meanders due to rotational diffusion; and (iii) the distribution of changes of direction from the end of one run to the beginning of the next has a maximum at a direction making an acute angle with the trajectory of the precedent run.

The first numerical attempt to describe the observed rectification of bacterial displacement [8] taking into account some of the above-mentioned ingredients was carried out by Wan and collaborators [22]. These authors considered pointlike swimming bacteria following a run-and-tumble dynamics with a constant motor force magnitude and thermal fluctuations without taking into account hydrodynamic effects. This model is able to reproduce the most important experimental findings, *i.e.*, the accumulation of swimmers next to the boundaries and the ratchet like effects of the asymmetric wall of funnels, although it ignores some important details of the swimmer dynamics, whose consideration, as we will show in this work, leads to a more accomplished and quantitative description of the observed phenomena.

In several previous simulations bacteria were assumed to have fixed run lengths, to emerge from each tumble in a completely random direction, and to move all with equal speed. Although these hypotheses capture the essential microswimmers mechanisms, they are rather artificial or inaccurate when addressing particular species [21,23–25]. The question now arises as to whether the particularities of the dynamics of each species have an impact on the efficiency of a mechanical sorter of the type mentioned above.

In this paper we address this question by investigating how different swimming strategies influence both the rectification and the separation of microswimmers. In particular, we find

Quantifying the sorting efficiency of self-propelled run-and-tumble swimmers by geometrical ratchets

Research Article

Iván Berdakin^{1,2*}, Alejandro V. Silhanek^{3†}, Hernán N. Moyano Cortéz^{1‡}, Verónica I. Marconi^{1,2§}, Carlos A. Condat^{1,2¶}

¹ Facultad de Matemática, Astronomía y Física, Universidad Nacional de Córdoba, X5000HUA Córdoba, Argentina.

² IFEG-CONICET, X5000HUA Córdoba, Argentina.

³ Département de Physique, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Belgium.

Received 31 March 2013; accepted 03 September 2013

Abstract: Suitable asymmetric microstructures can be used to control the direction of motion in microorganism populations. This rectification process makes it possible to accumulate swimmers in a region of space or to sort different swimmers. Here we study numerically how the separation process depends on the specific motility strategies of the microorganisms involved. Crucial properties such as the separation efficiency and the separation time for two bacterial strains are precisely defined and evaluated. In particular, the sorting of two bacterial populations inoculated in a box consisting of a series of chambers separated by columns of asymmetric obstacles is investigated. We show how the sorting efficiency is enhanced by these obstacles and conclude that this kind of sorting can be efficiently used even when the involved populations differ only in one aspect of their swimming strategy.

PACS (2008): 87.17.Jj, 87.17.Aa, 05.40.Fb

Keywords: swimmer sorting • motility • ratchet

© Versita sp. z o.o.

1. Introduction

Self-propelled objects moving in confining environments at low Reynolds numbers exhibit interesting physical properties, some of which are not yet well understood and deserve to be studied in view of their technological applications. These objects range from artificial microswimmers that can be actuated using applied magnetic fields [1] to motile cancer [2, 3] and stem [4] cells, to motile bacteria [5, 6] and spermatozoa [7, 8]. The study of their

*E-mail: berdakin@famaf.unc.edu.ar

†E-mail: asilhanek@ulg.ac.be

‡E-mail: hnm0108@famaf.unc.edu.ar

§E-mail: vmarconi@famaf.unc.edu.ar

¶E-mail: condat@famaf.unc.edu.ar (Corresponding author)

PHYSICAL REVIEW E **89**, 032720 (2014)**Geometrical guidance and trapping transition of human sperm cells**A. Guidobaldi,¹ Y. Jeyaram,² I. Berdakin,³ V. V. Moshchalkov,² C. A. Condat,³ V. I. Marconi,³ L. Giojalas,¹ and A. V. Silhanek⁴¹*Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, CONICET and Centro de Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, 5000-Córdoba, Argentina*²*Institute for Nanoscale Physics and Chemistry, KU Leuven, B-3001 Leuven, Belgium*³*Facultad de Matemática, Astronomía y Física, Universidad Nacional de Córdoba and IFEG-CONICET, X5000HUA Córdoba, Argentina*⁴*Département de Physique, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Belgium*

(Received 19 December 2013; revised manuscript received 6 February 2014; published 28 March 2014)

The guidance of human sperm cells under confinement in quasi-2D microchambers is investigated using a purely physical method to control their distribution. Transport property measurements and simulations are performed with diluted sperm populations, for which effects of geometrical guidance and concentration are studied in detail. In particular, a trapping transition at convex angular wall features is identified and analyzed. We also show that highly efficient microratchets can be fabricated by using curved asymmetric obstacles to take advantage of the spermatozoa specific swimming strategy.

DOI: [10.1103/PhysRevE.89.032720](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.89.032720)

PACS number(s): 87.17.Jj, 05.40.—a, 87.17.Aa, 87.18.Hf

I. INTRODUCTION

Understanding sperm dynamics under confining geometries is of primary importance for future biomedical applications and represents a major challenge both from the basic biophysics and the complex fluids points of view. Indeed, confinement effects studied by *in vitro* assays with microfluidic chambers may help us to understand the dynamics of sperm in the narrow oviduct passage traversed on their journey to the oocyte, or to develop biomedical devices for improving the treatment of infertile couples. Unfortunately, our knowledge of the swimming cell motilities in unbounded media cannot be directly extrapolated to their behavior in complex and space-limited environments, due to the close proximity to the surfaces and the consequent boundary effects. In the case where the constrictions are of similar size as the sperm, i.e., a few tens of micrometers, confined cells may undergo substantial changes in their locomotion habits, as already reported for other self-propelled microorganisms [1–3]. It has been shown that microswimmers with very different propulsion systems are similarly attracted to the walls and tend to swim parallel to the surface [2,4–11]. It is believed that this attractive force has hydrodynamic origin although other possible mechanisms have been proposed [12–14]. Several models have been introduced to describe the swimming along infinite planar surfaces [8,9,12,15–19]. Interestingly, the observed cell-wall attraction, as shown in Fig. 1, has motivated the design of ratchet devices that guide and sort self-propelled cells using asymmetric obstacles [20,21] as well as microfluidic devices aiming to either increase sperm cell quality or enhance their concentration [22–24]. The creation of inhomogeneous distributions of swimmer populations via asymmetric obstacles has been shown to be particularly efficient for run-and-tumble bacteria [20,25–28] and numerous theoretical treatments are available to account for the effects of asymmetric obstacles on active particles distributions [29–39]. Although larger and generally faster than bacteria, a similar rectification effect should, in principle, be observed for *human sperm cells*. However, a distinct property of sperm cells is their specific swimming strategy. Since spermatozoa do not tumble, their detachment from the wall, in diluted samples,

will presumably proceed from effects other than tumbling, such as the observed flagellar beating of bull spermatozoa near corners [21], rotational diffusion [8], or sporadic cell-cell collisions [40].

In this work, we show experimentally and numerically that asymmetric designs as those previously used to generate inhomogeneous bacterial distributions need to be revisited when dealing with sperm cells. Indeed, V-shaped asymmetric pillar arrays introduced to rectify bacterial displacement [20] lead to sperm trapping near the obstacle apices. A high concentration of sperm cells is then obtained at every convex angle at the expense of emptying the space away from the confining walls. This undesired effect renders the chambers with V-shaped obstacles of limited use in biomedical applications. In order to avoid this trapping mechanism leading to extreme cell aggregation, we introduce rounded and asymmetric U-shaped funnel arrays and rounded box corners. We demonstrate that, by building a row of U-shaped funnels facing a row of \cap -shaped funnels, it is possible to obtain a high concentration of *uniformly distributed* sperm cells in the region confined between the rows. Numerical simulations based on a minimal model, which reproduces qualitatively the experimental findings, allows us to capture and identify the essential physics and predict the influence of several geometrical parameters on the design. This work is then the result of a strong positive feedback among soft-lithography microfabrication, biological measurements, and phenomenological modeling without adjustable parameters.

II. FABRICATION OF HYDROSTATIC MICROFLUIDIC CHAMBERS

The quasi-2D nanoliter chambers were prepared in SU-8 or EPOCLAD negative optical resists deposited on glass substrates. The materials were chosen to ensure (a) optical transparency allowing transmission microscopy imaging, (b) high aspect ratio structures (height/width > 20), (c) biocompatibility, and (d) watertightness. Both epoxies show no particular differences concerning biocompatibility within the time frame of the experiments, although SU-8 provided higher resolution for nanofabrication. We have observed no major



Disrupting the wall accumulation of human sperm cells by artificial corrugation

H. A. Guidobaldi,¹ Y. Jeyaram,² C. A. Condat,³ M. Oviedo,¹ I. Berdakin,³
V. V. Moshchalkov,² L. C. Giojalas,¹ A. V. Silhanek,⁴ and V. I. Marconi^{3,a)}

¹*IIByT-CONICET and FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba, X5016GCA Córdoba, Argentina*

²*Institute for Nanoscale Physics and Chemistry, KU Leuven, B-3001 Leuven, Belgium*

³*FaMAF, Universidad Nacional de Córdoba and IFEG-CONICET, X5000HUA Córdoba, Argentina*

⁴*Département de Physique, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Belgium*

(Received 6 January 2015; accepted 14 April 2015; published online 24 April 2015)

Many self-propelled microorganisms are attracted to surfaces. This makes their dynamics in restricted geometries very different from that observed in the bulk. Swimming along walls is beneficial for directing and sorting cells, but may be detrimental if homogeneous populations are desired, such as in counting microchambers. In this work, we characterize the motion of human sperm cells $\sim 60 \mu\text{m}$ long, strongly confined to $\sim 25 \mu\text{m}$ shallow chambers. We investigate the nature of the cell trajectories between the confining surfaces and their accumulation near the borders. Observed cell trajectories are composed of a succession of quasi-circular and quasi-linear segments. This suggests that the cells follow a path of intermittent trappings near the top and bottom surfaces separated by stretches of quasi-free motion in between the two surfaces, as confirmed by depth resolved confocal microscopy studies. We show that the introduction of artificial petal-shaped corrugation in the lateral boundaries removes the tendency of cells to accumulate near the borders, an effect which we hypothesize may be valuable for microfluidic applications in biomedicine. © 2015 AIP Publishing LLC.

[<http://dx.doi.org/10.1063/1.4918979>]

I. INTRODUCTION

Motility is a crucial reference parameter in fertilization studies since it is an unequivocal indicator of sperm viability. Under natural conditions, a motile spermatozoon is needed for successful oocyte fertilization. When normal fertilization repeatedly fails, the infertile couple may resort to assisted reproduction techniques, where the gametes are isolated and put together to induce *in vitro* fertilization. Nowadays, sophisticated sperm cell preparation techniques, most of which require motile cells, are available to retrieve the best physiological sperm for assisted reproduction.^{1–4} For instance, higher DNA integrity in the sperm selection has been recently achieved with innovative microfluidic devices.⁵ The World Health Organization classifies semen quality based on sperm motility (asthenozoospermia) and the number of sperm cells (azoospermia), among others parameters.⁶ Thus, a sufficient number of motile cells and their precise identification are important for the clinical diagnosis associated to male infertility.

All of the microfluidic devices employed to evaluate sperm motility or sperm number^{4,5,7–14} (e.g., a drop of solution confined between two glasses or inside a microfluidic device) present one or more boundaries. The attractive interaction of sperm cells with these boundaries increases their dwell time in their neighborhood^{15–17} (in the case of extreme 2D confinement all cells should go to the border¹⁸). Consequently, errors may be introduced in the evaluation of

^{a)}Electronic mail: vmarconi@famaf.unc.edu.ar

Three linked spheres micro-swimmers: a stokesian dynamics study

I. Berdakin¹, V. I. Marconi¹, A. J. Banchio¹
¹ *Facultad de Matemática, Astronomía y Física,*
Universidad Nacional de Córdoba and IFEG-CONICET,
X5000HUA Córdoba, Argentina.

We use Stokesian Dynamics to investigate the dynamical properties and efficiency of three spheres swimmers. Results for two different strokes are compared with an approximated solution based on point forces interactions. While this approximation accurately reproduce the solutions for swimmers with long arms and strokes of small amplitude, it fails for higher compressions, condition where the best efficiencies are found. Finally, swimmers with a square stroke are more efficient for long arms than swimmers with a circle stroke, but the differences between the two strokes are lost when the arms are short.

PACS numbers:

I. INTRODUCTION

Self-propulsion of microorganisms and artificial swimmers is only possible through the generation of motility strategies that are able to overcome the absence of inertia. This condition, implied in every low Reynolds number regime, enables the success of only those strategies that are irreversible in phase space [1]. One of the simplest swimmers meeting this requirement is the three-linked-spheres, a swimmer built upon three spheres linked by two arms that contracts asynchronously [3]. The simplicity of this swimmer allow it to be studied analytically [4] and numerically, making it an excellent choice to study test the stokesian dynamics approach.

In this work we use stokesian dynamics simulations to study in detail the forces acting on each of the swimmer's components and the power consumption during its motion. We define efficiency as the ratio between power dissipation and the work needed to produce the same motion by an external force. We find that the most efficient swimmer is that in which its arms contracts almost absolutely. Interestingly, under these optimum conditions, the analytical predictions based on first order approximations of the hydrodynamic equations divert significantly from those found in our simulations, in which near field interactions are taken into account. This highlights the importance of considering the finite size of the spheres, as it is done by the method implemented here. We believe that the results shown in this work would be very useful when designing an artificial swimmer of this kind with the intention to test it experimentally.

II. MODEL-PF-SD

A. Point Forces (PF) approximation

The three linked spheres swimmer, TLS, geometry is shown in Fig. 1. It consists of three spheres linked by two virtual arms of lengths L_1 and L_2 . The length of each

FIG. 1: Geometry of the three linked spheres swimmer. (a-d) represent the configuration changes of the swimmer during a SC, starting from a stretched initial state. Dash dotted line corresponds to $x = 0$ and dashed line corresponds to the evolution of the center of mass of the swimmer, cm , during the cycle. Two cycles, square and circular, are represented in the $L_1 - L_2$ space.

arm ranges between its contracted $l - d$ and its stretched $l + d$ states. The swimmer stroke could be any closed cycle in the space $L_1 - L_2$. In this work we are going to investigate two cases: the square cycle, SC, and the circular cycle, CC.

Following the work of Golestanian and Ajdari [4] we write the relation between the forces f_i that each sphere produce on the fluid and the spheres velocities v_i assuming that the spheres act like point forces on the fluid. If $a/(l - d) \ll 1$ it is always true that

$$\begin{aligned}\pi\eta v_1 &= \frac{f_1}{6a} + \frac{f_2}{4L_1} + \frac{f_3}{4(L_1 + L_2)} \\ \pi\eta v_2 &= \frac{f_1}{4L_1} + \frac{f_2}{6a} + \frac{f_3}{4L_2} \\ \pi\eta v_3 &= \frac{f_1}{4(L_1 + L_2)} + \frac{f_2}{4L_2} + \frac{f_3}{6a}\end{aligned}\quad (1)$$

Using the self propulsion condition $f_1 + f_2 + f_3 = 0$ and defining the arms contraction velocities as $\dot{L}_1 = v_2 - v_1$ and $\dot{L}_2 = v_3 - v_2$ it is easy to see that

$$\pi\eta \begin{bmatrix} \dot{L}_1 \\ \dot{L}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ -B & C \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} f_1 \\ f_3 \end{bmatrix}\quad (2)$$

where

Bibliografía

Y así, del mucho leer y del poco dormir, se le secó el cerebro de manera que vino a perder el juicio.

Miguel de Cervantes Saavedra

- ALEXANDER, G., POOLEY, C. y YEOMANS, J. Hydrodynamics of linked sphere model swimmers. *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 21(20), página 204108, 2009.
- ALEXANDER, G. P., POOLEY, C. y YEOMANS, J. M. Scattering of low-reynolds-number swimmers. *Physical Review E*, vol. 78(4), página 045302, 2008.
- ALOUGES, F., DESIMONE, A. y LEFEBVRE, A. Optimal strokes for axisymmetric microswimmers. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, vol. 28(3), páginas 279–284, 2009.
- ANGELANI, L., DI LEONARDO, R. y RUOCCO, G. Self-starting micromotors in a bacterial bath. *Physical Review Letters*, vol. 102(4), página 048104, 2009.
- AVRON, J., GAT, O. y KENNETH, O. Optimal swimming at low reynolds numbers. *Physical Review Letters*, vol. 93(18), página 186001, 2004.
- AVRON, J., KENNETH, O. y OAKNIN, D. Pushmepullyou: an efficient micro-swimmer. *New Journal of Physics*, vol. 7(1), página 234, 2005.
- AVRON, J. y RAZ, O. A geometric theory of swimming: Purcell’s swimmer and its symmetrized cousin. *New Journal of Physics*, vol. 10(6), página 063016, 2008.
- BAHAT, A., TUR-KASPA, I., GAKAMSKY, A., GIOJALAS, L. C., BREITBART, H. y EISENBACH, M. Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medicine*, vol. 9(2), páginas 149–150, 2003.
- BECKER, L. E., KOEHLER, S. A. y STONE, H. A. On self-propulsion of micro-machines at low reynolds number: Purcell’s three-link swimmer. *Journal of fluid mechanics*, vol. 490, páginas 15–35, 2003.

- BERDAKIN, I., JEYARAM, Y., MOSHCHALOV, V., VENKEN, L., DIERCKX, S., VANDERLEYDEN, S., SILHANEK, A., CONDAT, C. A. y MARCONI, V. Influence of swimming strategy on microorganism separation by asymmetric obstacles. *Physical Review E*, vol. 87(5), página 052702, 2013a.
- BERDAKIN, I., MARCONI, V. I. y BANCHIO, A. J. Three linked spheres microswimmers: a stokesian dynamics study. *En preparación, a ser enviado a Physical Review E*, 2015.
- BERDAKIN, I., SILHANEK, A. V., CORTÉZ, H. N. M., MARCONI, V. I. y CONDAT, C. A. Quantifying the sorting efficiency of self-propelled run-and-tumble swimmers by geometrical ratchets. *Central European Journal of Physics*, vol. 11(12), páginas 1653–1661, 2013b.
- BERG, H. C. *Random walks in biology*. Princeton University Press, 1993.
- BERG, H. C. The rotary motor of bacterial flagella. *Biochemistry*, vol. 72(1), página 19, 2003.
- BERG, H. C., BROWN, D. A. ET AL. Chemotaxis in escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, vol. 239(5374), páginas 500–504, 1972.
- BERKE, A. P., TURNER, L., BERG, H. C. y LAUGA, E. Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces. *Physical Review Letters*, vol. 101(3), página 038102, 2008.
- BLAKEMORE, R. Magnetotactic bacteria. *Science*, vol. 190(4212), páginas 377–379, 1975.
- BRADY, J. F. y BOSSIS, G. Stokesian dynamics. *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 20, páginas 111–157, 1988.
- BREWIS, I. A., MOORE, H. D., FRASER, L. R., HOLT, W. V., BALDI, E., LUCONI, M., GADELLA, B. M., FORD, W. C. L. y HARRISON, R. A. Molecular mechanisms during sperm capacitation. *Human Fertility*, vol. 8(4), páginas 253–261, 2005.
- BROKAW, C. J. Computer simulation of flagellar movement: Vii. conventional but functionally different cross-bridge models for inner and outer arm dyneins can explain the effects of outer arm dynein removal. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 42(2), páginas 134–148, 1999.
- BROKAW, C. J. Simulation of cyclic dynein-driven sliding, splitting, and reassociation in an outer doublet pair. *Biophysical Journal*, vol. 97(11), páginas 2939–2947, 2009.
- BURKITT, M., WALKER, D., ROMANO, D. M. y FAZELI, A. Computational modelling of maternal interactions with spermatozoa: potentials and prospects. *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 23(8), páginas 976–989, 2011.

- CĒBERS, A. Flexible magnetic filaments. *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 10(3), páginas 167–175, 2005.
- CHWANG, A. T. y WU, T. Hydromechanics of low-reynolds-number flow. part 2. singularity method for stokes flows. *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 67(04), páginas 787–815, 1975.
- CONDAT, C. A. y DI SALVO, M. E. Interplay between energetics and dynamics in bacterial motility. *Physical Review E*, vol. 84(1), página 011911, 2011.
- CONDAT, C. A., JÄCKLE, J. y MENCHÓN, S. Randomly curved runs interrupted by tumbling: A model for bacterial motion. *Physical Review E*, vol. 72(2), página 021909, 2005.
- CORKIDI, G., TABOADA, B., WOOD, C., GUERRERO, A. y DARSZON, A. Tracking sperm in three-dimensions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 373(1), páginas 125–129, 2008.
- CORTEZ, R., FAUCI, L., COWEN, N. y DILLON, R. Simulation of swimming organisms: coupling internal mechanics with external fluid dynamics. *Computing in Science & Engineering*, vol. 6(3), páginas 38–45, 2004.
- COSSON, J., HUITOREL, P. y GAGNON, C. How spermatozoa come to be confined to surfaces. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 54(1), páginas 56–63, 2003.
- CUMMINS, J. y WOODALL, P. On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 75(1), páginas 153–175, 1985.
- DAVID, G., SERRES, C. y JOUANNET, P. Kinematics of human spermatozoa. *Gamete Research*, vol. 4(2), páginas 83–95, 1981.
- DETINGER, S. K., CHIU, D. T., JEON, N. L. y WHITESIDES, G. M. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. *Analytical Chemistry*, vol. 73(6), páginas 1240–1246, 2001.
- DI LEONARDO, R., DELL ARCIPRETE, D., ANGELANI, L. y IEBBA, V. Swimming with an image. *Physical Review Letters*, vol. 106(3), página 038101, 2011.
- DI SALVO, M. E. y CONDAT, C. A. Observed frequency-independent torque in flagellar bacterial motors optimizes space exploration. *Physical Review E*, vol. 86(6), página 061907, 2012.
- DRESCHER, K., DUNKEL, J., CISNEROS, L. H., GANGULY, S. y GOLDSTEIN, R. E. Fluid dynamics and noise in bacterial cell–cell and cell–surface scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108(27), páginas 10940–10945, 2011.

- DRESCHER, K., GOLDSTEIN, R. E., MICHEL, N., POLIN, M. y TUVAL, I. Direct measurement of the flow field around swimming microorganisms. *Physical Review Letters*, vol. 105(16), página 168101, 2010.
- DREYFUS, R., BAUDRY, J., ROPER, M. L., FERMIGIER, M., STONE, H. A. y BIBETTE, J. Microscopic artificial swimmers. *Nature*, vol. 437(7060), páginas 862–865, 2005.
- DROCCO, J. A., REICHHARDT, C. O. y REICHHARDT, C. Bidirectional sorting of flocking particles in the presence of asymmetric barriers. *Physical Review E*, vol. 85(5), página 056102, 2012.
- DUNIN-BORKOWSKI, R. E., MCCARTNEY, M. R., FRANKEL, R. B., BAZYLINSKI, D. A., PÓSFAL, M. y BUSECK, P. R. Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science*, vol. 282(5395), páginas 1868–1870, 1998.
- EISENBACH, M. y GIOJALAS, L. C. Sperm guidance in mammals: An unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7(4), páginas 276–285, 2006.
- FLORY, P., VOLKENSTEIN, M. ET AL. Statistical mechanics of chain molecules. 1969.
- FRYMIER, P. D., FORD, R. M., BERG, H. C. y CUMMINGS, P. T. Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92(13), páginas 6195–6199, 1995.
- GAFFNEY, E., GADÊLHA, H., SMITH, D. J., BLAKE, J. R. y KIRKMAN-BROWN, J. Mammalian sperm motility: observation and theory. *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 43, páginas 501–528, 2011.
- GALAJDA, P., KEYMER, J., CHAIKIN, P. y AUSTIN, R. A wall of funnels concentrates swimming bacteria. *Journal of bacteriology*, vol. 189(23), páginas 8704–7, 2007. ISSN 1098-5530.
- GAUGER, E. y STARK, H. Numerical study of a microscopic artificial swimmer. *Physical Review E*, vol. 74(2), página 021907, 2006.
- GHOSH, A. y FISCHER, P. Controlled propulsion of artificial magnetic nanostructured propellers. *Nano letters*, vol. 9(6), páginas 2243–2245, 2009.
- GILLIES, E. A., CANNON, R. M., GREEN, R. B. y PACEY, A. A. Hydrodynamic propulsion of human sperm. *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 625, páginas 445–474, 2009.
- GOLDSTEIN, R. E., POLIN, M. y TUVAL, I. Noise and synchronization in pairs of beating eukaryotic flagella. *Physical Review Letters*, vol. 103(16), página 168103, 2009.
- GOLESTANIAN, R. y AJDARI, A. Analytic results for the three-sphere swimmer at low reynolds number. *Physical Review E*, vol. 77(3), página 036308, 2008.

- GRAY, J. y HANCOCK, G. The propulsion of sea-urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, vol. 32(4), páginas 802–814, 1955.
- GUASTO, J. S., JOHNSON, K. A. y GOLLUB, J. P. Oscillatory flows induced by microorganisms swimming in two dimensions. *Physical Review Letters*, vol. 105(16), página 168102, 2010.
- GUERRERO, A., NISHIGAKI, T., CARNEIRO, J., TATSU, Y., WOOD, C. D. y DARZON, A. Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*, vol. 344(1), páginas 52–65, 2010.
- GUIDOBALDI, A., JEYARAM, Y., BERDAKIN, I., MOSHCHALOV, V. V., CONDAT, C. A., MARCONI, V. I., GIOJALAS, L. y SILHANEK, A. Geometrical guidance and trapping transition of human sperm cells. *Physical Review E*, vol. 89(3), página 032720, 2014.
- GUIDOBALDI, H., JEYARAM, Y., CONDAT, C. A., OVIEDO, M., BERDAKIN, I., MOSHCHALOV, V., GIOJALAS, L., SILHANEK, A. y MARCONI, V. I. Disrupting the wall accumulation of human sperm cells by artificial corrugation. *Biomicrofluidics*, vol. 9, página 024122, 2015.
- GUIDOBALDI, H. A., TEVES, M. E., UÑATES, D. R., ANASTASÍA, A. y GIOJALAS, L. C. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One*, vol. 3(8), página e3040, 2008.
- HANCOCK, G. The self-propulsion of microscopic organisms through liquids. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, vol. 217(1128), páginas 96–121, 1953.
- HAPPEL, J. y BRENNER, H. Low Reynolds Number Hydrodynamics. *Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall*, 1965.
- HENKES, S., FILY, Y. y MARCHETTI, M. C. Active jamming: Self-propelled soft particles at high density. *Physical Review E*, vol. 84(4), página 040301, 2011.
- HINES, M. y BLUM, J. Bend propagation in flagella. i. derivation of equations of motion and their simulation. *Biophysical Journal*, vol. 23(1), páginas 41–57, 1978.
- HUANG, Y., AGRAWAL, B., SUN, D., KUO, J. S. y WILLIAMS, J. C. Microfluidics-based devices: New tools for studying cancer and cancer stem cell migration. *Biomicrofluidics*, vol. 5(1), página 013412, 2011.
- HULME, S. E., DiLUZIO, W. R., SHEVKOPLYAS, S. S., TURNER, L., MAYER, M., BERG, H. C. y WHITESIDES, G. M. Using ratchets and sorters to fractionate motile cells of escherichia coli by length. *Lab on a Chip*, vol. 8(11), páginas 1888–1895, 2008.

- ISHIKAWA, T., SEKIYA, G., IMAI, Y. y YAMAGUCHI, T. Hydrodynamic interactions between two swimming bacteria. *Biophysical Journal*, vol. 93(6), páginas 2217–2225, 2007.
- JALALI, M. A., ALAM, M.-R. y MOUSAVI, S. Quadroar: a versatile low-reynolds-number swimmer. *arXiv preprint arXiv:1408.5428*, 2014.
- JEFFREY, D. y ONISHI, Y. Calculation of the resistance and mobility functions for two unequal rigid spheres in low-reynolds-number flow. *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 139, páginas 261–290, 1984.
- JEON, N. L., DERTINGER, S. K., CHIU, D. T., CHOI, I. S., STROOCK, A. D. y WHITESIDES, G. M. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, vol. 16(22), páginas 8311–8316, 2000.
- KAISER, A., WENSINK, H. y LÖWEN, H. How to capture active particles. *Physical Review Letters*, vol. 108(26), página 268307, 2012.
- KANTSLEER, V., DUNKEL, J., POLIN, M. y GOLDSTEIN, R. E. Ciliary contact interactions dominate surface scattering of swimming eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110(4), páginas 1187–1192, 2013.
- KEAVENY, E. E. y MAXEY, M. R. Spiral swimming of an artificial micro-swimmer. *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 598, páginas 293–319, 2008.
- KIM, S. y KARRILA, J. S. *Microhydrodynamics: Principles and Selected Applications*. Boston, MA: Butterworth-Heinemann, 1991.
- KIM, S. Y., LEE, E. S., LEE, H. J., LEE, S. Y., LEE, S. K. y KIM, T. Microfabricated ratchet structures for concentrating and patterning motile bacterial cells. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20(9), página 095006, 2010.
- KING, N., WESTBROOK, M. J., YOUNG, S. L., KUO, A., ABEDIN, M., CHAPMAN, J., FAIRCLOUGH, S., HELLSTEN, U., ISOGAI, Y., LETUNIC, I. ET AL. The genome of the choanoflagellate *monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature*, vol. 451(7180), páginas 783–788, 2008.
- LAMBERT, G., LIAO, D. y AUSTIN, R. H. Collective escape of chemotactic swimmers through microscopic ratchets. *Physical Review Letters*, vol. 104(16), página 168102, 2010.
- LAUGA, E., DILUZIO, W. R., WHITESIDES, G. M. y STONE, H. A. Swimming in circles: motion of bacteria near solid boundaries. *Biophysical Journal*, vol. 90(2), páginas 400–412, 2006.

- LAUGA, E. y POWERS, T. R. The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Reports on Progress in Physics*, vol. 72(9), página 096601, 2009.
- LEDESMA-AGUILAR, R., LÖWEN, H. y YEOMANS, J. M. A circle swimmer at low reynolds number. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, vol. 35(8), páginas 1–9, 2012.
- LEONI, M., KOTAR, J., BASSETTI, B., CICUTA, P. y LAGOMARSINO, M. C. A basic swimmer at low reynolds number. *Soft Matter*, vol. 5(2), páginas 472–476, 2009.
- LEUNG, K., ZAHN, H., LEAVER, T., KONWAR, K. M., HANSON, N. W., PAGÉ, A. P., LO, C.-C., CHAIN, P. S., HALLAM, S. J. y HANSEN, C. L. A programmable droplet-based microfluidic device applied to multiparameter analysis of single microbes and microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109(20), páginas 7665–7670, 2012.
- LI, G. y TANG, J. X. Accumulation of microswimmers near a surface mediated by collision and rotational brownian motion. *Physical Review Letters*, vol. 103(7), página 078101, 2009.
- LIGHTHILL, J. Flagellar hydrodynamics. *SIAM Review*, vol. 18(2), páginas 161–230, 1976.
- LINDEMANN, C. B. A “geometric clutch” hypothesis to explain oscillations of the axoneme of cilia and flagella. *Journal of Theoretical Biology*, vol. 168(2), páginas 175–189, 1994.
- LINDEMANN, C. B. Testing the geometric clutch hypothesis. *Biology of the Cell*, vol. 96(9), páginas 681–690, 2004.
- LOVELY, P. S. y DAHLQUIST, F. Statistical measures of bacterial motility and chemotaxis. *Journal of theoretical biology*, vol. 50(2), páginas 477–496, 1975.
- MAHMUD, G., CAMPBELL, C. J., BISHOP, K. J., KOMAROVA, Y. A., CHAGA, O., SOH, S., HUDA, S., KANDERE-GRZYBOWSKA, K. y GRZYBOWSKI, B. A. Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nature Physics*, vol. 5(8), páginas 606–612, 2009.
- MÄNNIK, J., DRIESSEN, R., GALAJDA, P., KEYMER, J. E. y DEKKER, C. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106(35), páginas 14861–14866, 2009.
- MARCHETTI, M., JOANNY, J., RAMASWAMY, S., LIVERPOOL, T., PROST, J., RAO, M. y SIMHA, R. A. Hydrodynamics of soft active matter. *Reviews of Modern Physics*, vol. 85(3), página 1143, 2013.

- MCDONALD, J. C. y WHITESIDES, G. M. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, vol. 35(7), páginas 491–499, 2002.
- MIÑO, G., MALLOUK, T. E., DARNIGE, T., HOYOS, M., DAUCHET, J., DUNSTAN, J., SOTO, R., WANG, Y., ROUSSELET, A. y CLEMENT, E. Enhanced diffusion due to active swimmers at a solid surface. *Physical Review Letters*, vol. 106(4), página 048102, 2011.
- MORTIMER, S. y MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Journal of Andrology*, vol. 11(3), páginas 195–203, 1990.
- MORTIMER, S., SWAN, M. y MORTIMER, D. Fractal analysis of capacitating human spermatozoa. *Human reproduction*, vol. 11(5), páginas 1049–1054, 1996.
- MORTIMER, S. T., SCHÈVÄERT, D., SWAN, M. A. y MORTIMER, D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction*, vol. 12(5), páginas 1006–1012, 1997.
- MOYANO CORTEZ, H. N. y MARCONI, V. I. Dinámica bacteriana en sustratos microdiseñados. *Trabajo Especial de Licenciatura en Física, FaMAF*, 2014.
- NAJAFI, A. y GOLESTANIAN, R. Simple swimmer at low reynolds number: Three linked spheres. *Physical Review E*, vol. 69(6), página 062901, 2004.
- PESKIN, C. S. The immersed boundary method. *Acta Numerica*, vol. 11, páginas 479–517, 2002.
- PICKL, K., GÖTZ, J., IGLBERGER, K., PANDE, J., MECKE, K., SMITH, A.-S. y RÜDE, U. All good things come in threes. three beads learn to swim with lattice boltzmann and a rigid body solver. *Journal of Computational Science*, vol. 3(5), páginas 374–387, 2012.
- POOLEY, C., ALEXANDER, G. y YEOMANS, J. Hydrodynamic interaction between two swimmers at low reynolds number. *Physical Review Letters*, vol. 99(22), página 228103, 2007.
- PURCELL, E. M. Life at low Reynolds number. *AIP Conference Proceedings*, vol. 28, página 49, 1976.
- RALT, D., GOLDENBERG, M., FETTEROLF, P., THOMPSON, D., DOR, J., MASHIACH, S., GARBERS, D. L. y EISENBACH, M. Sperm attraction to a follicular factor (s) correlates with human egg fertilizability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88(7), páginas 2840–2844, 1991.

- REICHHARDT, C. O., DROCCO, J., MAI, T., WAN, M. y REICHHARDT, C. Active matter on asymmetric substrates. En *SPIE NanoScience+ Engineering*, páginas 80970A–80970A. International Society for Optics and Photonics, 2011.
- RIEDEL-KRUSE, I. H., HILFINGER, A., HOWARD, J. y JÜLICHER, F. How molecular motors shape the flagellar beat. *HFSP Journal*, vol. 1(3), páginas 192–208, 2007.
- ROPER, M., DREYFUS, R., BAUDRY, J., FERMIGIER, M., BIBETTE, J. y STONE, H. A. On the dynamics of magnetically driven elastic filaments. *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 554, páginas 167–190, 2006.
- ROTHSCHILD, L. Non-random distribution of bull spermatozoa in a drop of sperm suspension. *Nature*, vol. 198, página 1221, 1963.
- SHAPER, A. y WILCZEK, F. Self-propulsion at low reynolds number. *Physical Review Letters*, vol. 58(20), página 2051, 1987.
- SHAPER, A. y WILCZEK, F. Efficiencies of self-propulsion at low reynolds number. *Journal of fluid mechanics*, vol. 198, páginas 587–599, 1989.
- SHIN, Y., HAN, S., JEON, J. S., YAMAMOTO, K., ZERVANTONAKIS, I. K., SUDO, R., KAMM, R. D. y CHUNG, S. Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nature Protocols*, vol. 7(7), páginas 1247–1259, 2012.
- SMITH, D. y BLAKE, J. Surface accumulation of spermatozoa: A fluid dynamics phenomenon. *Mathematical Scientist*, vol. 34(2), 2009.
- SMITH, D., GAFFNEY, E., GADÊLHA, H., KAPUR, N. y KIRKMAN-BROWN, J. Bend propagation in the flagella of migrating human sperm, and its modulation by viscosity. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 66(4), páginas 220–236, 2009.
- SOKOLOV, A., APODACA, M. M., GRZYBOWSKI, B. A. y ARANSON, I. S. Swimming bacteria power microscopic gears. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107(3), páginas 969–974, 2010.
- SOKOLOV, A., ARANSON, I. S., KESSLER, J. O. y GOLDSTEIN, R. E. Concentration dependence of the collective dynamics of swimming bacteria. *Physical Review Letters*, vol. 98(15), página 158102, 2007.
- SQUIRES, T. M. y QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of modern physics*, vol. 77(3), página 977, 2005.
- STONE, H. y SAMUEL, A. Propulsion of Microorganisms by Surface Distortions. *Physical Review Letters*, vol. 77(19), páginas 4102–4104, 1996. ISSN 1079-7114.

- SU, T.-W., XUE, L. y OZCAN, A. High-throughput lensfree 3d tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109(40), páginas 16018–16022, 2012.
- SWAN, J. W., BRADY, J. F., MOORE, R. S. ET AL. Modeling hydrodynamic self-propulsion with stokesian dynamics. or teaching stokesian dynamics to swim. *Physics of Fluids (1994-present)*, vol. 23(7), página 071901, 2011.
- TAILLEUR, J. y CATES, M. Sedimentation, trapping, and rectification of dilute bacteria. *EPL (Europhysics Letters)*, vol. 86(6), página 60002, 2009.
- TAM, D. y HOSOI, A. Optimal feeding and swimming gaits of biflagellated organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108(3), páginas 1001–1006, 2011.
- TAM, D. y HOSOI, A. E. Optimal stroke patterns for purcells three-link swimmer. *Physical Review Letters*, vol. 98(6), página 068105, 2007.
- TAYLOR, G. Analysis of the swimming of microscopic organisms. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, vol. 209(1099), páginas 447–461, 1951.
- VAN TEEFFELEN, S. y LÖWEN, H. Dynamics of a brownian circle swimmer. *Physical Review E*, vol. 78(2), página 020101, 2008.
- THAR, R. y FENCHEL, T. True chemotaxis in oxygen gradients of the sulfur-oxidizing bacterium thiovulum majus. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67(7), páginas 3299–3303, 2001.
- UNGER, M. A., CHOU, H.-P., THORSEN, T., SCHERER, A. y QUAKE, S. R. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, vol. 288(5463), páginas 113–116, 2000.
- VAN KAMPEN, N. *Stochastic processes in physics and chemistry*. 3rd edition, North Holland, 2007.
- WAN, M., OLSON REICHHARDT, C., NUSSINOV, Z. y REICHHARDT, C. Rectification of Swimming Bacteria and Self-Driven Particle Systems by Arrays of Asymmetric Barriers. *Physical Review Letters*, vol. 101(1), páginas 1–4, 2008. ISSN 0031-9007.
- WEBER, C., RADTKE, P. K., SCHIMANSKY-GEIER, L. y HÄNGGI, P. Active motion assisted by correlated stochastic torques. *Physical Review E*, vol. 84(1), página 011132, 2011.
- WEIBEL, D. B., DILUZIO, W. R. y WHITESIDES, G. M. Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5(3), páginas 209–218, 2007.

- WHITESIDES, G. M., OSTUNI, E., TAKAYAMA, S., JIANG, X. y INGBER, D. E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 3(1), páginas 335–373, 2001.
- WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C. y WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95(12), páginas 6578–6583, 1998.
- WILLIAMS, M., HILL, C., SCUDAMORE, I., DUNPHY, B., COOKE, I. y BARRATT, C. Physiology: Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Human Reproduction*, vol. 8(12), páginas 2019–2026, 1993.
- WOOLLEY, D. Motility of spermatozoa at surfaces. *Reproduction*, vol. 126(2), páginas 259–270, 2003.
- XIA, Y. y WHITESIDES, G. M. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*, vol. 28(1), páginas 153–184, 1998.
- XIE, L., ALTINDAL, T., CHATTOPADHYAY, S. y WU, X.-L. Bacterial flagellum as a propeller and as a rudder for efficient chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108(6), páginas 2246–2251, 2011.
- YARIV, E. Self-propulsion in a viscous fluid: arbitrary surface deformations. *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 550, páginas 139–148, 2006.
- YEUNG, W., NG, V., LAU, E. y HO, P. Human oviductal cells and their conditioned medium maintain the motility and hyperactivation of human spermatozoa in vitro. *Human Reproduction*, vol. 9(4), páginas 656–660, 1994.

