

HOJA DE APROBACIÓN

Titulo de la Propuesta: Estudio de la adhesión de una bacteria
a un sustrato en la presencia de un
flujo cortante

Nombre del Candidato: Carlos Adolfo Forero González
Maestría en Ingeniería Mecánica, 2013

Propuesta aprobada por:

Dr. Andrés González-Mancera
Profesor Asistente
Departamento de Ingeniería Mecánica

Fecha de Aprobación: Julio 2013

Carlos Adolfo Forero González

Carrera 63 # 22 - 45

Bogotá, Colombia

ca.forero51@uniandes.edu.co

EDUCACIÓN

Ingeniero Mecatrónico, Julio 2004

Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia

Esp. en Automatización Industrial, Julio 2006

Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia

CARGO PROFESIONAL

Profesor Auxiliar 3/06 - 3/08

Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia.

Profesor Asistente 3/08

Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia.

ESTUDIO DE LA ADHESIÓN DE UNA BACTERIA
A UN SUSTRATO EN LA PRESENCIA DE UN
FLUJO CORTANTE

por

Carlos Adolfo Forero González

Tesis de investigación para optar
al título de Maestría en Ingeniería Mecánica
2013

Índice general

List of Tables	III
List of Figures	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Cápsulas y membranas	4
1.3. Organización	5
2. MÉTODOS Y MODELOS	6
2.1. INTERACCIONES DE UNA CÁPSULA INMERSA EN UN FLUIDO CORTANTE (MODELO EN LA MI-CRO-ESCALA)	6
2.2. BACTERIA ESCHERICHIA COLI	11
2.2.1. Propiedades físicas y mecánicas de un pili	11
2.2.1.1. Modelos de la Fuerza en un Pili - (modelo en la nano-escala)	12
2.2.1.2. Dinámica del Enrollamiento y Desenrollamiento - (modelo en la nano-escala)	13
2.2.1.3. Dinámica de los Enlaces -(modelo en la escala mole-cular)	15
3. RESULTADOS Y SIMULACIONES	18
3.1. SIMULACIÓN DE UNA CÁPSULA ESFÉRICA EN UN FLUJO CORTANTE SEMI-INFINITO	19
3.2. SIMULACIÓN DE LA EXTENSIBILIDAD DEL PILI	21
3.3. SIMULACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA DEL ENLACE DE UN PILI	26
3.4. SELECCIÓN DE MODELOS	27
3.5. SIMULACIÓN DE LA BACTERIA EN UN FLUJO CORTANTE SEMI-INFINITO CON UN SOLO PILI	28
3.6. MÚLTIPLES PILIS EN LA SUPERFICIE DE LA BACTERIA	32
4. CONCLUSIONES	38
A. APÉNDICE A - GRÁFICAS DE VELOCIDAD VS TIEMPO PARA EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS	39
Bibliography	

Índice de cuadros

3.1. Cantidad de elementos y numero de nodos por orden de malla	20
3.2. Parámetros de Simulación	23
3.3. Parámetros de Simulación para el tiempo de Vida de un Enlace . . .	27
3.4. Parámetros de Simulación para un Pili	30
3.5. Parámetros Diseño de Experimentos 3 ³	32

Índice de figuras

1.1. Estructura de la bacteria E. Coli [1]	1
2.1. Cápsula esférica en presencia de un flujo cortante	6
2.2. Malla para la cápsula	8
2.3. División del Icosaedro	10
2.4. Estructura del Pili	11
2.5. Regiones de Alargamiento del Pili de la bacteria E. Coli	12
2.6. Tipos de Enlaces que se pueden presentar entre el pili y el sustrato .	15
3.1. Proceso de Selección de Modelos	18
3.2. Selección de modelos en la Nano-escala y Escala Molecular	19
3.3. Velocidad del Centroides de la Membrana para cada malla	20
3.4. Velocidad del Centro de Gravedad de una membrana en el eje del fluido	21
3.5. Diagrama de Flujo para la simulación de los modelos WLC y FJC . .	22
3.6. Diagrama de elongación de un pili tipo 1	22
3.7. Fuerza vs Elongación para los modelos WLC y FJC	24
3.8. Fuerza vs Desplazamiento a diferentes pasos de Tiempo	25
3.9. Diagrama de extensión y relajación del Pili a velocidad constante . .	25
3.10. Fuerza vs Desplazamiento, Extensión y Relajación del pili	26
3.11. Histograma del Tiempo de Vida de un Enlace	27
3.12. Estado inicial de la simulación	29
3.13. Velocidad de la cápsula por efecto de la adhesión de un pili	30
3.14. Fuerza del pili durante la simulación	31
3.15. Comportamiento de la bacteria	31
3.16. Análisis de correlación del desplazamiento de la bacteria	33

3.17. Análisis de correlación de la velocidad promedio de la bacteria	34
3.18. Correlación entre la cantidad de pilis y la longitud de estos para la fuerza promedio de un pili	35
3.19. Correlación entre el cortante del fluido y las variables de longitud del pili y cantidad de pilis	35
3.20. Fuerza de ruptura para diferentes cortantes del fluido	36
3.21. Correlación entre el cortante del fluido, la cantidad de pilis y el tiempo de vida de un enlace	37

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

A través de los años el hombre ha tratado de modelar el funcionamiento de diferentes sistemas para comprender características propias de estos y las diferentes leyes que los gobiernan. La simulación computacional permite reemplazar o amplificar experiencias reales con experiencias guiadas que aluden o replican aspectos fundamentales del mundo real de manera completamente interactiva. [2]

Déjenos la primera referencia?

En medicina con los avances tecnológicos, se han realizado diferentes ensayos para contrarrestar los efectos de enfermedades que afectan el sano desarrollo de la vida de una persona. Al pasar de los años diferentes autores han realizado estudios de las propiedades mecánicas que afectan la adhesión de la bacteria *Escherichia Coli* figura 1.1 en el organismo humano, esto para posteriormente poder aplicarlos a procedimientos y medicinas que ayuden a liberar de manera más fácil y óptima este tipo de microorganismos del cuerpo. [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11]

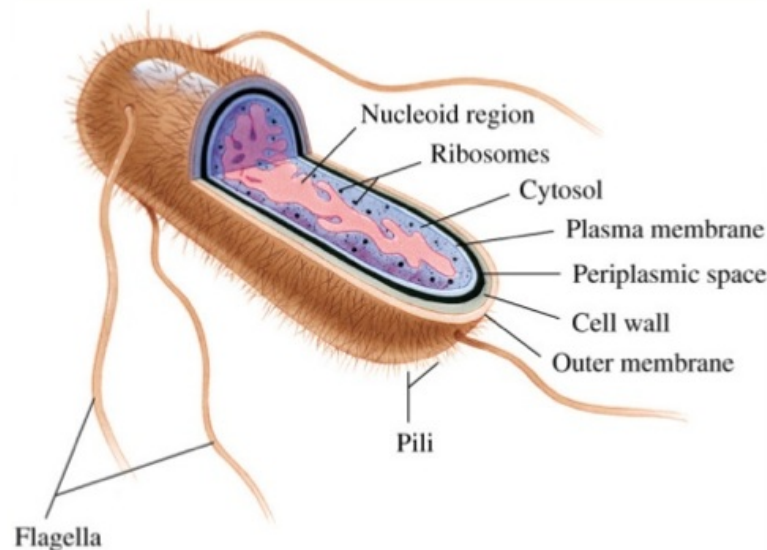


Figura 1.1: Estructura de la bacteria *E. Coli* [1]

En 1885 Theodore Escherich, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neo natos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli* en su homenaje y desde entonces ha sido uno de los seres vivos más estudiados, de hecho gran parte de los conocimientos sobre la biología

celular fueron adquiridos en estudios con este microorganismo. Se han descrito un gran número de patotipos de *E. coli*. La similitud de los nombres dados a los diferentes tipos, las inconsistencias en el uso de una única nomenclatura en la literatura, el avance en los conocimientos de la patogénesis y la emergencia de nuevos patotipos han contribuido a la complejidad de la nomenclatura de estas cepas. [12]

Porqué nos interesa esto?

las bacterias no se organizan por tribus. Poner itálicas

La *Escherichia Coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Las cepas de *E. Coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC). [10]

Las cepas que causan los síndromes extraintestinales son genéricamente denominadas como *E. coli* extraintestinales (ExPEC) siendo clasificadas como cepas *E. coli* uropatógenas (UPEC) y *E. coli* asociadas a meningitis (MAEC). Las cepas ExPEC que son caracterizadas por la diversidad de factores de virulencia que poseen, pueden causar infecciones en una diversidad de sitios extraintestinales, tales como el tracto urinario, corriente sanguínea, meninges, cavidad peritoneal y pulmones. [10]

referencias? falta claridad

La *E. Coli* uropatógena (UPEC) causa el 90 % de las infecciones urinarias (cistitis y pielonefritis), la adhesina asociada a esta causa de infección urinaria es la fimbria “PILI” de la bacteria. Este normalmente se encuentra en forma de hélice y a medida que se aplican esfuerzos causados por un flujo cortante se va elongando.

La fisionomía de la bacteria *E. Coli* se puede observar en la figura 1.1, la cual se compone de una cápsula bastante rígida denominada membrana que recubre el interior de esta, aparte de unas fimbrias largas denominadas flagelos que son los encargados de permitir la navegación de la bacteria por el ambiente en el que se encuentra inmersa y los pilis que entre sus funciones esta la adhesión con las paredes.

Un paso crítico en la infección bacteriana es la unión de la bacteria a una superficie de acogida, que a menudo mediada por las interacciones específicas entre las proteínas adhesivas llamadas adhesinas y sus receptores de destino en los tejidos del huésped se realiza con un intercambio químico entre los dos. Este apego por lo general ocurre en la presencia de fluidos corporales que fluyen, los cuales crean fuerzas de resistencia en las bacterias y sus adhesinas de anclaje.

e

x

Para poder realizar este estudio se tuvieron en cuenta los diferentes modelos matemáticos que se han venido desarrollando a través de los años referentes al comportamiento de adhesión de los filamentos (Pilis) que posee la bacteria en su membrana, los cuales poseen características mecánicas no lineales y son los causantes

de la adhesión a las paredes tanto del tracto urinario como del tracto intestinal del ser humano.

Según Björnham en su artículo “Catch-Bond Behavior of Bacteria Binding by Slip Bonds” [13] la respuesta de la fuerza de la hélice de tipo Pili, que ha sido analizado en detalle en el plano individual de un pili y para varios tipos de pili encontrados en *E. Coli* (predominantemente P pili [5–7, 14], el tipo 1 [3], y Pili S [9]), se ha encontrado que no es lineal y da lugar a un comportamiento complejo biomecánico [4, 15].

Las evaluaciones previas de las propiedades biomecánicas de un pili han hecho posible el modelamiento y la simulación de las propiedades de esfuerzo – deformación de la contra-pili con una aproximación muy buena con respecto a los resultados experimentales [3–7, 9, 14, 15].

El objetivo principal del proyecto de tesis fue desarrollar un modelo computacional que simule el comportamiento de adhesión de la bacteria *E. Coli* así como su recorrido en el tracto urinario teniendo en cuenta un flujo cortante.

En primera instancia se realizó una búsqueda exhaustiva sobre los modelos matemáticos que diferentes autores han planteado para asemejar el comportamiento de la bacteria *E. Coli* que habita en el tracto urinario. Con los diferentes tipos de modelos, teniendo en cuenta que los pilis de la bacteria poseen dos tipos de adhesinas, entre las cuales se pueden tener enlaces por captura o por deslizamiento, determinando parámetros como la velocidad del flujo cortante producido durante la micción, así como las fuerzas externas que actúan sobre la bacteria, se realizaron simulaciones con cada uno de ellos para compararlos y validarlos con los datos obtenidos por dichos autores.

definir, qué es un enlace por captura?

Por último se implementó un modelo computacional multi-escalar que enlaza el comportamiento de una cápsula inmersa en un flujo cortante, con el comportamiento adherente de los pilis que contiene la bacteria *E. Coli*, frente a las diferentes situaciones que se pueden presentar, para poder llevar a cabo un estudio variando los diferentes parámetros que se tienen en cuenta en las ecuaciones que modelan el sistema, y tener datos que nos ayuden a entender el comportamiento variable de la bacteria por diferentes causas.

1.1. Objetivos

General

bien

Desarrollar un modelo computacional para estudiar la adhesión de la bacteria *Escherichia Coli* a un sustrato en la presencia de un flujo cortante.

Específicos

- Estudiar el movimiento de una cápsula inmersa en un flujo cortante y que se encuentre cerca a una pared.
- Estudiar la biomecánica del pili, los parámetros principales referentes a la adhesión, esfuerzo y deformación
- Seleccionar y validar los modelos matemáticos computacionales implementados.
- Estudiar la sensibilidad y el efecto al cambiar algunos parámetros relevantes sobre el comportamiento de adhesión de la bacteria inmersa en un flujo cortante.

1.2. Cápsulas y membranas

anacrónico Erwin Schrödinger afirma que una célula viva debería funcionar como un mecanismo en términos de sus grados de libertad, siendo algunos, el estiramiento de area, compresión de espesor, deformación por tensión, inclinación y deformación de curvatura. [16]

e
x

Una cápsulas consiste de una sustancia deformable dentro de una membrana semi-permeable que se encarga, no solo de protegerla sino también de controlar su interacción con el medio en el que se encuentra. Las cápsulas presentan una gran variedad de formas y propiedades, cuyo comportamiento define el funcionamiento dentro de una aplicación específica; es por esto que es de gran importancia comprender las leyes que las gobiernan, midiendo y controlando sus propiedades mecánicas y dinámicas, su estado natural y sus respuesta a estímulos externos, teniendo en cuenta que las propiedades hidrodinámicas en su interior y exterior e inclusive su forma, afectan los resultados, haciendo de este, un campo de estudio nada trivial. [17]

Computacionalmente la Bacteria E. Coli se representa como una membrana muy rígida en forma esférica, cuyo movimiento al estar inmersa en un flujo cortante y por efecto de la adhesión de los Pilis que posee puede ser de dos tipos, el primero, *Rolling* en el cual la membrana de la bacteria va rotando sobre la superficie, y el segundo *Stop-Go* en donde la bacteria hace marchas y paradas por efecto de la adhesión de los pilis.

Para poder abordar el estudio de las cápsulas se ha definido un modelo teórico de estudio denominado el método de la Integral de Frontera [18], que para el caso específico de la bacteria E. Coli, esta se comporta como una membrana de estructura rígida esférica tridimensional e isotrópica capaz de soportar bajas deformaciones bajo la acción de cargas externas.

1.3. Organización

Debido a que durante la realización de este trabajo se emplearon diferentes modelos matemáticos en múltiples escalas que poseen conceptos y leyes físicas, para guiar al lector se presenta un resumen de los contenidos en cada capítulo.

En el capítulo 2 se presentan los métodos utilizados para la simulación incluyendo los modelos matemáticos correspondientes a las diferentes escalas en las que actúan los principales componentes de la bacteria *E. Coli*.

En el capítulo 3 se explican los resultados obtenidos en las diferentes simulaciones que se realizaron en el modelo computacional implementado y se hace una discusión sobre estos datos obtenidos.

En el capítulo 4 se explican las conclusiones obtenidas sobre la realización del modelo computacional y el comportamiento de adhesión de la bacteria *E. Coli* a un sustrato en presencia de un flujo cortante.

Capítulo 2

MÉTODOS Y MODELOS

En el presente capítulo, se introducirá al lector en aspectos básicos necesarios para poder comprender el contenido de la tesis, en algunos subcapítulos se explicara sobre los modelos matemáticos para describir el comportamiento de una cápsula inmersa en un flujo cortante, así como las interacciones que ocurren entre las fuerzas del fluido y los esfuerzos que genera la adhesión de las vellosidades de la bacteria (pili) en un sustrato.

Estos modelos son multi-escalares comenzando con la micro-escala, en donde se desarrolla el comportamiento de una cápsula inmersa en un flujo cortante, pasando a la nano-escala donde la interacción de las fuerzas que se generan en los pilis que se encuentran sobre la membrana de la cápsula interfieren en el desarrollo libre de esta y por ultimo se encuentra la escala molecular que es donde se realiza la interacción entre el extremo del pili y el sustrato al cual se adhiere.

2.1. INTERACCIONES DE UNA CÁPSULA INMERSA EN UN FLUIDO CORTANTE (MODELO EN LA MICRO-ESCALA)

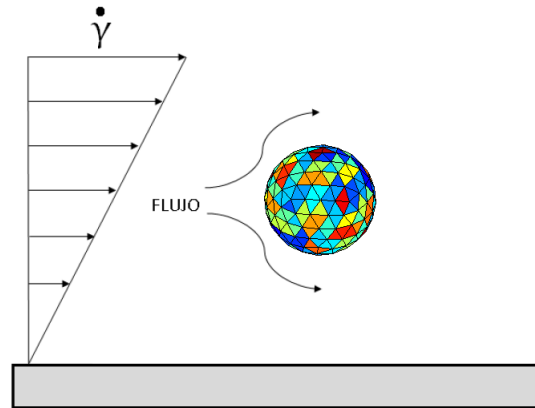


Figura 2.1: Cápsula esférica en presencia de un flujo cortante

Por definición, las interacciones adhesivas deben soportar una fuerza de tracción de una forma u otra. En los sistemas biológicos, la fuerza mecánica se deriva de esfuerzo cortante y/o contracción activa accionado por motores moleculares. Los

organismos vivos, unicelulares o pluricelulares, consisten en su mayor parte de fluidos a base de agua y su flujo a lo largo de una superficie crea una tensión cortante que arrastra todo lo que está en ella. La resistencia por remoción debido a esfuerzos cortantes se puede considerar una característica crítica de la adherencia biológica, ya que las interacciones más adhesivas entre las células bacterianas y/o eucarióticas o entre las células y las superficies no celulares se inician y luego se sostienen bajo condiciones con un poco de flujo.

El cizallamiento es creado, por ejemplo, por el flujo del corazón que bombea la secreción de sangre, saliva o lágrimas, los párpados intermitentes, peristaltismo intestinal, el vaciado de la vejiga urinaria, mucosa de los pulmones por el epitelio ciliado, o la goma de mascar.

Células vasculares endoteliales están expuestas a esfuerzos cortantes de fluidos que son típicamente $1 - 2 \frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2}$ en el lado venoso y $10 - 20 \frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2}$ (hasta $50 \frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2}$) en el lado de la circulación arterial (Davies 1995, Guo et al., 1995). El esfuerzo cortante generado en la superficie del diente por el flujo de la saliva es de aproximadamente $0,8 \frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2}$ (Prakobphol et al., 1999). Y el flujo de orina crea un esfuerzo cortante de $0,17 \frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2}$ en el túbulo renal proximal (Essig y Friedlander, 2003).

El análisis que se realizó en este trabajo se basa en la aproximación progresiva de movimiento en el que los términos de inercia en las ecuaciones de movimiento se desprecian por completo de forma insignificante debido a que los números de Reynolds tienden a ser pequeños muy cercanos a cero o inclusive cero. En este límite las ecuaciones de Stokes ec. 2.1 se puede utilizar para modelar el flujo del fluido de la orina.

$$\begin{aligned}\nabla P^* &= \frac{1}{R_e} * \nabla^2 v^* \\ \nabla \cdot v^* &= 0\end{aligned}\tag{2.1}$$

Las condiciones de borde son:

$$u \rightarrow 0 \quad \text{cuando} \quad \|x\| \rightarrow \infty\tag{2.2}$$

$$u = 0 \quad \text{for} \quad x \in P = \{x \in R^3 : x = (x, y, z) \text{ y } z = 0\}\tag{2.3}$$

Las ecuaciones de Stokes para el flujo, junto a las ecuaciones mecánicas de la cápsula y las condiciones de borde se pueden resolver utilizando el formalismo del método de la integral de frontera ec. 2.4. La aplicación actual de la técnica se diferencia de las aplicaciones anteriores principalmente en la elección de la “solución fundamental” para el sistema. La transformación de las ecuaciones 2.1 - 2.3 en forma integral se lleva a cabo utilizando la fórmula de Green para el sistema de Stokes

quedando:

$$u_j^* = 2 \cdot X_{0,3}^* \cdot C_a - 2 \cdot \int_s \Delta f_i^* \cdot G_{ij}^* \cdot dS^* + 2 \cdot K \int_s u_i^* \cdot T_{ijk}^* \cdot n_k \cdot dS^* \quad (2.4)$$

$$\forall i, j, k \in [1, 3]$$

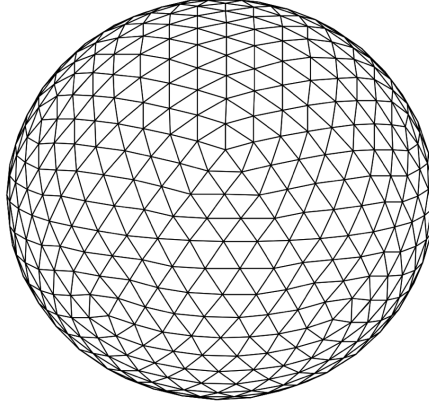


Figura 2.2: Malla para la cápsula

Donde el primer término de la derecha es la interacción de la velocidad del fluido en la velocidad de cada nodo de la malla figura 2.2, el segundo término de la ecuación conocido como la integral de capa sencilla, la cual es la interacción de todas las fuerzas sobre cada nodo de la cápsula y el tercer término se conoce como la integral de capa doble, la cual es la interacción de las velocidades normales de los diferentes nodos en la velocidad del nodo particular. Los parámetros K , C_a y el tiempo característico T_o se observan en la ecuaciones 2.5 a 2.8.

$$K = \frac{1 - \lambda}{1 + \lambda} \quad (2.5)$$

$$\lambda = \frac{\mu_{b1}}{\mu_e} \quad (2.6)$$

$$C_a = \frac{R_o \cdot \mu_e \cdot \dot{\gamma}}{\mu_b} \quad (2.7)$$

$$T_o = \frac{\mu_e * (1 + \lambda) * R_o}{\mu_b} \quad (2.8)$$

λ es la relación de viscosidades entre el fluido y el interior de la cápsula, μ_e y μ_{b1} son las viscosidad del fluido y del interior de la cápsula respectivamente con unidades Pa*s, la rigidez de la cápsula expresada en N/m es μ_b , R_o es el radio de la bacteria en metros y $\dot{\gamma}$ es el cortante del fluido en s^{-1} .

Las funciones de Green G y T ecuación 2.9 se dan de forma explícita por Ascoli [19], y pueden ser vistos como la solución fundamental a Stokes.

$$\begin{aligned}
 G_{ij} = & -\frac{1}{8\pi} \left[\frac{\delta_{ij}}{|r|} + \frac{r_i r_j}{|r|^3} - \frac{\delta_{ij}}{R} - \frac{R_i R_j}{R^3} + 2x_3 \Delta_j \frac{\partial}{\partial R_j} \left[\frac{x_3 R_i}{R_i} - \frac{\delta_{i3}}{R} - \frac{R_i R_3}{R^3} \right] \right] \\
 T_{ijk} = & \frac{3}{4\pi} \left[\frac{r_i r_j r_k}{|r|^5} - \frac{R_i R_j R_k}{R^5} \right] \quad (2.9) \\
 & \left[-2x_3 \Delta_j \left[-\frac{x^3}{R^5} \delta_{ik} R_j + \frac{X_3}{R^5} (R_i \delta_{jk} + \delta_{ij} R_k) + \frac{R_i \delta_{3j} R_k}{R^5} - \frac{5R_i R_j R_k X_3}{R^7} \right] \right]
 \end{aligned}$$

donde $r = (X_l - x_l, X_2 - x_2, X_3 - x_3)^T$, $R = (X_l - x_l, X_2 - x_2, X_3 + x_3)^T$, $r = [(X_l - x_l)^2 + (X_2 - x_2)^2 + (X_3 - x_3)^2]^{1/2}$, $R = [(X_l - x_l)^2 + (X_2 - x_2)^2 + (X_3 + x_3)^2]^{1/2}$ y $R_3 = X_3 + x_3$. La cantidad Δ_j tiene el valor +1 para $j = 1, 2$ y -1 para $j = 3$. Hay que tener en cuenta que la función de Green 2.9 se compone de la solución fundamental más términos adicionales debido a la presencia de la pared. Estos corresponden a los campos de velocidad, la presión y el tensor de esfuerzos en el punto en el fluido donde esta la presencia de una pared plana sobre la que ya se ha aplicado la condición de no deslizamiento.

La fuerza Δf_i que se encuentra en la ecuación 2.4 debe incluir todas las fuerzas externas que actúan sobre la membrana de la bacteria es decir que el delta de la fuerza es, $\Delta f_i = \Delta f_{mem} + \Delta f_{grav} + \Delta f_{pili}$, en donde los términos de la derecha son referencia de las contribución dadas por la elasticidad de la membrana de la bacteria, la fuerza de atracción gravitacional y las fuerzas de los pilis como interacciones químicas entre la adhesina FimH y el endotelio del tracto urinario.

Para determinar la fuerza en cada uno de sus nodos se utilizo el Método de Elementos Finitos (FEM por sus siglas en inglés) el cual es un método numérico aplicado a solidos para abordar de manera precisa problemas complejos de ingeniería subdividiendo la continuidad del cuerpo en pequeñas regiones interconectadas llamadas elementos finitos y aproximando la solución a la de problemas mas simples. [17]

En general, el proceso de solución por Elementos Finitos se basa en los siguientes pasos:

1. Discretización de la estructura, es decir, la división del dominio en los elementos teniendo en cuenta el numero, tamaño y tipo (triángulo, rectángulo, hexaedro, etc) de los mismos.

2. Selección del modelo de interpolación teniendo en cuenta los requerimientos de la física del problema en lo referente a desplazamientos, tensiones, etc. es decir, definir las funciones usadas para representar el comportamiento de la solución en cada elemento.
3. Derivación de los vectores de desplazamiento de acuerdo a las condiciones de equilibrio y de frontera, ya sea de manera directa (desde los parámetros físicos), variacional (aproximación) 0 ponderada (desde las ecuaciones diferenciales).
4. Ensamble de las ecuaciones de los elementos para obtener una estructura en condición de equilibrio (Fuerzas externas en los nodos = Fuerzas internas en los nodos) incluyendo transformación de coordenadas para tener un sistema general de ecuaciones y que todos los elementos sean compatibles.
5. Solución de los desplazamientos nodales teniendo en cuenta las condiciones de equilibrio y de frontera.
6. Computo de las tensiones y las fuerzas nodales a partir de los desplazamientos.

Para discretizar la estructura de la membrana se generó una malla a partir de una esfera de elementos lineales triangulares derivada de la división regular de un icosaedro como se muestra en la figura 2.3, donde se puede ver que la malla compuesta por los nodos n_i , n_j y n_k es subdividida para crear las nuevas posiciones de los nodos n_l , n_m y n_n

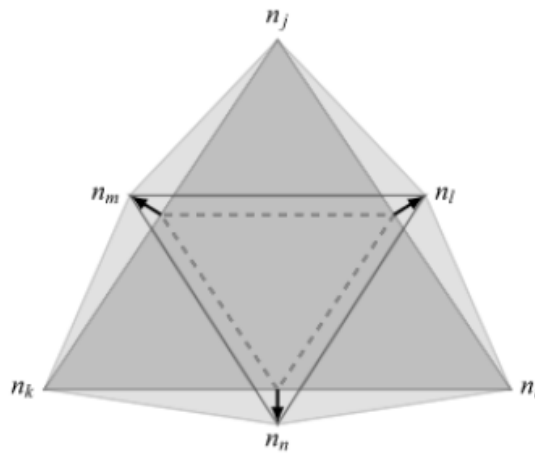


Figura 2.3: División del Icosaedro

2.2. BACTERIA ESCHERICHIA COLI

Como se detallo en el capitulo anterior, la bacteria E. Coli se modelara como una membrana rígida esférica tridimensional y que sobre su superficie tendrá ubicados pilis encargados de la adhesión con un sustrato, e inmersa en un flujo cortante.

Para poder comprender como se realiza esta adhesión hay que revisar las propiedades biomecánicas del Pili.

2.2.1. Propiedades físicas y mecánicas de un pili

El pili figura 2.4 es un polímero compuesto por subunidades proteínicas denominadas "Fim" de $5\mu m$ de longitud que se encuentran enrolladas helicoidalmente y las cuales se pueden desenrollar a medida que se va extendiendo, y de las cuales las de mayor importancia en el modelo son la FimA y la FimH, esta última encargada de la adhesión. Una característica propia de este polímero, es que a medida que se va extendiendo cambia su longitud de contorno.

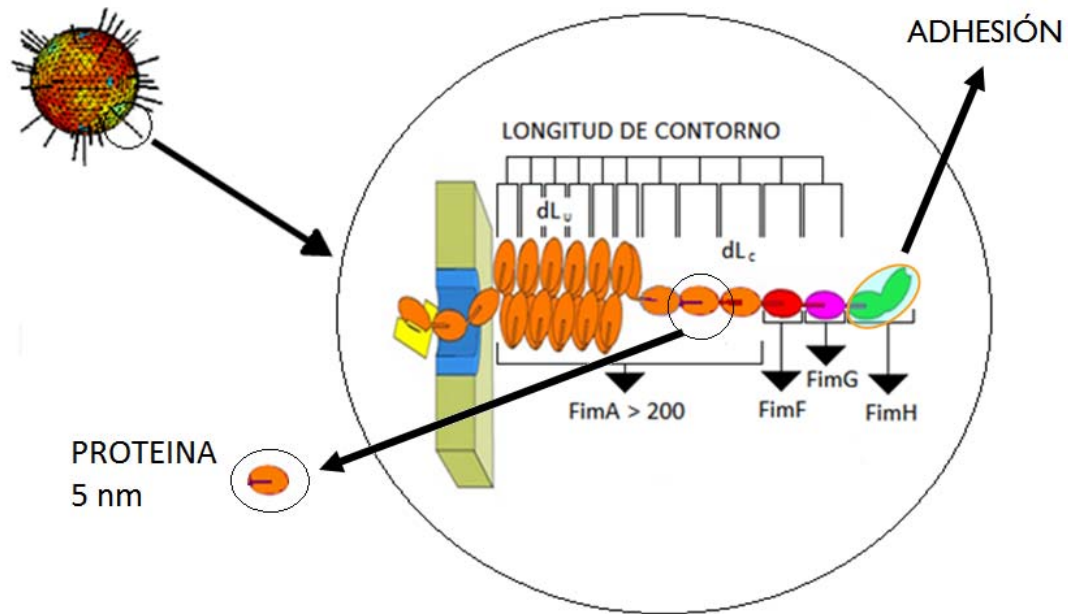


Figura 2.4: Estructura del Pili

Es posible construir un modelo simple de las propiedades físicas y mecánicas de un pili sobre la base de las características más distintivas de los resultados experimentales observados por diferentes investigadores.

2.2.1.1. Modelos de la Fuerza en un Pili - (modelo en la nano-escala)

El primer efecto de la extensión del pili es un estiramiento elástico, posiblemente procedente de un alargamiento de las interacciones entre las vueltas adyacentes de la hélice, un alargamiento o la reorientación de las propias subunidades. La región en la que se produce este alargamiento elástico se denomina región I.

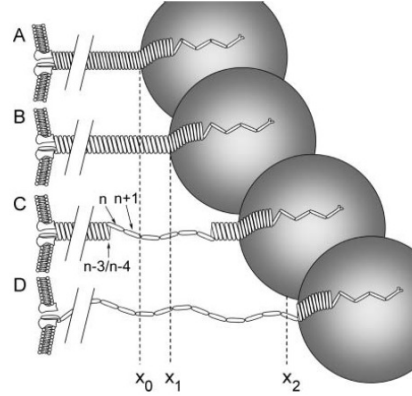


Figura 2.5: Regiones de Alargamiento del Pili de la bacteria E. Coli

Como la distancia de extensión se incrementa, las interacciones entre las vueltas adyacentes de la hélice de las subunidades FimA comienzan a romperse en una forma de serie, resultando en un despliegue total de la hélice como una estructura de filamento. Esta región de alargamiento se denota la región II. Cuando toda la subunidad FimA se ha desplegado, finalmente, el pili entra en una tercera región de alargamiento. Esta región de elongación se conoce como la región III [Figura 2.5].

Un modelo matemático simple del total de la respuesta de la fuerza contra elongación para una sola pili, $F_p(x)$, según ANDERSSON [4] se puede expresar como:

$$F_p(x) = \left\{ \begin{array}{lll} 0 & x \leq x_0 & \text{Antes del Alargamiento} \\ F_I(x) = K_a * (x - x_o) & x_o \leq x \leq x_1 & \text{Región I} \\ F_{II} = F_{uf} & x_1 \leq x \leq x_2 & \text{Región II} \\ F_{III}(x) & x_2 \leq x & \text{Región III} \end{array} \right\} \quad (2.10)$$

donde K_a es la constante de rigidez del pili, $x - x_0$ es la distancia de alargamiento del pili desde un estado de equilibrio x_0 .

Otro modelo matemático que simula mejor las características de la fuerza del pili y que esta compuesto por una única ecuación es el propuesto por MILLER [20], el cual asume que la elasticidad del pili debe ser analizada por el modelo de elasticidad

de polímeros worm-like chain (WLC).

$$F(x) = \frac{K_b * T}{L_p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right] \quad (2.11)$$

Donde F es la fuerza como una función de la elongación, L_p es la longitud de persistencia equivalente a $1,2 * 10^{-9}[m]$, x es la longitud de elongación, y L_c es la longitud del contorno de la proteína estirada, K_b es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta a la que se encuentra inmersa la bacteria la cual es de $298^\circ K$.

Otro modelo matemático que puede caracterizar la fuerza de un pili es el propuesto por Smith et al. (1995) FJC, aplicable a polímeros que se aproximan a una cadena de junta libre (Freely jointed chain).

$$x = L_c \left[\coth \left(\frac{2 * F * L_p}{K_b * T} \right) - \frac{K_b * T}{2 * F * L_p} \right] \left(1 + \frac{F}{K_o} \right) \quad (2.12)$$

Donde K_o es el modulo de elasticidad del pili con valor de $2,06 * 10^{-3}[\frac{N}{m}]$ y F es la fuerza para la longitud de elongación x .

Durante el desarrollo del modelo computacional se decidió tomar el modelo de elasticidad de polímeros (WLC por sus siglas en ingles), debido a que la Fuerza es función de la elongación y por lo tanto su modelo computacional es mas sencillo de implementar, a parte de que representa mejor la fuerza y que la solución se desarrolla como la suma de cantidades escalares, mientras que en los otros modelos hay que tener condicionales para el caso de la ec. 2.10, y una aproximación por Newton-Raphson para el modelo de junta libre (WLC por sus siglas en ingles) ec. 2.11, haciendo que esta ultima tenga un error considerable en la solución.

2.2.1.2. Dinámica del Enrollamiento y Desenrollamiento - (modelo en la nano-escala)

Siguiendo con la dinámica del pili, sus subunidades dependiendo de la fuerza a la que están sometidas y a la longitud actual del contorno pueden enrollarse y desenrollarse, motivo por el cual se plantean unas ecuaciones que modelan de forma estocástica la probabilidad de que estas subunidades entren en cualquiera de los dos estados antes mencionados.

Según Forero et. al en su articulo “Uncoiling Mechanics of Escherichia coli Type I Fimbriae Are Optimized for Catch Bonds ”donde asumen que cada subunidad puede tener dos estados posibles, un estado enrollado, en el que se unen las subunidades FimA en el siguiente giro de una hélice, o un estado desenrollado, en

que tienen contacto con las subunidades vecinas en el polímero lineal solo a través de las uniones. Ellos suponen que hay un solo estado de transición en el que es igualmente probable que una subunidad se enrolle o se desenrolle y la cual sucede estocásticamente a una tasa α o β . Estas tasas dependen de la altura de la barrera de energía entre la espiral y los estados de transición, así como la diferencia de la longitud entre estos dos estados ΔX_u y la fuerza F que esta ejerciendo el pili, tal como se describe por el modelo de Bell [22] para un enlace no covalente.

Las tasas de desenrollamiento α , y enrollamiento β son:

$$\alpha(F) = \alpha_0 * \exp\left(\frac{F * \Delta X_u}{K_b * T}\right) \quad (2.13)$$

$$\beta(F) = \beta_0 * \exp\left(-\frac{F * \Delta X_f}{K_b * T}\right) \quad (2.14)$$

Donde F es la fuerza aplicada, ΔX_u es el Delta de distancia de desenrollamiento igual a $0,5 * 10^{-9}[m]$, ΔX_f es el Delta de distancia de enrollamiento igual a $0,5 * 10^{-9}[m]$ y K_b, T son la constante de Boltzmann y la Temperatura del medio en el que se encuentra inmerso el pili. Miller [20] propone que la probabilidad de que una subunidad se desenrolle es:

$$P_u = N_f * \alpha * \Delta t \quad (2.15)$$

Donde N_f son el numero de vueltas enrolladas, y Δt es el paso de tiempo, mientras que la probabilidad de que una subunidad se enrolle es:

$$P_c = N_u * \beta * \Delta t \quad (2.16)$$

Donde N_u son el numero de vueltas desenrolladas.

Este modelo se caracteriza por que las subunidades se enrollan y se desenrollan de manera no secuencial, es decir en cualquier parte sobre el pili.

Según Forero [21] la probabilidad de que una subunidad se desenrolle y se enrolle esta dada por:

$$P_u = \alpha * \Delta t \quad (2.17)$$

$$P_c = \beta * \Delta t \quad (2.18)$$

Forero et. al. definen que el enrollamiento sucede únicamente en la subunidad desenrollada mas cercana a la membrana bacteriana y es de forma secuencial mientras que el desenrollamiento se hace en la subunidad enrollada mas distante a la membrana bacteriana y también es de forma secuencial.

2.2.1.3. Dinámica de los Enlaces -(modelo en la escala molecular)

Los enlaces Figura 2.6 que se forman entre la adhesina FimH y el sustrato pueden ser de dos Tipos, enlaces deslizantes (Slip Bonds) y los enlaces de captura (Catch Bonds), estos se diferencian por el tiempo de vida del enlace y por la forma como se genera el enlace. El presente trabajo se centro en el estudio de los enlaces de tipo deslizantes por lo que no se abordaran los modelos correspondientes a los enlaces de tipo captura.

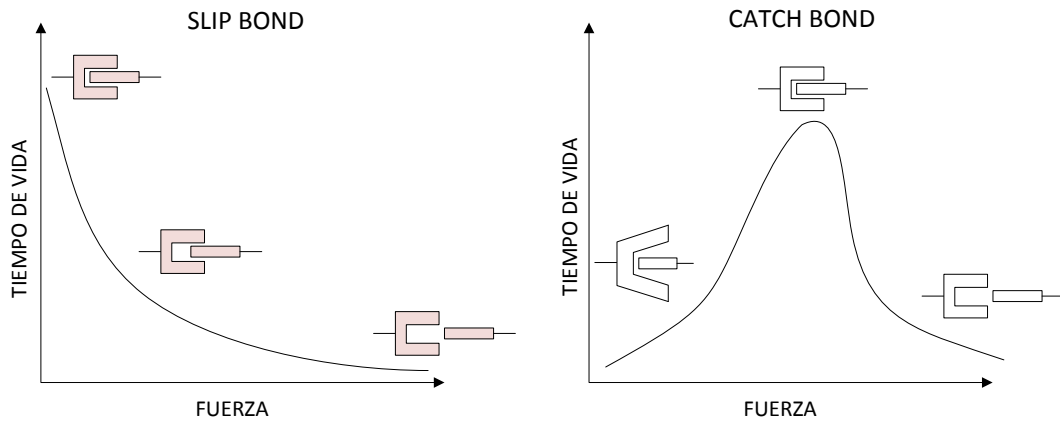


Figura 2.6: Tipos de Enlaces que se pueden presentar entre el pili y el sustrato

Enlace Deslizante (Slip Bond)

De acuerdo con el modelo de resorte de Hooke, las constantes de velocidad de avance y retroceso de las interacciones ligando-receptor bajo una fuerza externa, es decir las tasas en las que un ligando se enganche a un receptor formando un enlace, o donde este enlace se rompa están dadas por Dembo (1994),

$$k_f = k_f^0 \exp \left[-\frac{\sigma_{ts} (x_m - \lambda)^2}{2 * K_b * T} \right] \quad (2.19)$$

$$k_{off} = k_{off}^0 \exp \left[\frac{(\sigma - \sigma_{ts}) (x_m - \lambda)^2}{2 * K_b * T} \right] \quad (2.20)$$

Donde k_f^0 y k_{off}^0 son las constantes de velocidad de avance y retroceso en una distancia en equilibrio λ equivalentes a $1[s^{-1}]$; k_f y k_{off} son las constantes de velocidad de avance y retroceso a una distancia de equilibrio $(x_m - \lambda)$; σ y σ_{ts} representan

las constantes de resorte en el estado ligado y de transición, respectivamente. La fuerza que actúa sobre el vínculo está dado por:

$$F_b = \sigma(x_m - \lambda) \quad (2.21)$$

Otro modelo matemático que caracteriza el rompimiento de un enlace bajo la acción de una fuerza aplicada es el descrito por Bell [22]

$$k_{off} = k_{off}^0 * \exp\left(\frac{F * d}{K_b * T}\right) \quad (2.22)$$

donde k_{off}^0 es la tasa de ruptura espontánea equivalente a $0,95[s^{-1}]$, d es la distancia de ruptura estimada, $0,04[nm]$ [20] y F es la fuerza que actúa sobre el pili según las ecuaciones 2.11 o 2.12.

Y un modelo matemático que caracteriza el enganche de un enlace a una distancia entre el ligando y el receptor es el descrito por Whitfield et al. [11].

$$K_{0i} = k_{0i}^0 * \exp\left(\frac{d}{x_{rms} * \sqrt{2}}\right) \quad (2.23)$$

donde K_{0i}^0 es la tasa de enganche, d es la distancia entre el receptor y el ligando y $x_{rms} = \sqrt{\frac{K_b * T}{K_a}}$. Por ultimo se propone que la tasa de rompimiento de un enlace bajo la acción de una fuerza es:

$$k_{off} = k_{off}^0 * \exp\left(\frac{F * x}{K_b * T}\right) \quad (2.24)$$

Los parámetros para esta ecuación son los mismos que se utilizaron en 2.22.

PROBABILIDAD DE ENLACE Y RUPTURA

En la naturaleza estocástica de las interacciones ligando-receptor para realizar la simulación se debe tener en cuenta algoritmos computacionales basados en métodos de Monte Carlo.

La formación y ruptura de enlaces entre una célula y una superficie en cualquier posición de la membrana es tomada como la tasa de un proceso químico estocástico reversible de tipo simple como se muestra en la ecuación 2.25.



Según Dembo et. al. 1988 citado por Jadhav et. al. [23], K_f y K_r son las tasas de reacción del avance y el retroceso y las cuales corresponden a las ecuaciones de K_f

ec. 2.19 y K_{off} ec. 2.20 respectivamente, donde estas son funciones de la separación vertical entre la membrana y la superficie. A su vez en un intervalo de tiempo Δt , la probabilidad (P_b) que un receptor se une según (Hammer y Apte, 1992) es:

$$P_b = 1 - \exp(-k_{on}\Delta t) \quad (2.26)$$

Donde $k_{on} = k_f * A_L * (n_L - n_B)$. A_L es la superficie sobre el plano recubierto del ligando accesible para cada receptor, mientras que $(n_L - n_B)$ es la densidad del ligando no unido. Del mismo modo la probabilidad de ruptura de un enlace es:

$$P_r = 1 - \exp(-k_{off}\Delta t) \quad (2.27)$$

Donde k_{off} es la tasa de apertura del enlace y puede ser definida según las ecuaciones 2.20 o 2.22.

Capítulo 3

RESULTADOS Y SIMULACIONES

Durante el presente capítulo se mostraran los resultados de diferentes simulaciones realizadas a los diferentes modelos matemáticos Figura 3.1, que describen el comportamiento de una bacteria en presencia de un flujo cortante; se debe tener en cuenta que los diferentes modelos se encuentran a escalas diferentes, es decir los modelos que rigen el comportamiento de una membrana rígida en medio de un flujo cortante esta en la micro-escala, mientras que los modelos que simulan el comportamiento de las fimbrias (pilis) que se adhieren a un sustrato están en la nano-escala y la escala molecular. Estos modelos matemáticos son los descritos en el Capítulo 2.

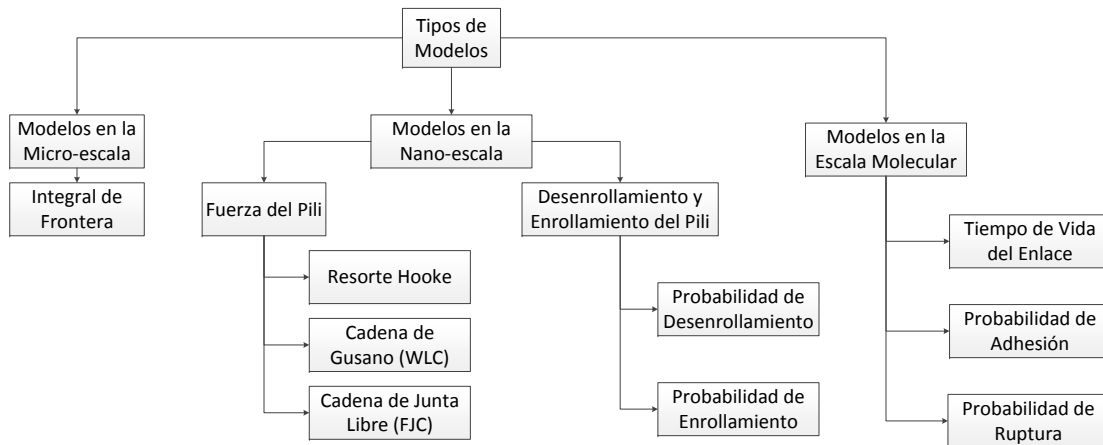


Figura 3.1: Proceso de Selección de Modelos

Para implementar los algoritmos que simulan el comportamiento completo de la bacteria, es necesario comenzar con los modelos en la micro-escala, de tal forma que se puedan determinar algunas características como la cantidad de elementos que tendrá la malla, la velocidad de la membrana en cada elemento, y el paso de tiempo.

Paso seguido es la implementación de algoritmos de los diferentes procesos en la nano-escala y escala molecular Figura 3.2, donde se simulan y se validan los modelos de la Fuerza del pili, el enrollamiento y desenrollamiento de las hélices, y la adhesión y ruptura del enlace según las ecuaciones descritas en el capítulo 2

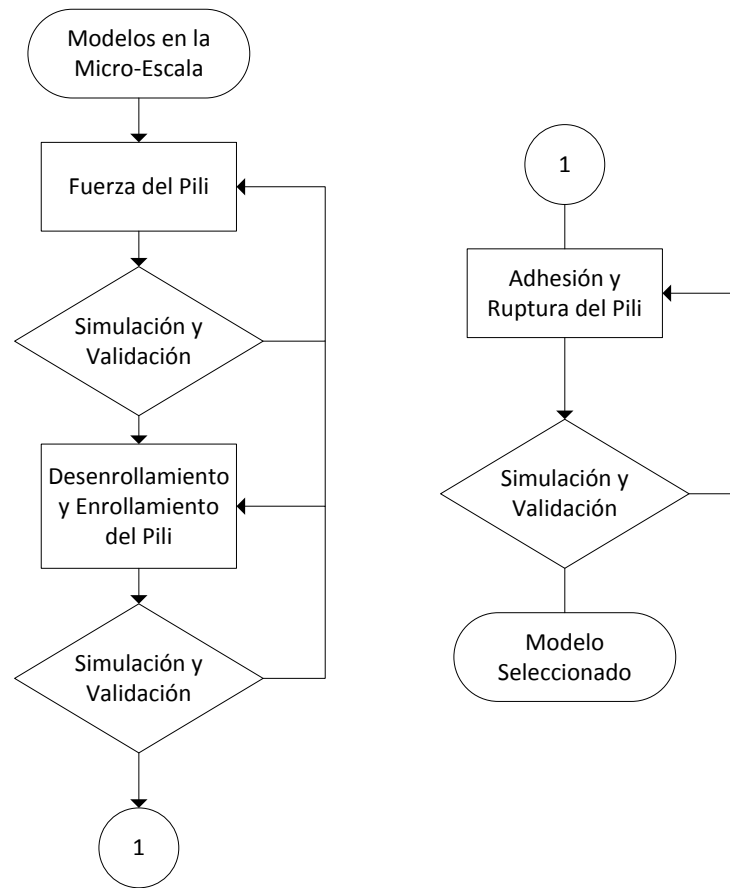


Figura 3.2: Selección de modelos en la Nano-escala y Escala Molecular

3.1. SIMULACIÓN DE UNA CÁPSULA ESFÉRICA EN UN FLUJO CORTANTE SEMI-INFINITO

Como se abordó en el capítulo 2, para observar el comportamiento de una cápsula inmersa en un flujo cortante se utilizara el formalismo de la Integral de frontera, en el cual se realiza un mallado sobre la superficie de la cápsula y no sobre el dominio del fluido, se considera que la superficie de la cápsula se va a mover a la velocidad del flujo y lejos de la cápsula la velocidad del fluido no esta perturbada por esta.

Para verificar la estabilidad del algoritmo se realizó un estudio de convergencia evaluando la velocidad del centro de gravedad de la bacteria en presencia de un flujo cortante figura 2.1. Para hacer la malla sin refinamiento, orden cero, se toman un icosaedro el cual es un poliedro de veinte lados, y se proyectan sobre una esfera, dando un total de 20 elementos y 12 nodos; cada vez que aumente su orden es por

que se han dividido en cuatro cada uno de los elementos tal y como se muestra en la tabla 3.1.

Cuadro 3.1: Cantidad de elementos y numero de nodos por orden de malla

GEOMETRÍA	ORDEN	ELEMENTOS	NODOS
SPH REF 0	0	20	12
SPH REF 1	1	80	42
SPH REF 2	2	320	162
SPH REF 3	3	1280	642
SPH REF 4	4	5120	2562

Según la gráfica 3.3, para refinamientos de malla inferiores al tercer orden, la velocidad de la cápsula no converge, y para refinamientos superiores los resultados no varían significativamente mientras que su costo computacional aumenta de manera exponencial; los tiempos de simulación para las diferentes mallas fueron de 6 h 10 m 45 s para la malla SPH REF 2, 1 d 5 h 6 m 40 s para la malla SPH REF 3 y de 9 d 6 h para la malla SPH REF 4, es por esto que se toma la geometría SPH REF 3 con un total de 1280 elementos y 642 nodos sobre su superficie como la malla de la bacteria.

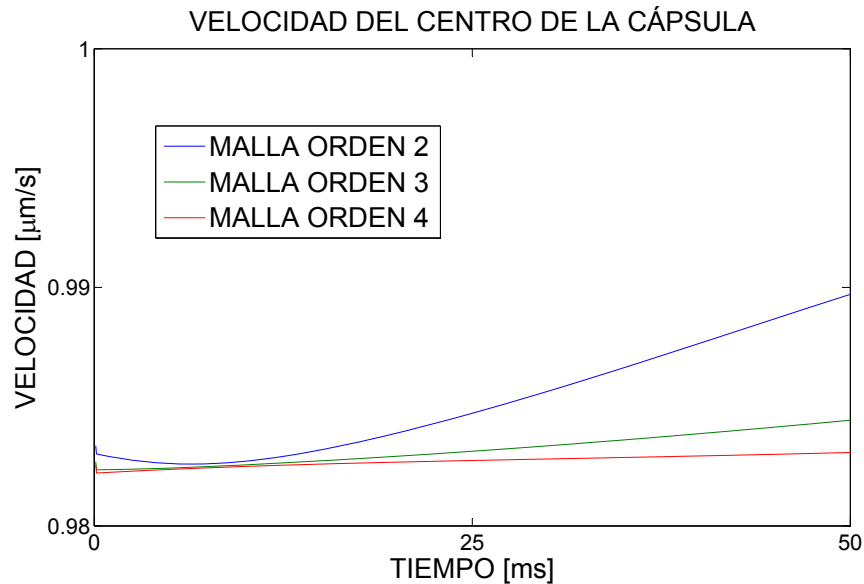


Figura 3.3: Velocidad del Centroides de la Membrana para cada malla

Ahora para validar el modelo se realiza una simulación donde se gráfica la velocidad del centro de gravedad de la membrana en el tiempo figura 3.4, y luego una comparación con el método utilizado por Jadhav et al. [23], el cual valida su modelo

con la teoría de Goldman, Cox y Brenner, en (Goldman et al. 1967), calculando la velocidad hidrodinámica para una esfera rígida de radio $3,75\mu m$ con rigidez de $3 \cdot 10^{-3} N/m$, con su centro de gravedad ubicado a una altura de $3,875\mu m$ de una superficie plana y a diferentes cortantes del fluido.

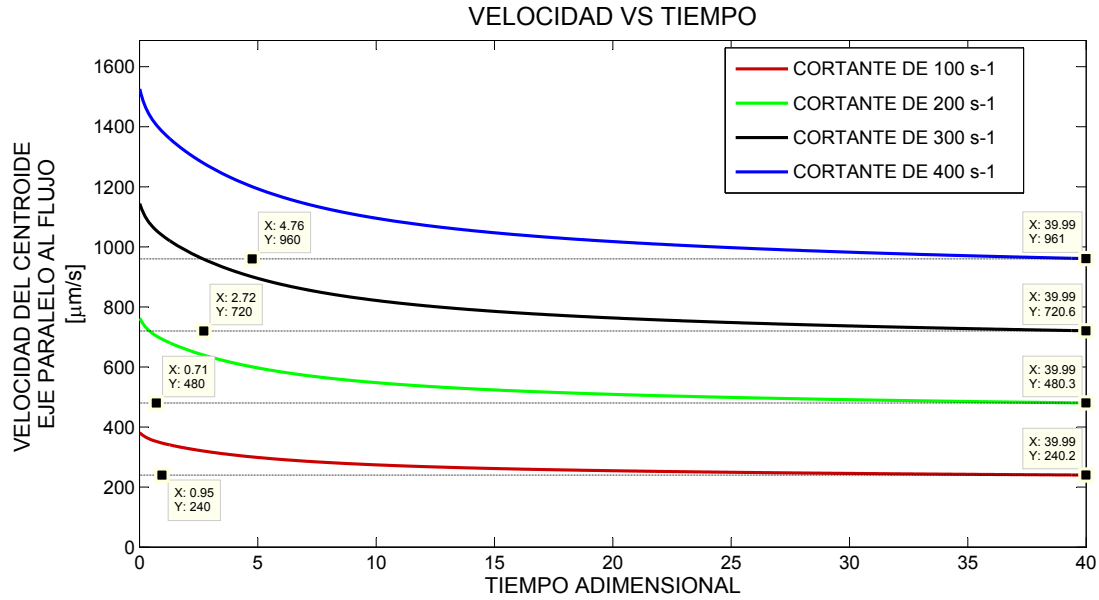


Figura 3.4: Velocidad del Centro de Gravedad de una membrana en el eje del fluido

Comparando los datos obtenidos por Jadhav et. al 2005, el error con el modelo de ellos es menor al 0,5 %, dando una excelente aproximación; cabe resaltar que el tiempo real de estabilización para cada una de las simulaciones es:

$$T = \frac{T^* \cdot \mu_b}{\mu_e \cdot (\lambda + 1) \cdot R_o} \quad (3.1)$$

El siguiente paso fue proceder a realizar las simulaciones a los modelos en la nano-escala y la escala molecular, los cuales representan el comportamiento del pili de la bacteria.

3.2. SIMULACIÓN DE LA EXTENSIBILIDAD DEL PILI

A través de la literatura se han encontrado diferentes modelos que caracterizan la extensibilidad de un pili, donde se da la fuerza como función de la extensión, como en el modelo propuesto por Miller [20] basado en la ecuación 2.11 y los modelos de enrollamiento y desenrollamiento basados en las ecuaciones 2.13-2.14 y 2.15-2.16, o como la extensión en función de la fuerza, como se observa en el modelo propuesto

por SMITH et al. (1995) basado en la ecuación 2.12 y las ecuaciones 2.13-2.14 y 2.17-2.18. Estos dos modelos poseen un parámetro dinámico L_c Longitud del contorno, el cual varía dependiendo de la probabilidad de que una de las subunidades pueda enrollarse o desenrollarse. Se siguió el diagrama de flujo que muestra la Figura 3.5 para realizar la simulación de los dos modelos propuestos.

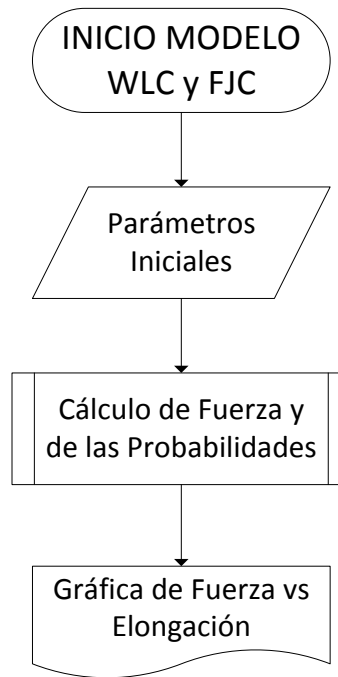


Figura 3.5: Diagrama de Flujo para la simulación de los modelos WLC y FJC

La simulación se realiza partiendo de que uno de los extremos del pili se encuentra con una restricción de movilidad, mientras que al otro extremo se le aplica una fuerza variable a velocidad constante como se observa en la figura 3.6.

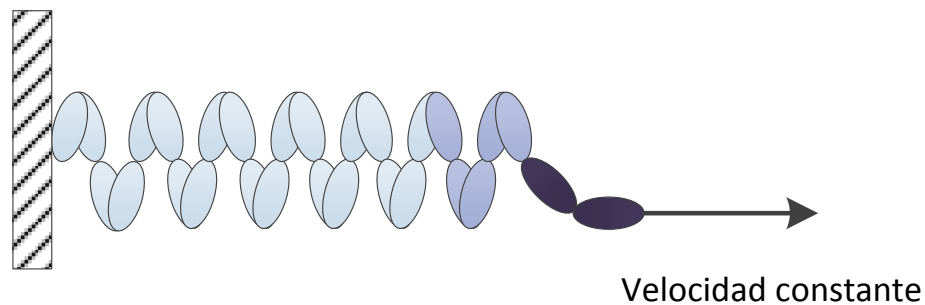


Figura 3.6: Diagrama de elongación de un pili tipo 1

Cuadro 3.2: Parámetros de Simulación

PARÁMETRO	UNIDADES	MODELO	
		MILLER	SMITH
subunidades (SUB)		245	245
velocidad	[m/s]	10^{-6}	10^{-6}
K_b	[J/°K]	$1,38 * 10^{-23}$	$1,38 * 10^{-23}$
T	[°K]	298	298
N_u		5	5
N_f		$SUB - N_u$	$SUB - N_u$
L_p	[m]	$1,2 * 10^{-9}$	$1,2 * 10^{-9}$
L_c	[nm]	$\frac{N_f}{3} * 0,3 + N_u * 5$	$\frac{N_f}{3} * 0,3 + N_u * 5$
ΔL_c	[m]	$5 * 10^{-9}$	$5 * 10^{-9}$
Δt	[s]	10^{-3}	10^{-3}
ΔX_u	[m]	$0,5 * 10^{-9}$	$0,5 * 10^{-9}$
ΔX_f	[m]	$0,5 * 10^{-9}$	$0,5 * 10^{-9}$
α_0	[Hz]	$5 * 10^{-2}$	$5 * 10^{-2}$
β_0	[Hz]	700	700

Los resultados de la simulación se pueden observar en la Figura 3.7 donde se traza la fuerza contra la elongación de la fimbria (pili), para el modelo FJC ec. 2.12 se toman las probabilidades de enrollamiento y desenrollamiento propuestas por Forero et. al [21], ecuaciones 2.17 y 2.18, mientras que en el modelo WLC ec. 2.11, el enrollamiento y desenrollamiento de las subunidades del pili se basa en las ecuaciones propuestas por ambos autores, ecuaciones 2.15 a 2.18.

La respuesta de los modelos es muy parecida aunque el modelo FJC y WLC con el modelo de probabilidad independiente de la cantidad de subunidades enrolladas y desenrolladas (colores verde y negro) presentan menos oscilaciones en la zona de elongación a fuerza constante, mientras que en el modelo WLC con modelo de probabilidad dependiente de la cantidad de subunidades enrolladas y desenrolladas (color magenta), se observa una pequeña inclinación, esta es debida a que las subunidades se enrollan y desenrollan en cualquier subunidad FimA que se encuentra en la estructura.

Aunque los dos modelos (respuesta de colores verde y negro) son estables y consecuentes con la realidad según lo análisis desarrollados por otros autores [3], [4], [5], [6], [7], [8], [20], [21] entre otros, como ya se había explicado en el capítulo anterior se decide utilizar el modelo WLC para el proceso de estudio, porque tiene menos oscilaciones, menos picos grandes en la zona de fuerza constante y la ecuación es mucho mas sencilla de implementar por lo que requiere menos gasto computacional.

Como se analizo en el modelo en la micro-escala interacción entre una cápsula

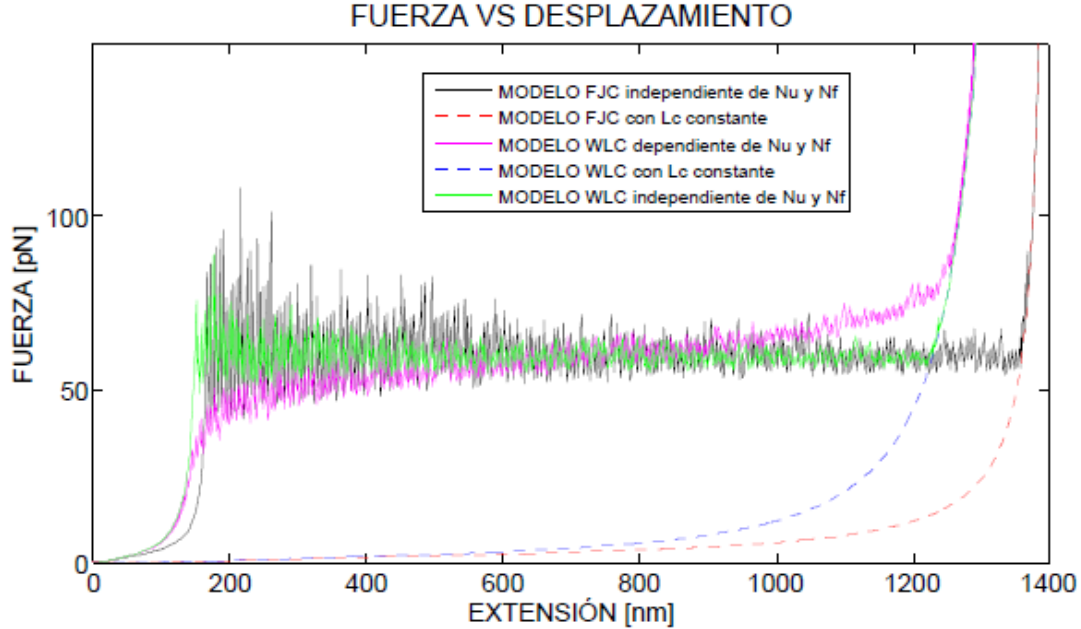


Figura 3.7: Fuerza vs Elongación para los modelos WLC y FJC

y un fluido cortante los modelos computacionales tienen algunas restricciones, entre las mas importantes se encuentra el paso de tiempo utilizado, es por esto se hizo un estudio de convergencia del tiempo para determinar si las simulaciones multi-escalares eran compatibles, o si alguna de ellas restringiría a la otra. Debido a que la bacteria se va a desplazar por el fluido a una velocidad considerable, se tomo la velocidad del centro de gravedad de la membrana dada por el análisis de convergencia de tiempo de la sección 3.1 para evaluar la convergencia de tiempo en la nano-escala.

Para un cortante $\dot{\gamma} = 2400[s^{-1}]$ con el cual se hicieron las simulaciones de la sección 3.1, se observo que la velocidad del centro de gravedad es de $u = 2,5 \cdot 10^{-3}[\frac{m}{s}]$ para una posición de $z = 1,075 \cdot 10^{-6}[m]$ sobre la superficie de la pared y que el paso de tiempo de la simulación es de $41,7 \cdot 10^{-9} [s]$. Con estos datos se procede a realizar simulaciones para diferentes Δt , y comprobar cual es el mínimo paso de tiempo requerido para que la extensión del pili se comporte adecuadamente.

En la figura 3.8 se observan las diferentes trazas de la fuerza vs el desplazamiento para pasos de tiempo comprendidos entre 10^{-4} y $10^{-8} [s]$.

Se puede destacar de la figura 3.8, que con la velocidad a la cual se esta estirando el pili, es necesario tener un paso de tiempo inferior a $10^{-7} [s]$ y que para pasos de tiempo mas pequeños la gráfica no varia significativamente (colores amarillo y negro), y como en el modelo en la micro-escala el paso de tiempo es de $41,7 \cdot 10^{-9} [s]$, se puede decir que el modelo se comportara de manera adecuada.

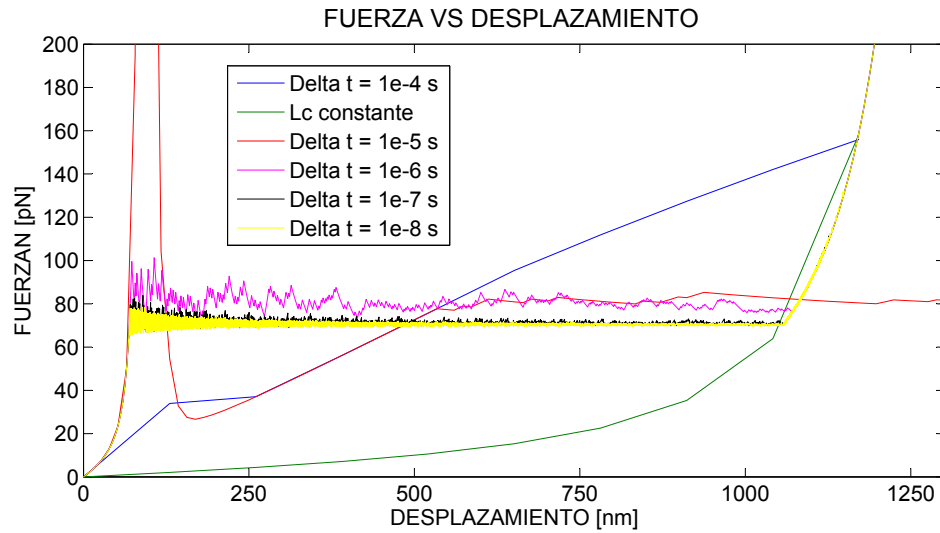


Figura 3.8: Fuerza vs Desplazamiento a diferentes pasos de Tiempo

Ahora se realiza una simulación del comportamiento mientras se extiende y se relaja el pili a velocidad constante según el diagrama de la figura 3.9, y el resultado se puede observar en la gráfica 3.10 de la fuerza en función del desplazamiento.

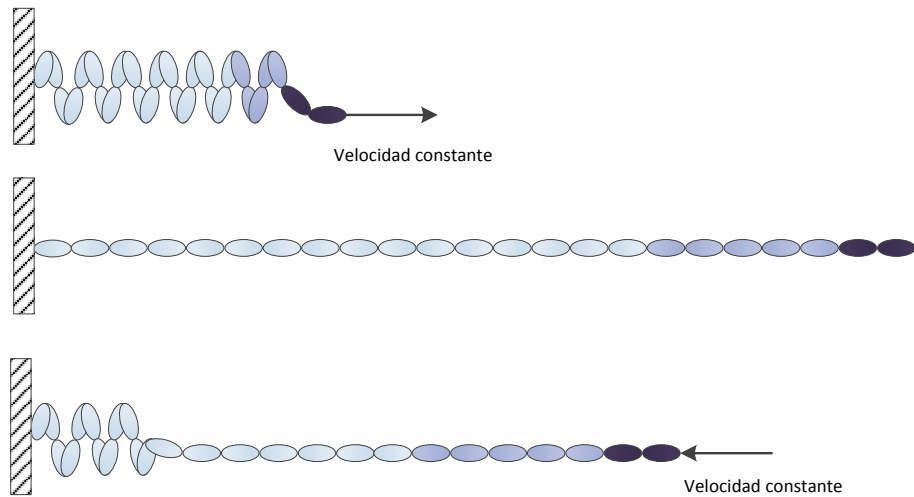


Figura 3.9: Diagrama de extensión y relajación del Pili a velocidad constante

La fuerza media constante zona donde se está desenrollando el pili, varía si el pili se está extendiendo o relajando, esto debido a los parámetros que se utilizan en las ecuaciones de probabilidad de enrollamiento y desenrollamiento y debido a que el modelo es estocástico posee una histéresis; el valor medio de la fuerza en esta zona es de 60 pN, corroborado con lo publicado por Forero et. al. [21].

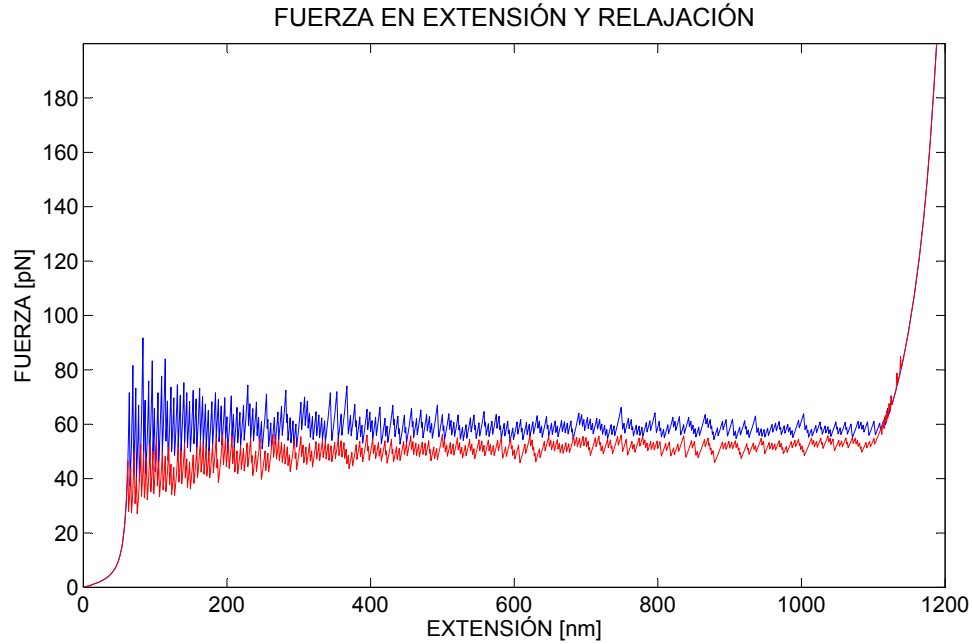


Figura 3.10: Fuerza vs Desplazamiento, Extensión y Relajación del pili

3.3. SIMULACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA DEL ENLACE DE UN PILI

Para observar el tiempo de vida del enlace de un pili se realizaron ciento noventa y nueve (199) simulaciones para un enlace de tipo Slip Bond, según la ecuación 2.22-2.27 y tomando la fuerza como un modelo de cadena de gusano (WLC) ecuación 2.11; con estos datos se genera el histograma del tiempo de vida y fuerza, Figura 3.11, para tres valores de Δt , los cuales son 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} segundos, con los siguientes parámetros:

El resto de parámetros se toma de la tabla 3.2 y estos resultados se comparan con los datos obtenidos en [20] en la figura 7.C.

El tiempo de vida que dura un enlace esta dado por una distribución normal, y siempre va a existir un número de eventos en el extremo final debido a que es un algoritmo estocástico. Por otro lado la mayor cantidad de simulaciones tiene cabida en fuerzas que se encuentran en la zona de desenrollamiento del pili que esta dada entre 60 - 70 pN. Se destaca de la gráfica que el delta de tiempo Δt no es influyente en la variación de los resultados.

Cuadro 3.3: Parámetros de Simulación para el tiempo de Vida de un Enlace

PARÁMETRO	UNIDADES	VALORES
subunidades (SUB)		1000
velocidad	[m/s]	$2 * 10^{-6}$
N_u		5
N_f		$SUB - N_u$
L_{cf}	[nm]	$SUB * 5,3$
L_c	[nm]	$N_f * 0,3 + N_u * 5$
ΔL_c	[m]	$5 * 10^{-9}$
k_r^0	[Hz]	2
d_0	[m]	$0,04 * 10^{-9}$

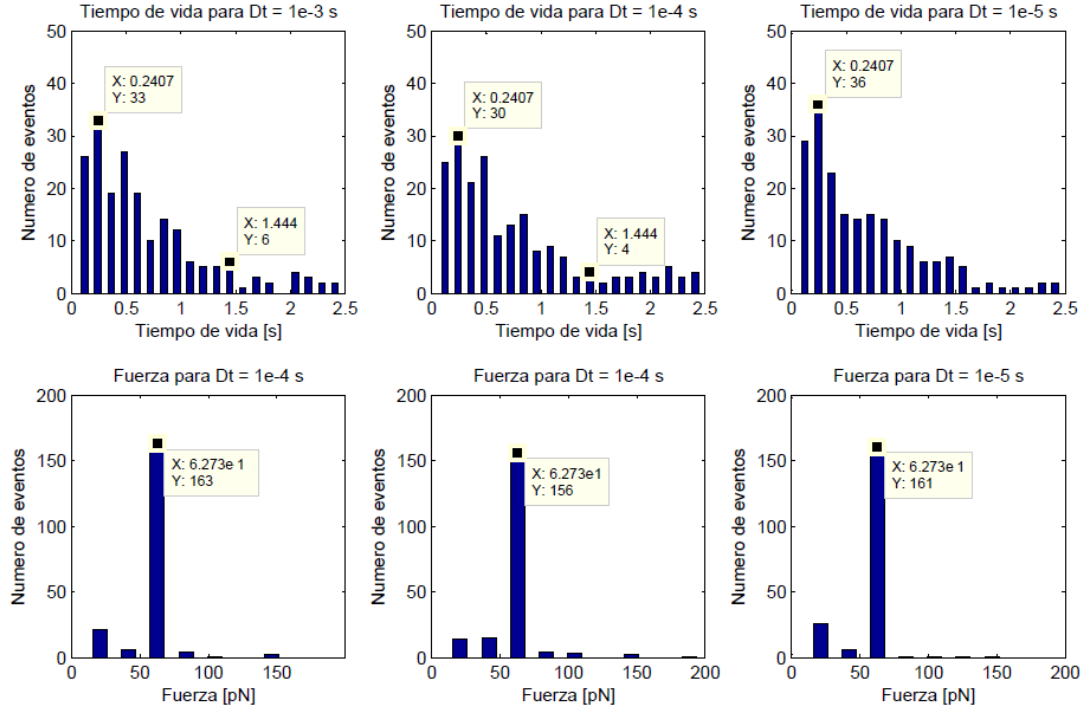


Figura 3.11: Histograma del Tiempo de Vida de un Enlace

3.4. SELECCIÓN DE MODELOS

Tomando como referencia los modelos utilizados por los diferentes autores y los cuales se presentaron en este capitulo, se ha decidido trabajar con los siguientes modelos matemáticos para cada uno de los elementos presentes en el modelo general; se variaran algunos subíndices para comodidad de la implementación en el algoritmo.

■ Modelo en la micro-escala

Para trabajar el modelo de una membrana inmersa en un flujo cortante se trabajara con el modelo de la integral de frontera ecuación 2.4.

■ Modelo en la nano-escala

- Fuerza del pili

Para modelar la fuerza del pili se trabajara con el modelo Worm Like-Chain (WLC) ecuación 2.11.

- Tasas de enrollamiento, desenrollamiento

Este modelo se implementara con las ecuaciones 2.13, 2.14, para las tasas de enrollamiento y desenrollamiento respectivamente.

- Probabilidades de enrollamiento y desenrollamiento

Para las probabilidades se utilizan las ecuaciones 2.17, 2.18.

■ Modelo en la escala molecular

- Probabilidad de enganche del pili

Para calcular la probabilidad con la que se engancha un pili a un receptor se toma la ecuación de la tasa de enganche ec. 2.23, como:

$$K_b = k_b^0 * \text{erfc} \left(\frac{d}{x_{rms} * \sqrt{2}} \right) \quad (3.2)$$

- Probabilidad de ruptura de un enlace

Para calcular la probabilidad de ruptura de un enlace se utilizan las ecuaciones 2.24, como:

$$K_r = k_r^0 * \text{erf} \left(\frac{F * d_0}{K_b * T} \right) \quad (3.3)$$

Con los modelos presentados anteriormente se puede realizar el estudio del comportamiento de adhesión de la Bacteria Escherichia Coli en un sustrato en presencia de un flujo cortante.

3.5. SIMULACIÓN DE LA BACTERIA EN UN FLUJO CORTANTE SEMI-INFINITO CON UN SOLO PILI

Con los modelos matemáticos seleccionados, se procede a realizar la simulación de la bacteria, inmersa en un flujo cortante semi-infinito con bajo numero de

Reynolds, con una fimbria (pili) ubicada en la parte mas proximal a la pared, y con un enlace activo entre el pili y el sustrato tal y como se observa en la figura 3.12.

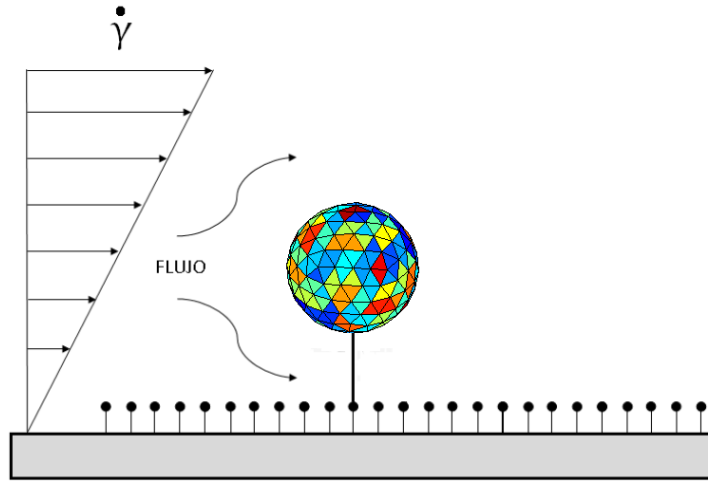


Figura 3.12: Estado inicial de la simulación

En primera instancia se simula la bacteria como una membrana rígida de geometría esférica con una malla definida sección 3.1, con un pili en el nodo mas cercano a un sustrato sobre una pared y enlazado a este.

El modelo matemático seleccionado para simular la micro-escala es el de la integral de frontera 2.5, y los modelos matemáticos para simular la nano-escala y la escala molecular, de acuerdo a lo planteado en las secciones 3.2 y 3.3, son el modelo de elasticidad de polímeros worm-like chain (WLC) ecuación 2.11 para determinar la fuerza, los modelos de probabilidad de enrollamiento y desenrollamiento según las ecuaciones 2.17 - 2.18 planteadas por Forero et. al. [21], y el modelo de enganche propuesto por [11] y de ruptura del pili según lo propuesto en este trabajo 2.23 - 3.3.

Para esta simulación los parámetros implementados en el algoritmo computacional fueron comenzando con la micro-escala, el cortante del fluido $\dot{\gamma} = 750s^{-1}$, el radio de la bacteria es de $0,5\mu m$, la altura inicial del centro de gravedad de la bacteria es igual a la suma de la longitud del pili mas el radio de la membrana; para los modelos en la nano-escala, la longitud del pili es de $0,5\mu m$, el resto de parámetros están incluidos en la tabla 3.4. Se toman como parámetros de estudio la velocidad del centro de gravedad de la cápsula figura 3.13, y la fuerza ejercida por el pili figura 3.14, durante el enganche.

Como se puede observar en la figura 3.13, la membrana comienza con la velocidad igual a la del fluido, tarda un tiempo en converger y llegar al valor obtenido

Cuadro 3.4: Parámetros de Simulación para un Pili

PARÁMETRO	UNIDADES	VALORES
K_b	$[J/^{\circ}K]$	$1,38 * 10^{-23}$
T	$[^{\circ}K]$	298
N_u		5
N_f		$SUB - N_u$
L_p	[m]	$1,2 * 10^{-9}$
L_c	[nm]	$\frac{N_f}{3} * 0,3 + N_u * 5$
ΔL_c	[m]	$5 * 10^{-9}$
Δt	[s]	10^{-3}
ΔX_u	[m]	$0,5 * 10^{-9}$
ΔX_f	[m]	$0,5 * 10^{-9}$
α_0	[Hz]	$5 * 10^{-2}$
β_0	[Hz]	700

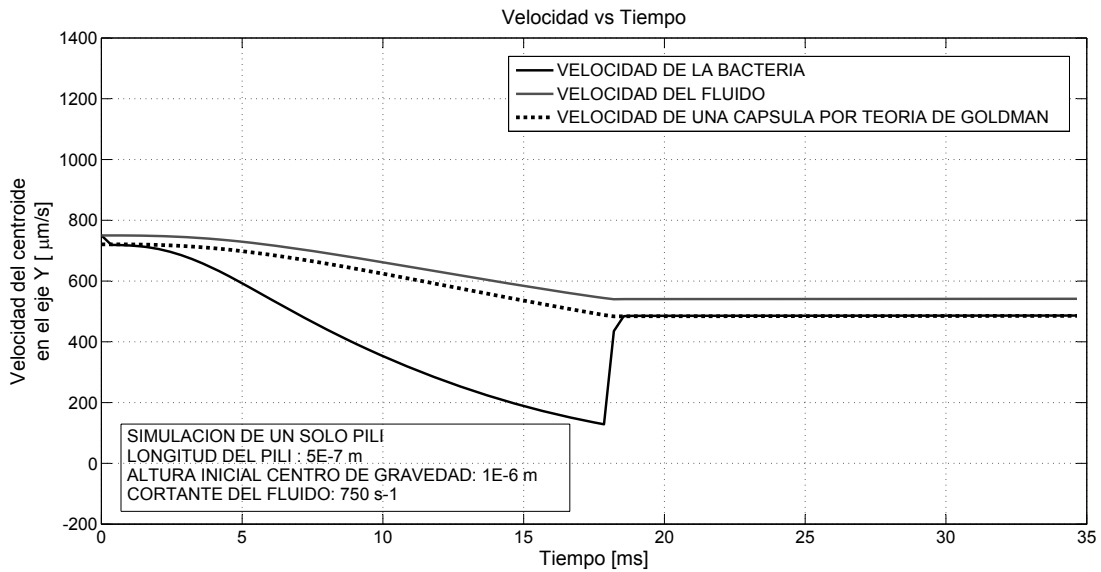


Figura 3.13: Velocidad de la cápsula por efecto de la adhesión de un pili

por el modelo para una cápsula rígida (Goldman et. al. 1967), para luego disminuir bruscamente por efecto de la fuerza ejercida por el pili; Cuando el enlace del pili con el sustrato se rompe, la membrana rápidamente converge a la velocidad de una cápsula rígida. En la gráfica de Fuerza vs Tiempo figura 3.14, se observa que el pili ejerce fuerza sobre el nodo un nodo específico y luego de que se suelta su fuerza es nula.

En la figura 3.15 se pueden observar superpuestos unos cuadros del comportamiento de la bacteria, y en la cual se detalla que en un comienzo la bacteria pivota

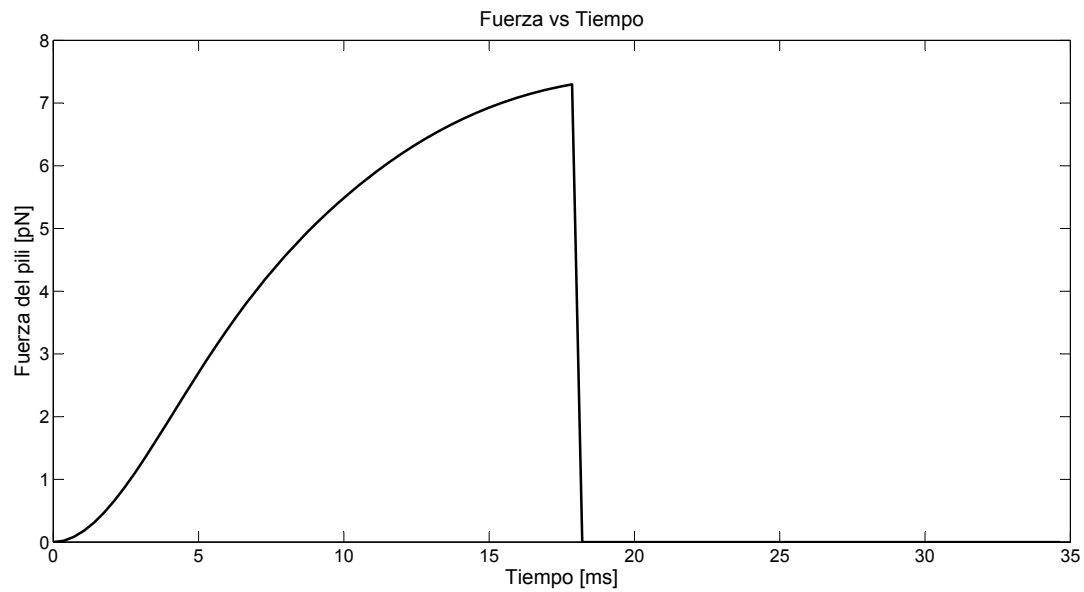


Figura 3.14: Fuerza del pili durante la simulación

con respecto al punto de adherencia, y mientras la fuerza que ejerce el pili va aumentando hasta el punto de romper el enlace y dejar libre la bacteria para que flote en el fluido.

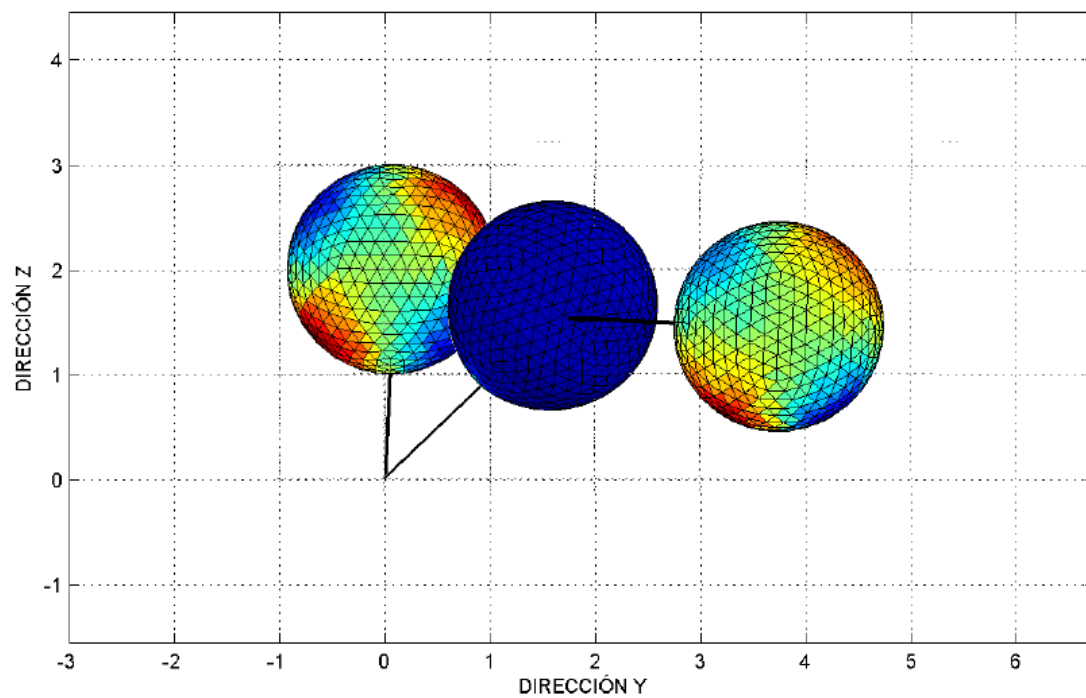


Figura 3.15: Comportamiento de la bacteria

3.6. MÚLTIPLES PILIS EN LA SUPERFICIE DE LA BACTERIA

Hasta el momento se han analizado los diferentes modelos para una sola fimbria o pili y su interacción con la membrana de la bacteria; a partir de este punto se considera que la bacteria esta cubierta por múltiples pilis y que estos se distribuyen de manera aleatoria a lo largo de la superficie y que poseen diversas longitudes.

En primera instancia se va a realizo un algoritmo para ubicar los diferentes pilis con una longitud uniforme. Según Whitfield [11] una bacteria del tipo Escherichia Coli ExPEC posee mas de 150 pilis al rededor de su membrana; para las simulaciones de aquí en adelante se ubicaran entre 30 y 200 pilis aleatoriamente en los nodos de la malla de la membrana de orden de refinamiento tres como se especifica en el cuadro 3.1.

Para realizar estas simulaciones se realizó un Diseño de Experimentos tres factorial, con tres parámetros y tres niveles; los parámetros del diseño de experimentos son la cantidad de pilis ubicados en la membrana de la bacteria, la longitud de los pilis y el cortante del fluido según la tabla 3.5, los resultados son las simulaciones E1 a E27; las variables de interés son la velocidad promedio del centro de gravedad de la membrana, el desplazamiento de la membrana, la fuerza promedio ejercida por el pili que comienza enganchado, la fuerza de ruptura del enlace de este pili y el tiempo de ruptura de dicho enlace.

Según otros autores, la bacteria puede estar en tres regímenes los cuales son flotar en el fluido, rodar sobre la pared y realizar marchas y altos totales, esto dependiendo de los parámetros que se evalúan en el Diseño de Experimentos y las observaciones cualitativas de las simulaciones se agruparan por regímenes.

Cuadro 3.5: Parámetros Diseño de Experimentos 3^3

	CORTANTE [s^{-1}]								
	500			750			1000		
	CANTIDAD DE PILIS								
LONGITUD [μm]	50	100	150	50	100	150	50	100	150
0.25	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
0.50	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18
0.75	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27

Las gráficas de velocidad del centro de gravedad de la bacteria contra tiempo para las 27 simulaciones planteadas se pueden observar en el anexo A, todas las

simulaciones se hicieron con el mismo paso de tiempo y las cuales terminaron en un equivalente de $35 \mu s$ de tiempo real.

Con los resultados obtenidos en estas simulaciones se procede a realizar un análisis estadístico de varianza (ANOVA), teniendo como parámetros de entrada el cortante del fluido, la longitud del pili y la cantidad de pilis sobre la membrana bacteriana.

El primer análisis se hace con respecto al desplazamiento de la bacteria el cual destaca que el parámetro mas relevante es el cortante del fluido seguido por la longitud del pili figura 3.16, la correlación de estos dos parámetros es lineal lo que quiere decir que a medida que se aumenta la velocidad del fluido la bacteria recorrerá mas espacio, y cuando se aumenta la longitud del pili se incrementa la altura inicial del centro de gravedad de la bacteria y por ende la velocidad. La cantidad de pilis no afecta en gran medida el desplazamiento de la bacteria.

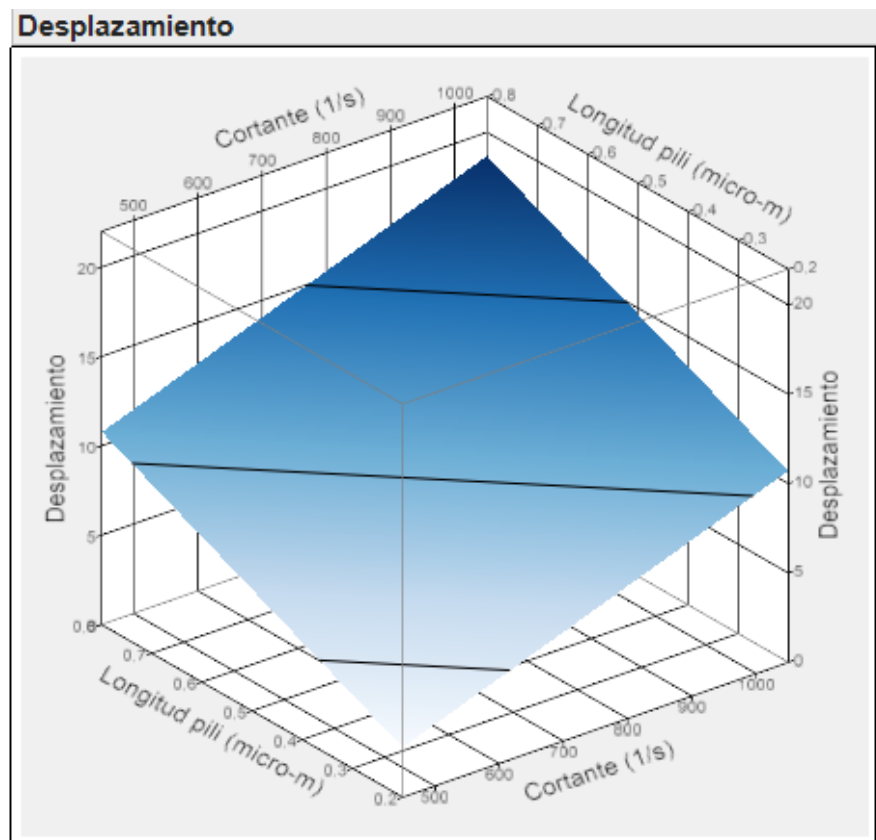


Figura 3.16: Análisis de correlación del desplazamiento de la bacteria

El segundo análisis que se realiza es la variación de la velocidad promedio de la bacteria con respecto a los parámetros de entrada; al igual que el primer análisis la correlación entre el cortante del fluido y la longitud del pili es lineal como se puede observar en la figura 3.17.

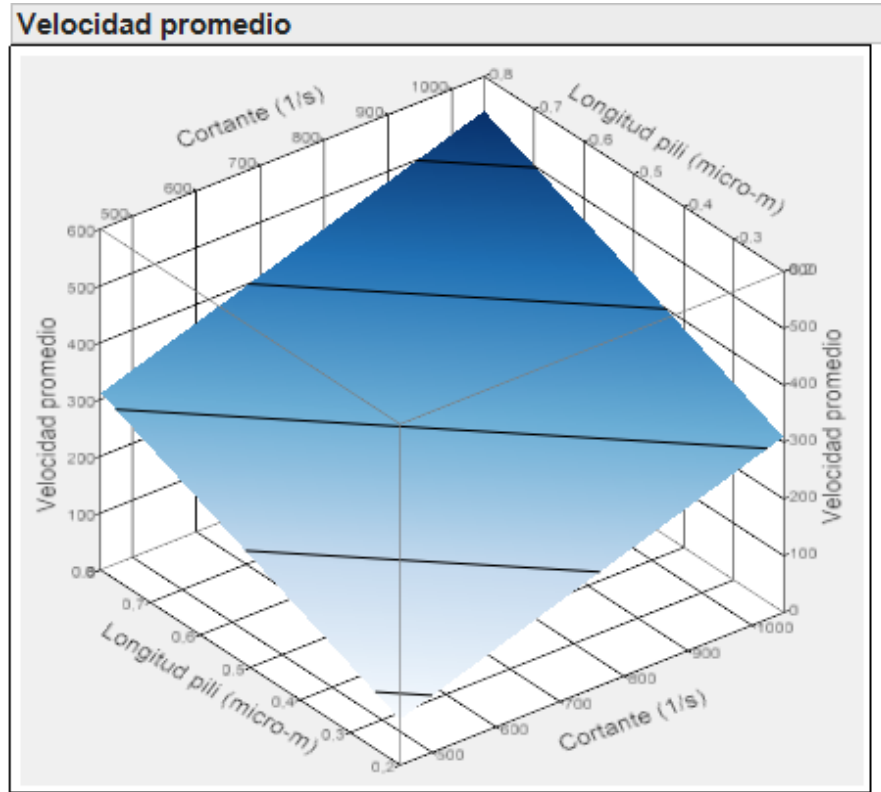


Figura 3.17: Análisis de correlación de la velocidad promedio de la bacteria

El siguiente análisis que se realizó respecto a los parámetros de entrada fue la de observar la variación de la Fuerza promedio del pili que posee el primer enlace, la fuerza de ruptura de este enlace, y el tiempo de vida de este. En este análisis el parámetro que mayor relevancia es el cortante, seguido por la cantidad de pilis, y por la longitud de los pilis.

Al estudiar la correlación que se da entre la cantidad de pilis y la longitud de los pilis como se observa en la figura 3.18, se determinó que a menor longitud del pili este ejerce mayor fuerza debido a que posee menos subunidades, mientras que a mayor cantidad de pilis este ejerce menos fuerza, este comportamiento se da debido a que entre mas pilis haya en la superficie de la bacteria mas se distribuyen la fuerza.

Observando la correlación que existe entre el cortante del fluido con la longitud de los pilis, y el cortante del fluido con la cantidad de pilis figura 3.19 se puede determinar que el cortante del fluido es mucho mas influyente en la fuerza promedio que ejerce dicho pili, entre mayor es la velocidad del fluido la fuerza promedio es mayor.

Otro análisis que se realiza es la observación del comportamiento de la Fuerza

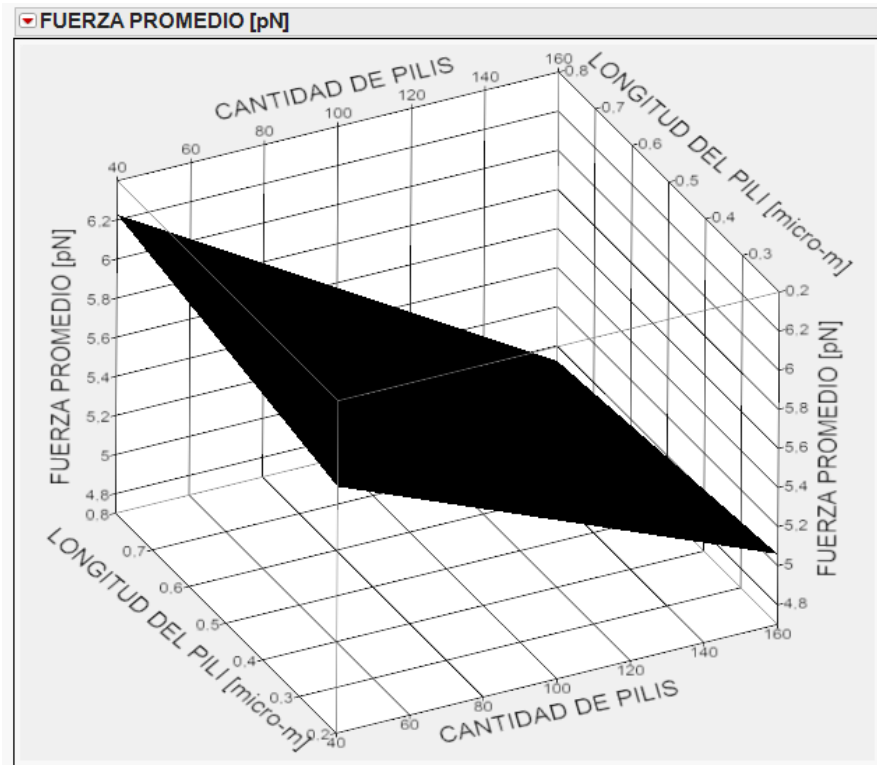


Figura 3.18: Correlación entre la cantidad de pilis y la longitud de estos para la fuerza promedio de un pili

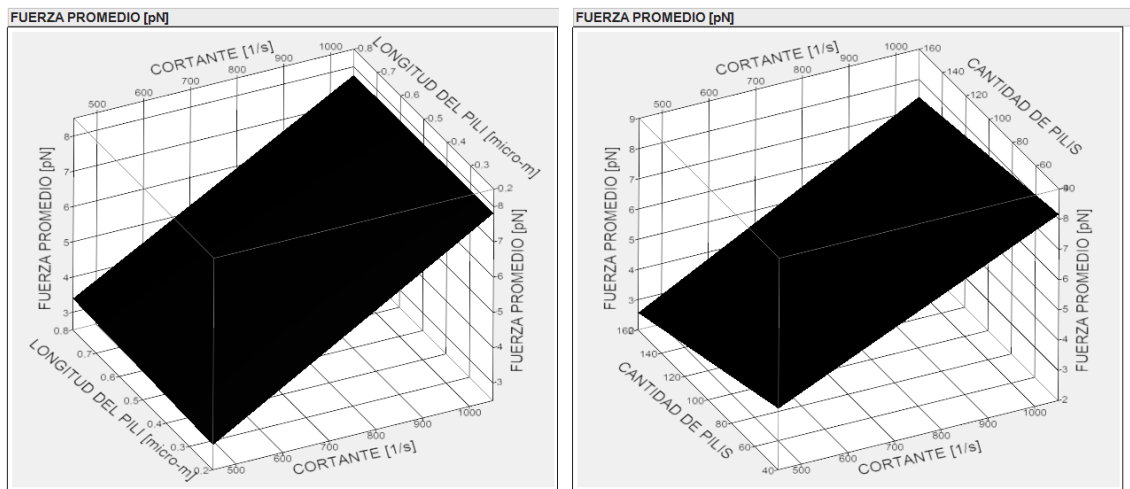


Figura 3.19: Correlación entre el cortante del fluido y las variables de longitud del pili y cantidad de pilis

de ruptura del pili que se encuentra enlazado desde el comienzo, para esto se realizaron las gráficas figura 3.20 para cada uno de los cortantes planteados en el diseño de experimentos, y como se puede observar la tendencia de los resultados es

que entre mas alta sea la velocidad del fluido es mas alta la fuerza de ruptura, esto es debido a que a menor numero de iteraciones el pili se extiende mas, mientras que la tendencia debida a la cantidad de pilis es negativa, esto es porque la fuerza de frenado se distribuye entre mas pilis.

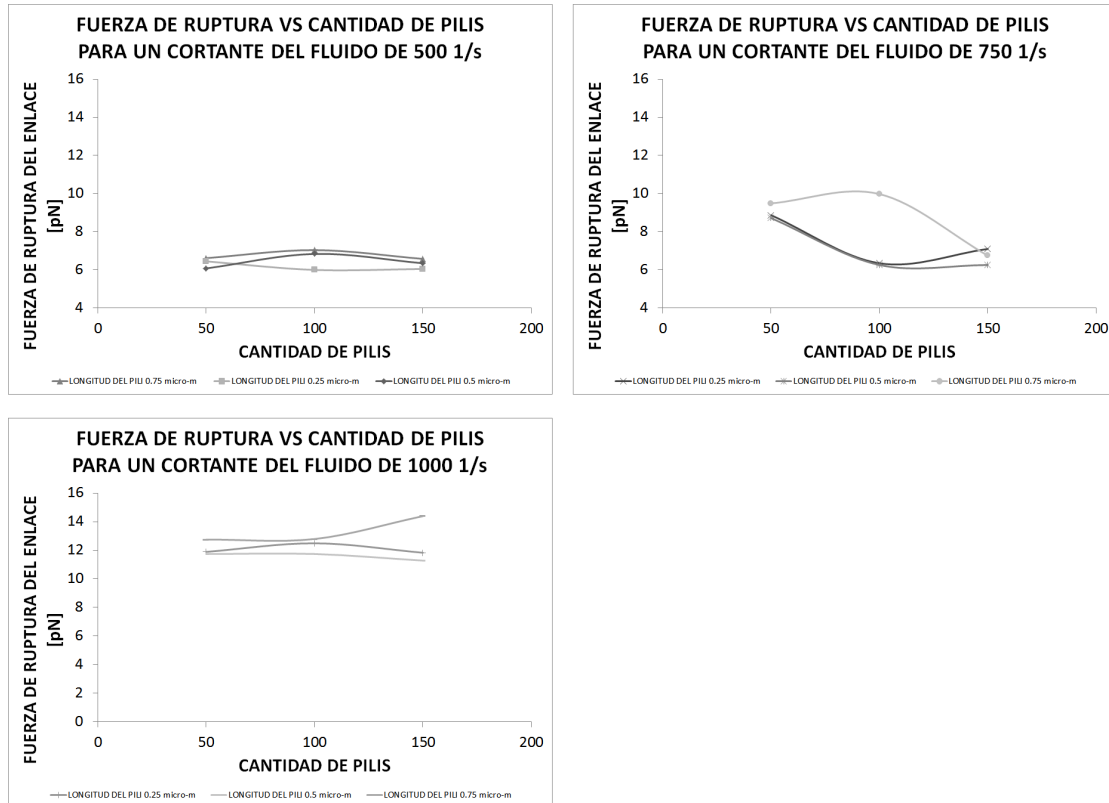


Figura 3.20: Fuerza de ruptura para diferentes cortantes del fluido

Otro de los análisis realizados fue el del tiempo de vida de cada uno de los enlaces del pili que se encuentra enganchado desde el comienzo, y la correlación que existe entre el cortante del fluido, la longitud del pili y la cantidad de pilis.

Como se observa en la figura 3.21, el cortante del fluido es mas influyente en el tiempo de vida del enlace, esto debido a que entre mayor sea la velocidad del fluido el pili se va a extender mas, por ende ejerce mas fuerza y debido a esto la probabilidad de ruptura del enlace es mucho mayor en un tiempo mas corto, mientras que entre mas pilis haya en la superficie bacteriana el tiempo de vida se incrementa pero en proporciones bajas, esto es debido a que la fuerza en contra del movimiento del fluido se distribuye en mas pilis.

De estos análisis se puede inferir que el parámetro mas influyente en el comportamiento de la bacteria *Escherichia Coli* es la velocidad del fluido, seguido por la longitud del pili que implícitamente cambia la ubicación de la bacteria sobre la pared para que este esté sin deformar en un comienzo. Por ultimo la cantidad de pilis

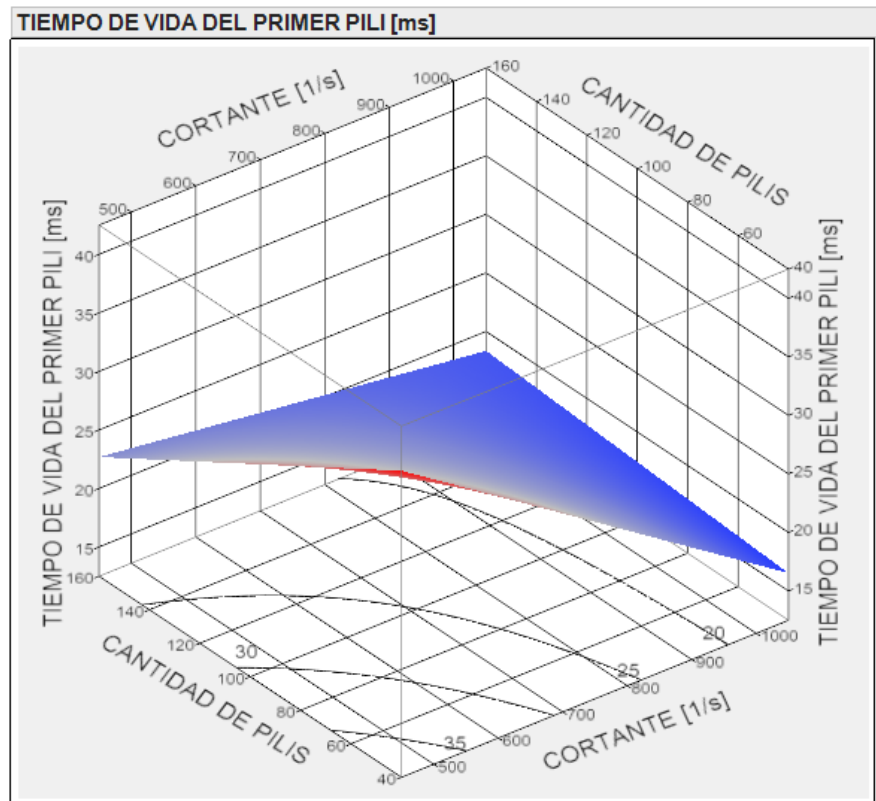


Figura 3.21: Correlación entre el cortante del fluido, la cantidad de pilis y el tiempo de vida de un enlace

afecta el tiempo de vida y la fuerza de ruptura de cada pili como lo han mencionado los diferentes autores, corroborando este comportamiento.

Capítulo 4

CONCLUSIONES

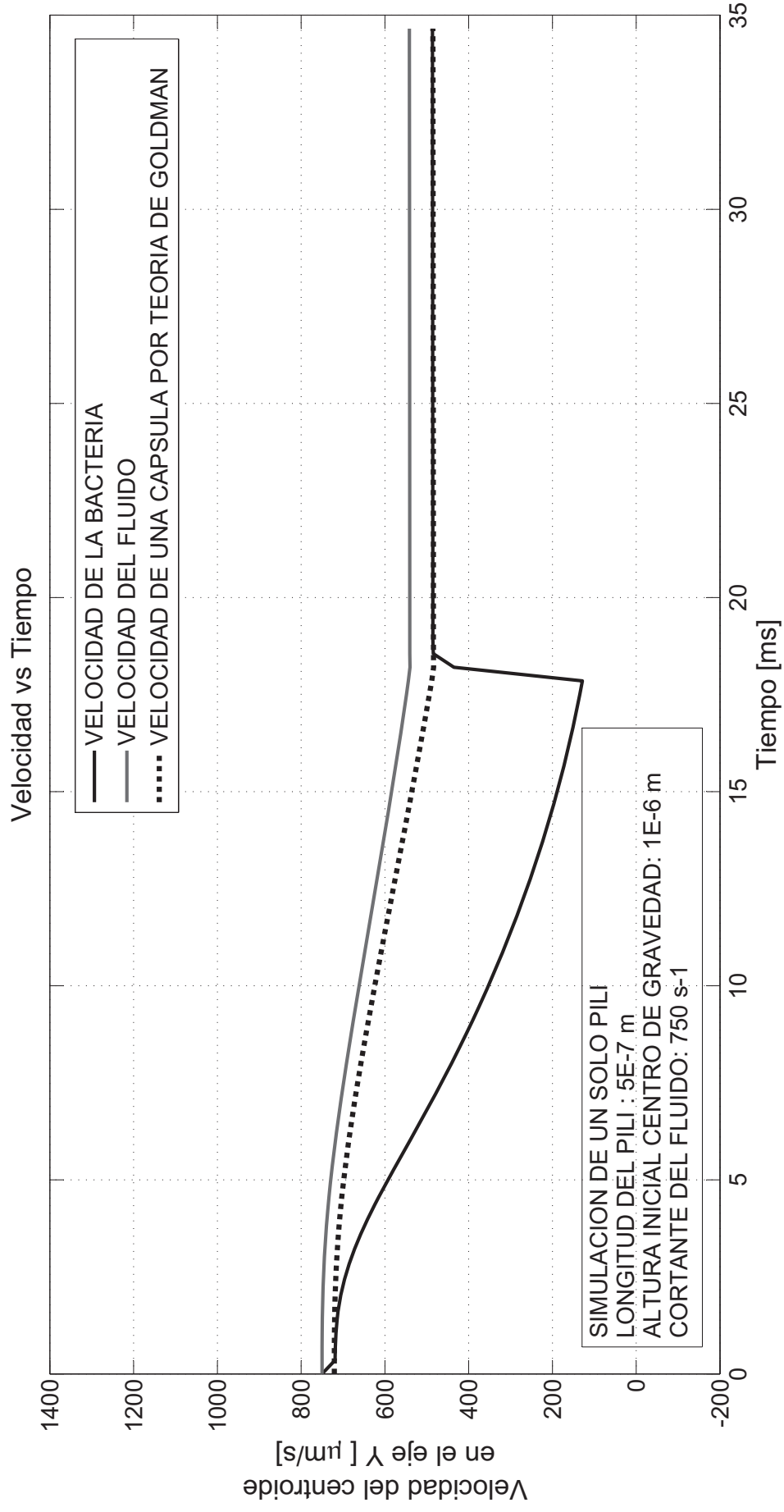
- Se desarrolló un modelo computacional para el estudio del comportamiento de adhesión de la bacteria *Escherichia Coli* a un sustrato en presencia de un flujo cortante.
- Se estudio el comportamiento de una cápsula inmersa en un flujo cortante y la cual se encuentra cerca a una pared.
- Se implementó y se validó un algoritmo computacional que simula el comportamiento de una cápsula inmersa en un flujo semi-infinito.
- Se realizó un estudio físico y mecánico de las propiedades del pili tipo I de la bacteria *Escherichia Coli*.
- Se implementó y validó un algoritmo computacional para simular el comportamiento físico y mecánico del pili Tipo I de la bacteria *Escherichia Coli*.
- Se desarrolló un algoritmo computacional que integro los diferentes modelos multi-escalares que comprenden el comportamiento físico de la bacteria *Escherichia Coli* en el proceso de adhesión a un sustrato e inmersa en un flujo cortante y cercana a una pared.
- Se desarrolló un diseño de experimentos exponencial 3^3 con tres parámetros principales y tres niveles en cada parámetro.
- Se pudo identificar cualitativamente los regímenes de comportamiento de adhesión de la bacteria *Escherichia Coli* inmersa en un flujo cortante y cerca de una pared.
- Se hizo un análisis cualitativo de los parámetros del diseño de experimentos que mas interfieren en el proceso de adhesión de la bacteria a un sustrato.
- Se encontró que la velocidad de la bacteria es influenciada en gran medida por la velocidad del fluido y la longitud del pili, mientras que la fuerza ejercida por los pilis tiene un efecto inversamente proporcional a la cantidad de pilis que se encuentran sobre la superficie bacteriana.
- Se observó que el tiempo de vida de los enlaces esta altamente ligado a la velocidad del fluido y que la cantidad de pilis sobre la membrana de la bacteria interfieren en menor medida con este.

Capítulo A

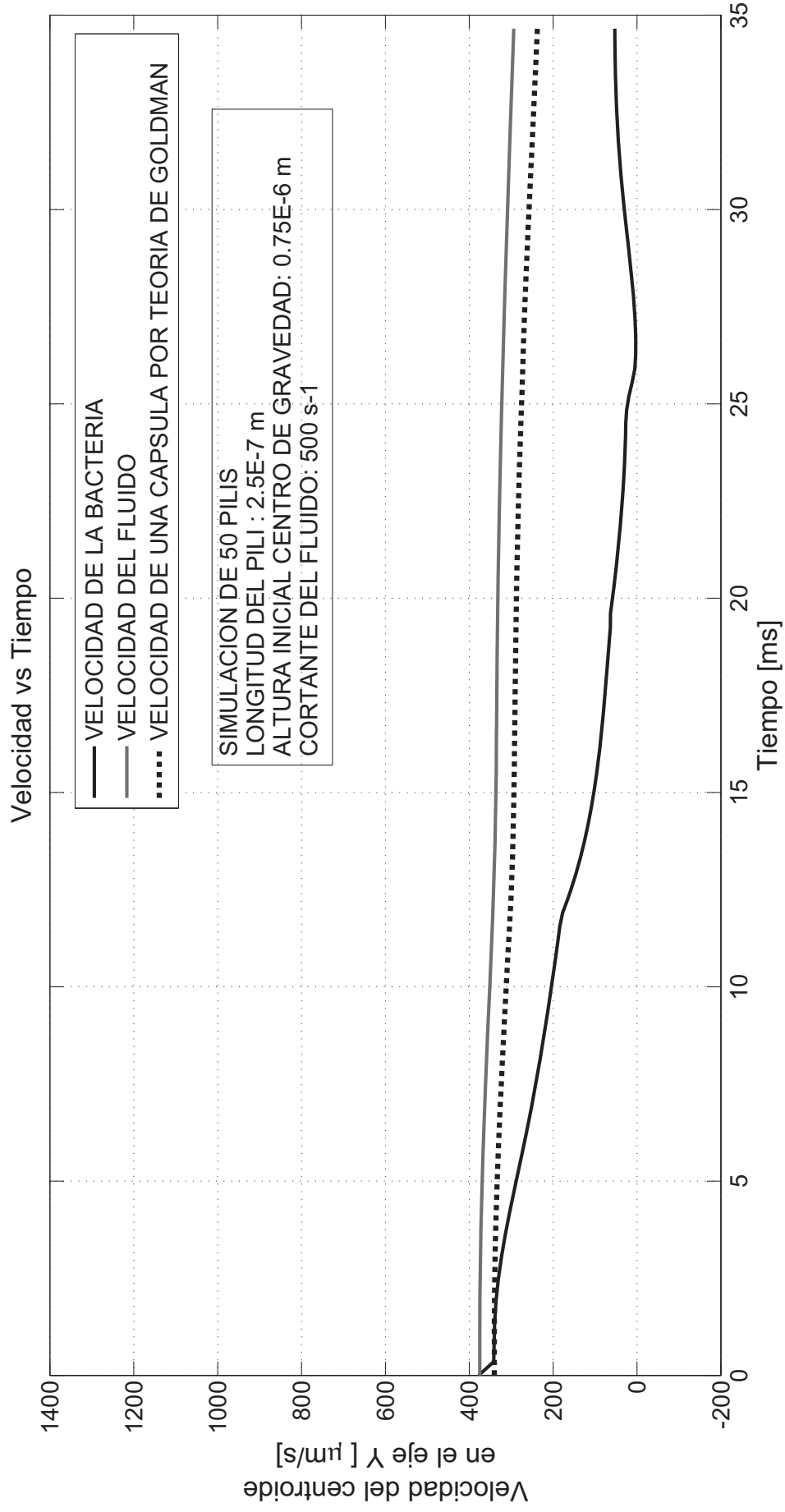
APÉNDICE A - GRÁFICAS DE VELOCIDAD VS TIEMPO PARA EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

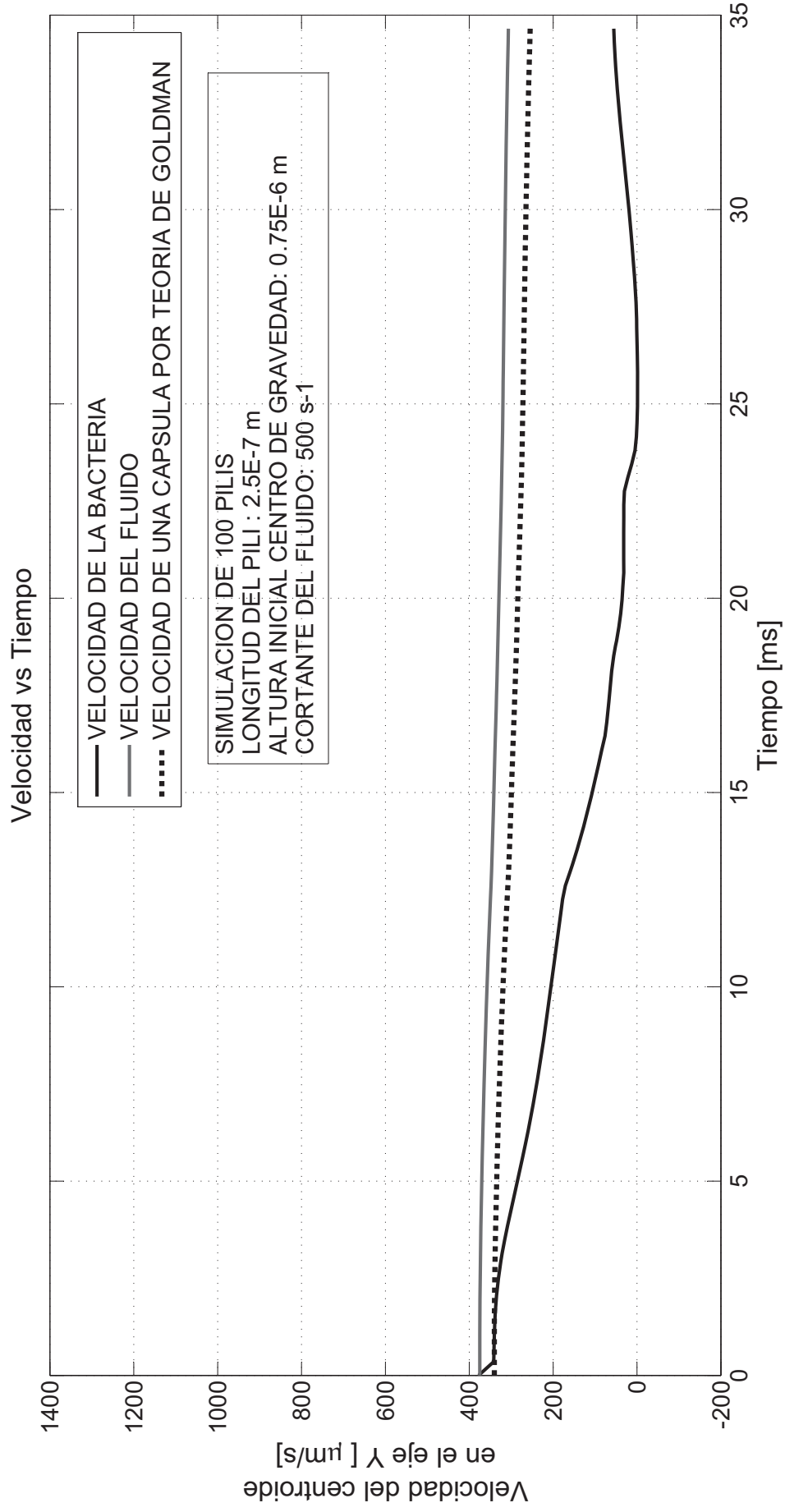
- SIMULACIÓN DE UN SOLO PILI
- RÉGIMEN DE ALTO (STOP)
- RÉGIMEN DE MARCHA Y ALTO (STOP - GO)
- RÉGIMEN DE RODADURA (ROLLING)

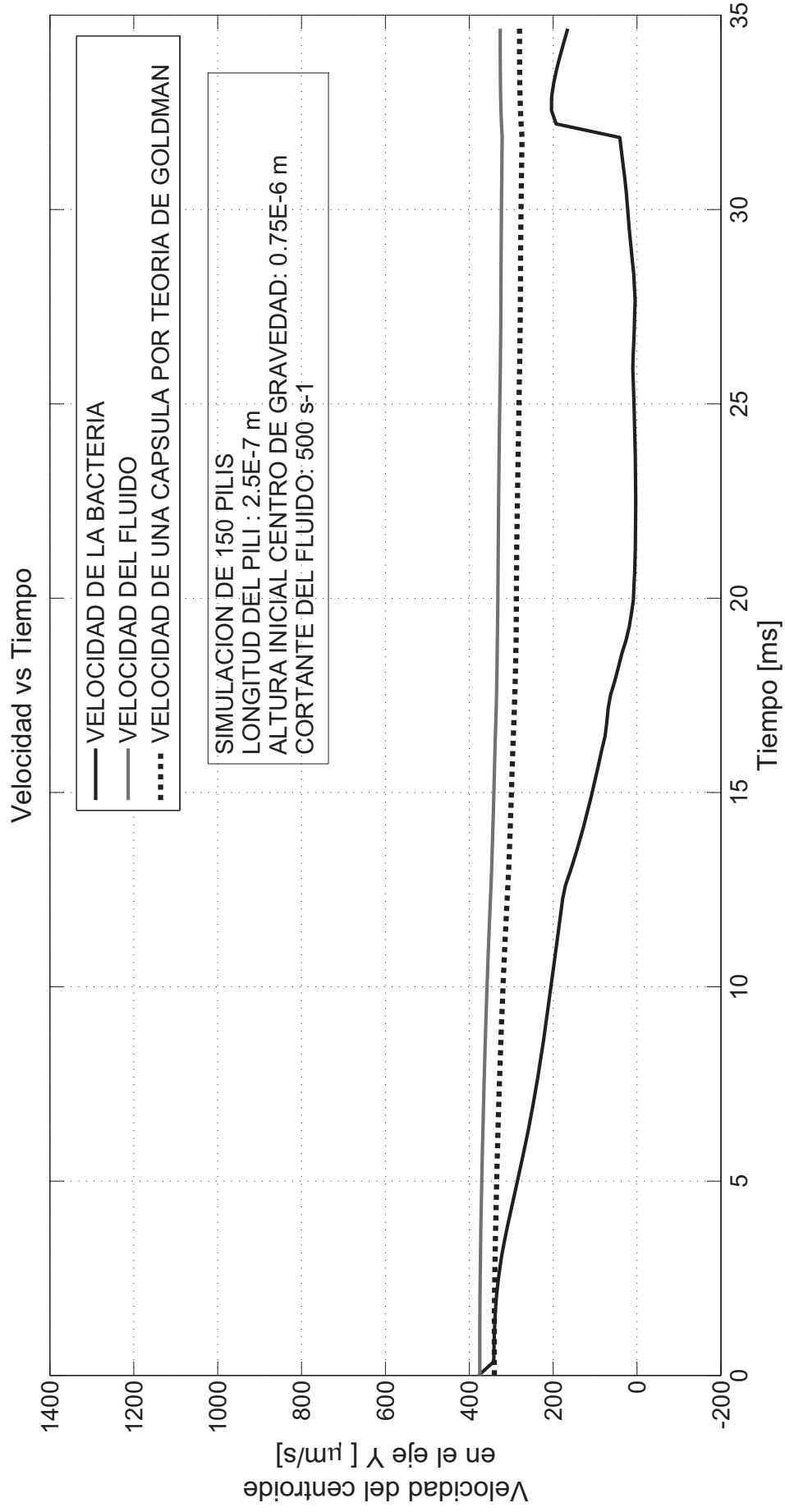
SIMULACIÓN DE UN SOLO PILI

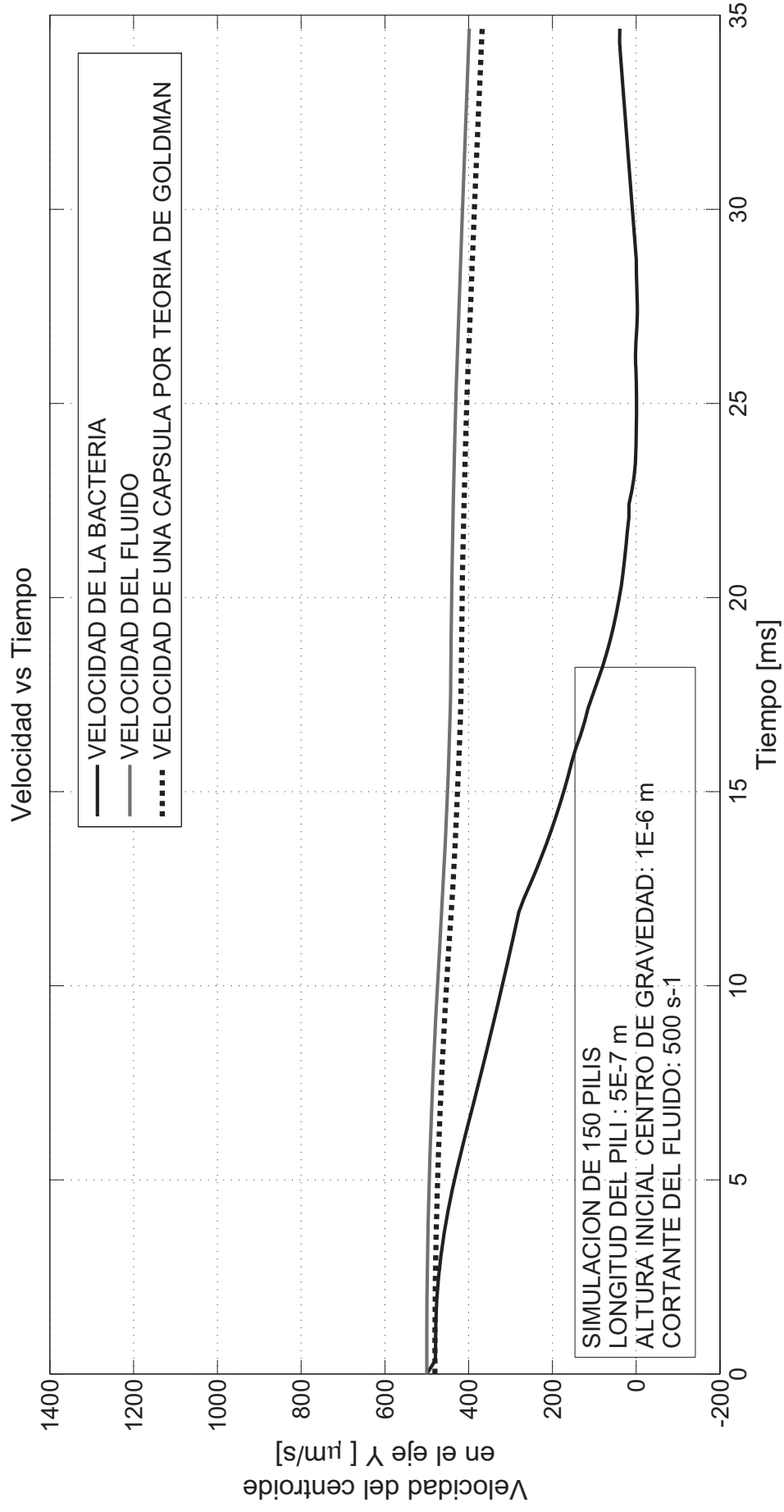


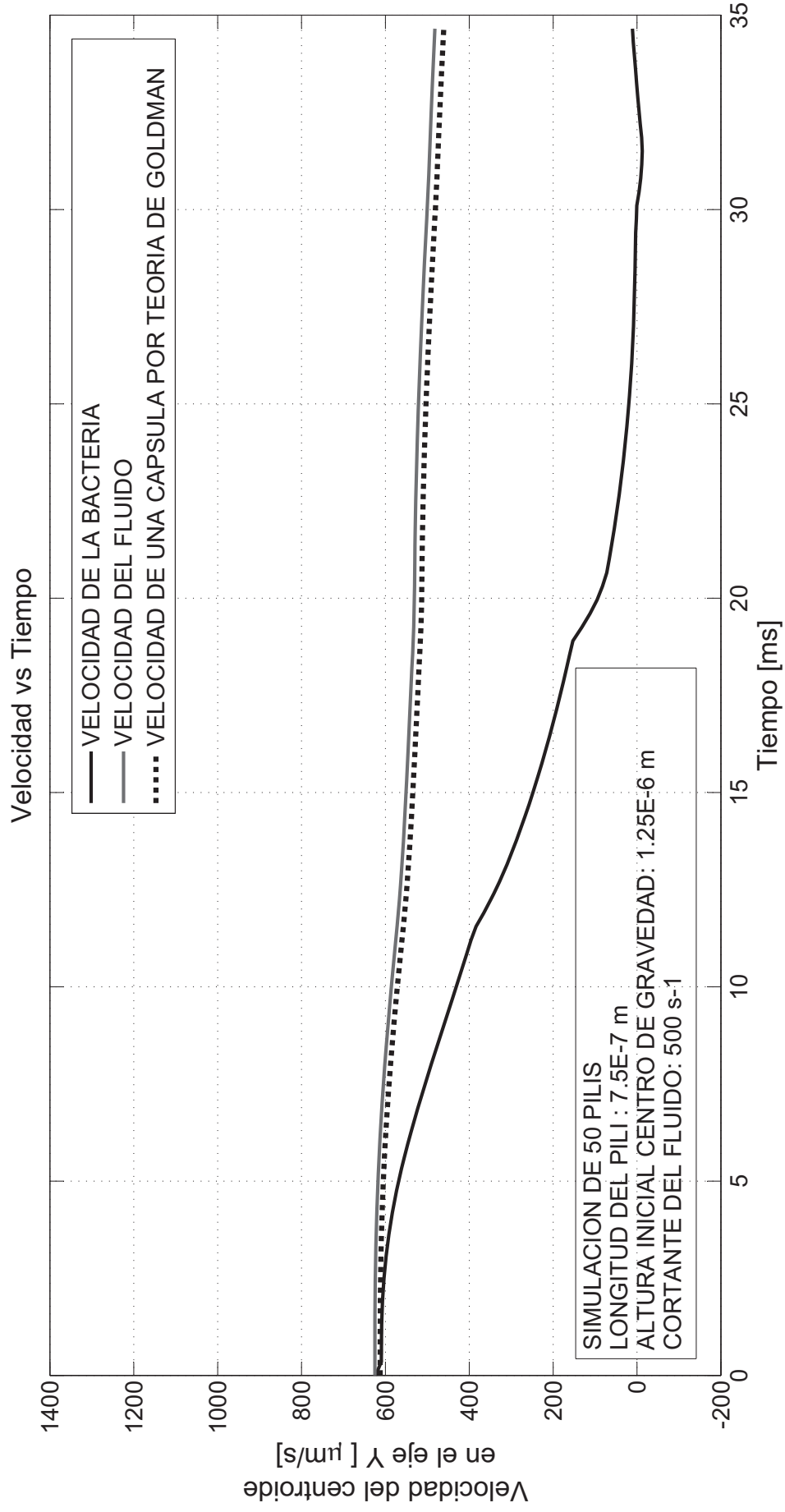
RÉGIMEN DE ALTO (STOP)

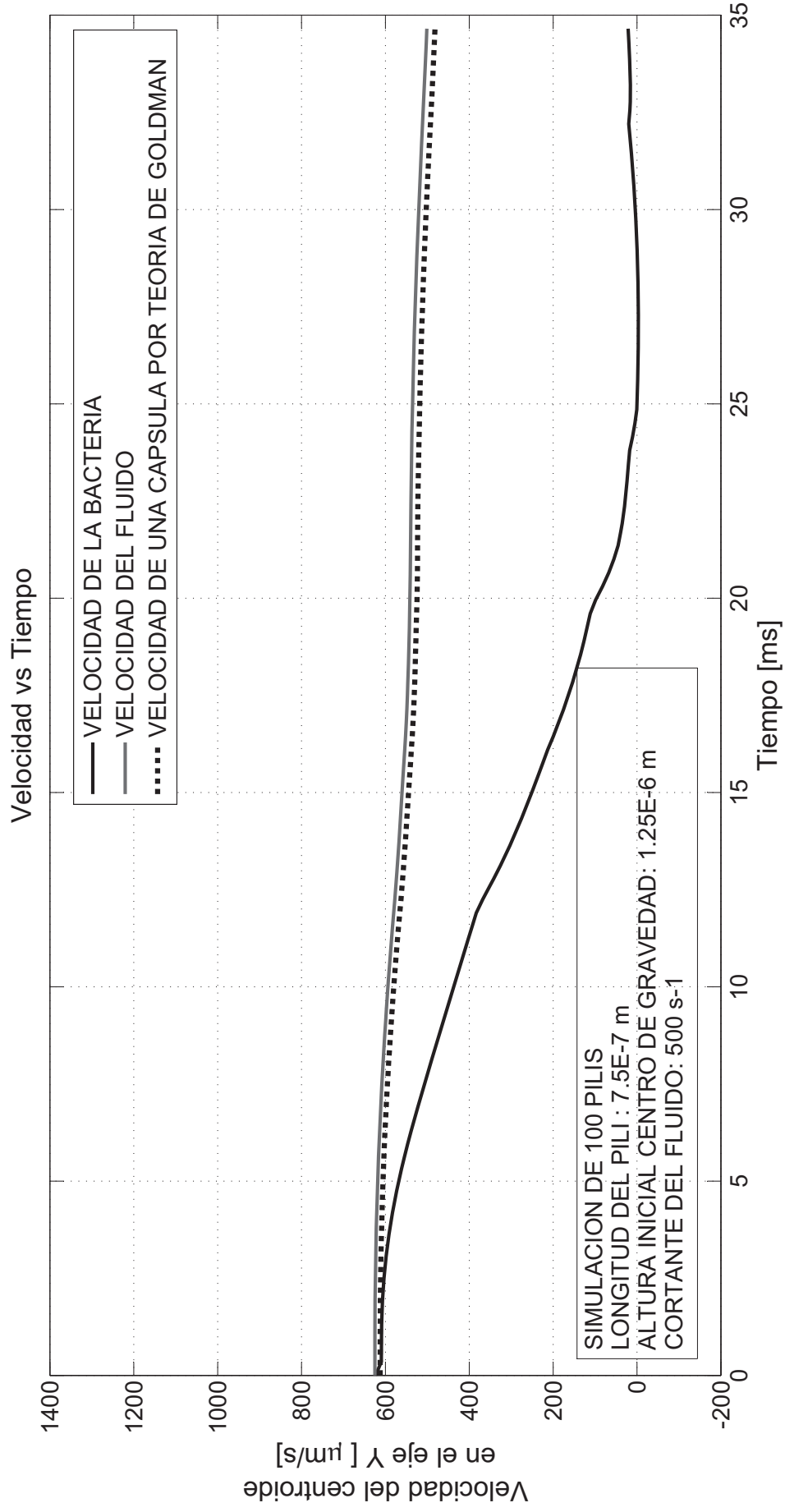


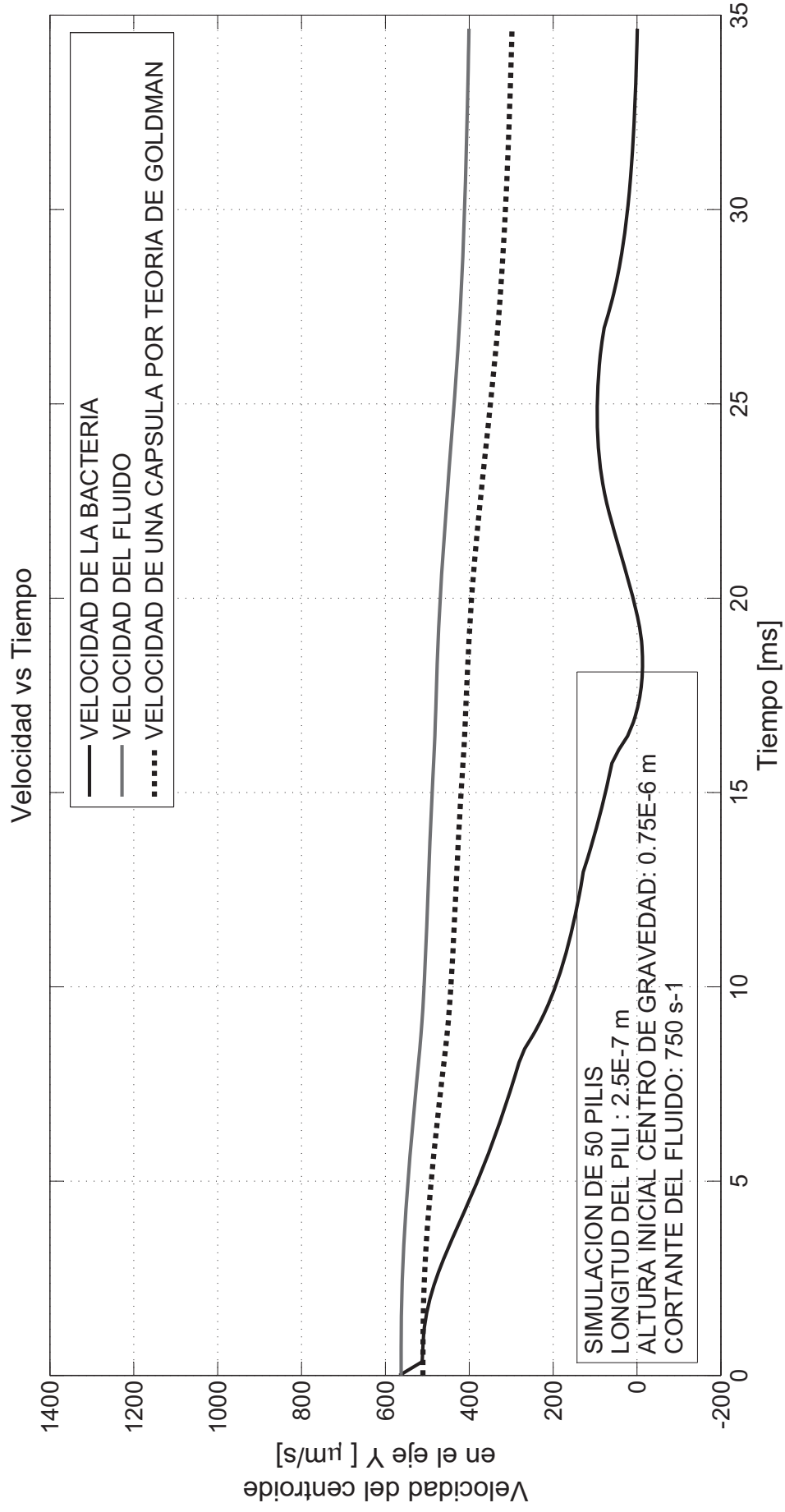




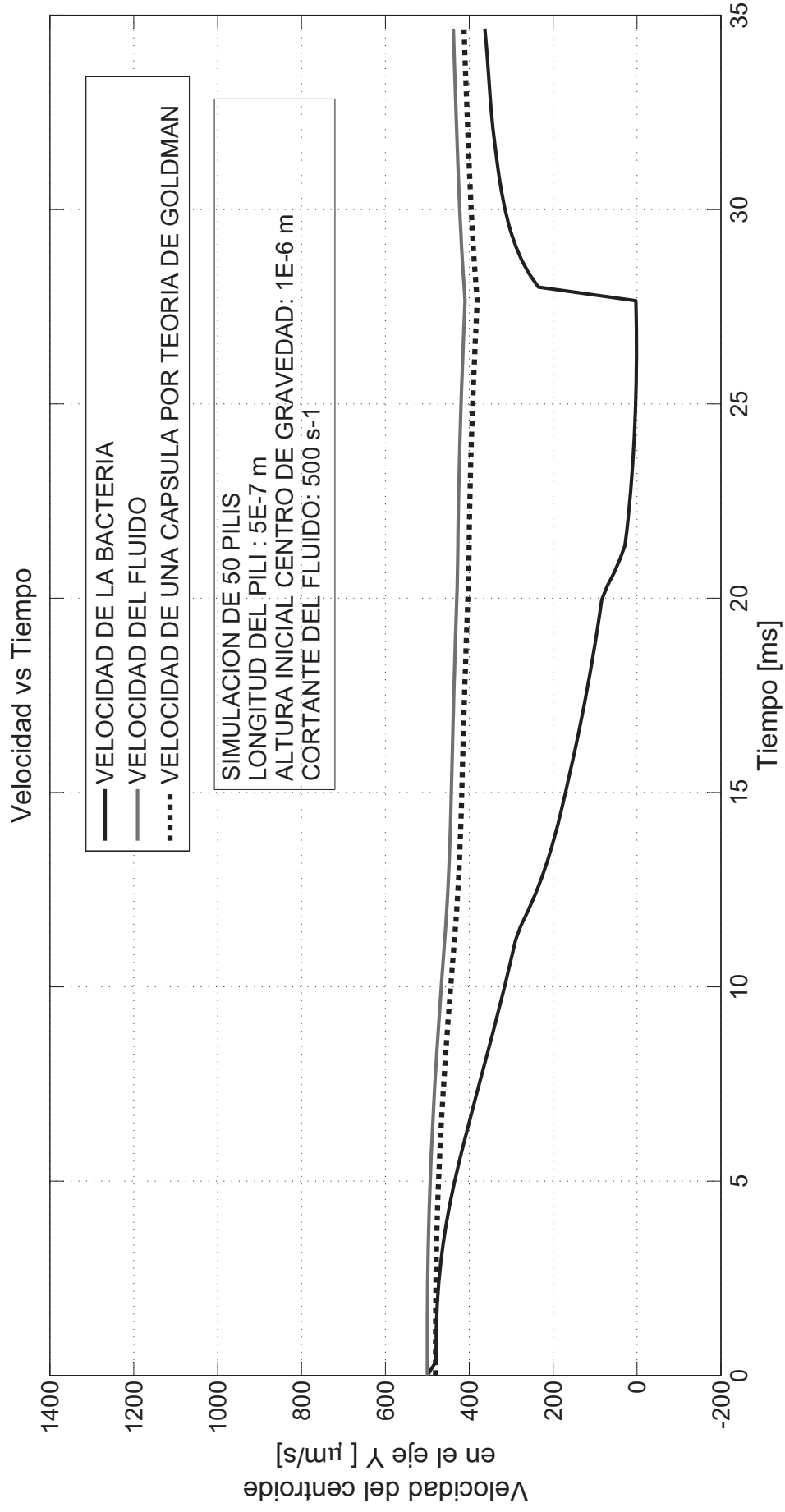


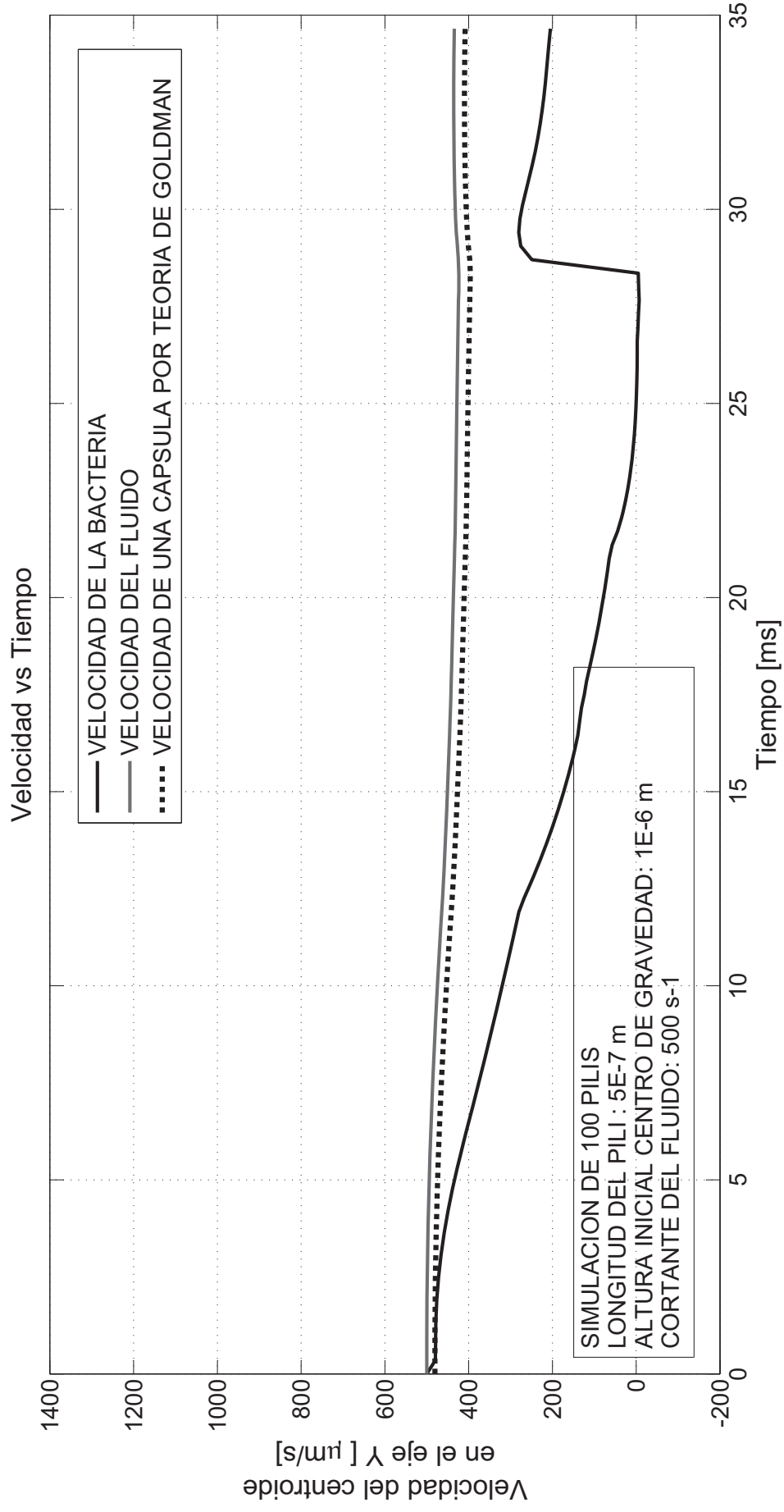


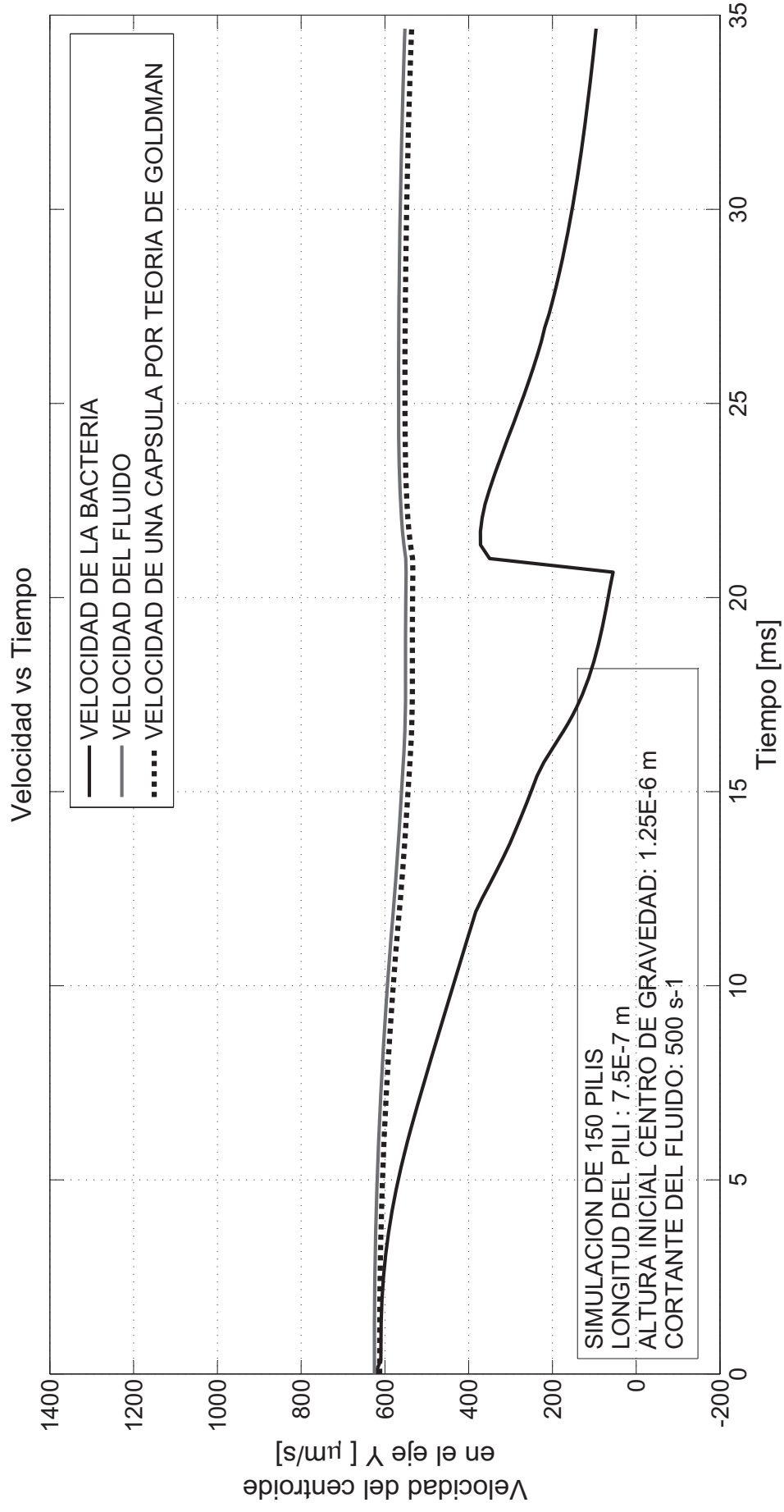


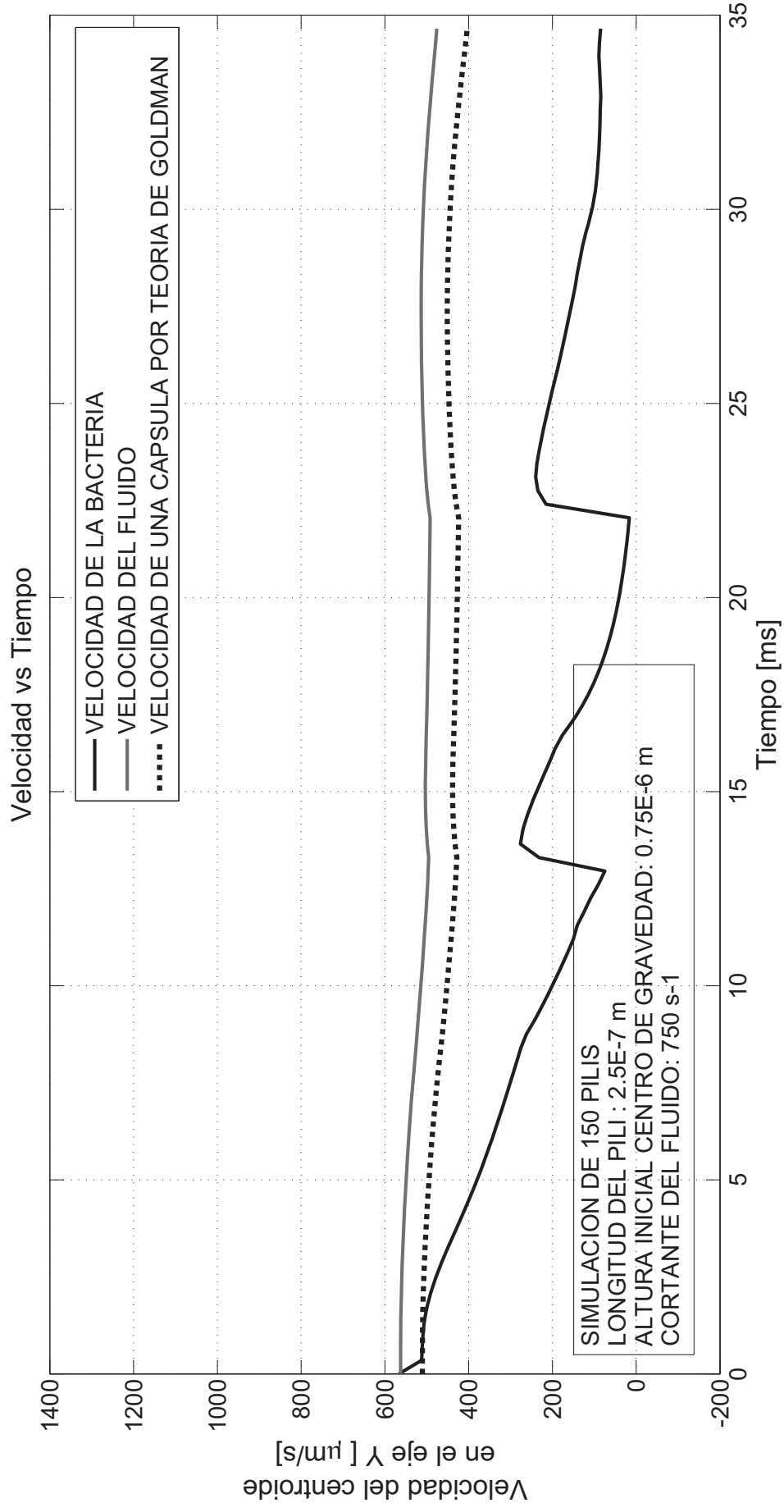


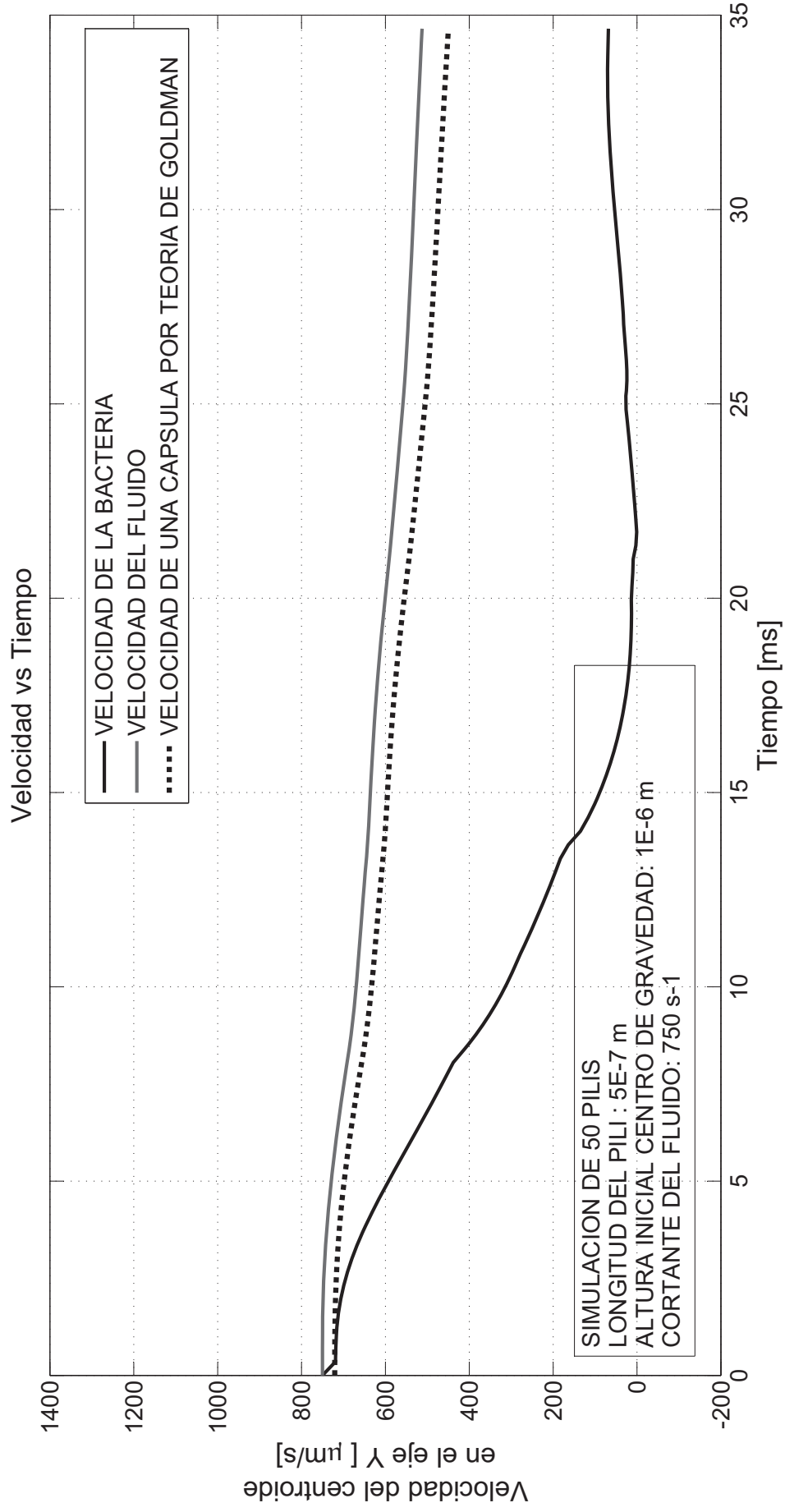
RÉGIMEN DE MARCHA Y ALTO (STOP - GO)

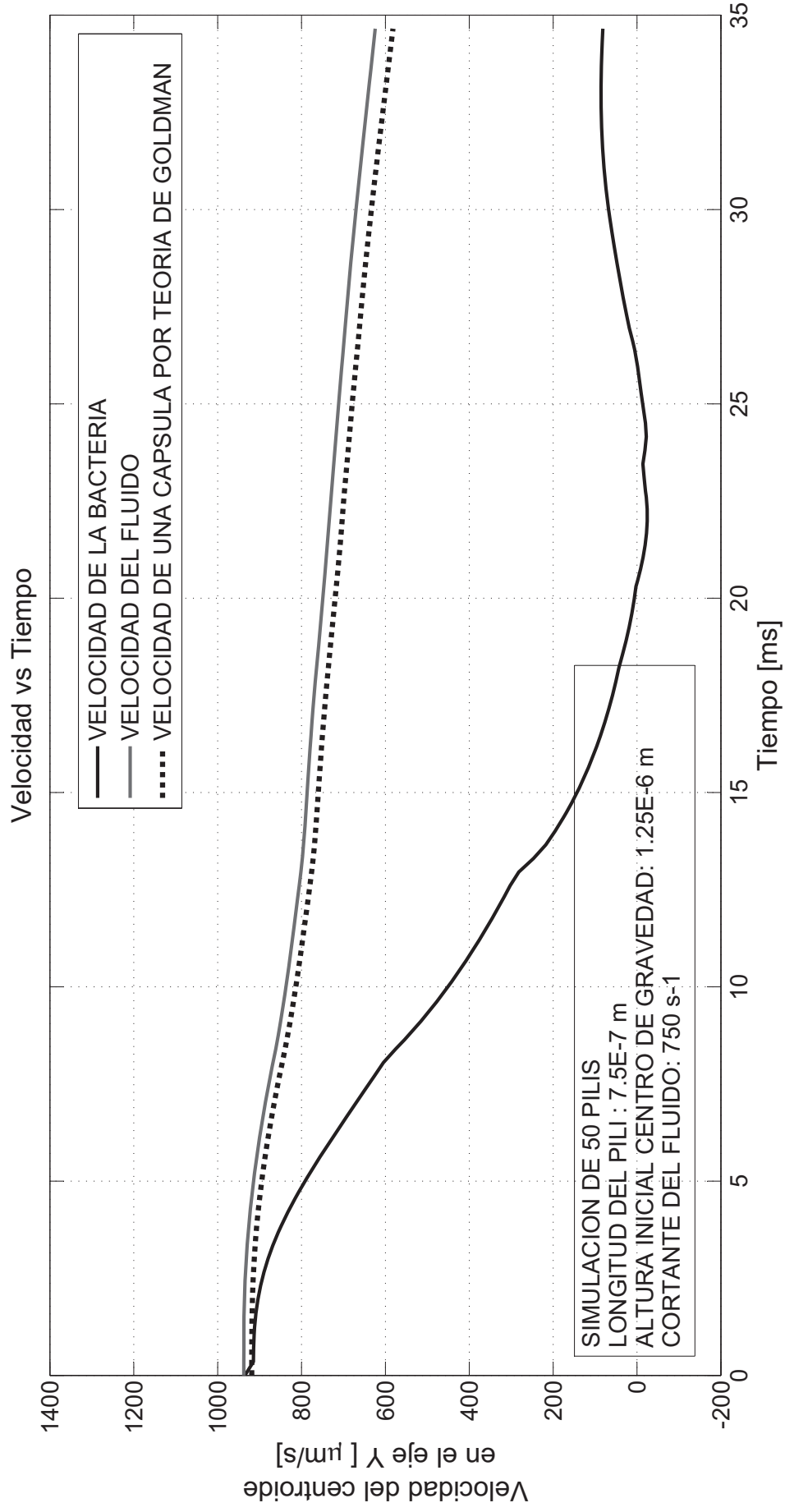


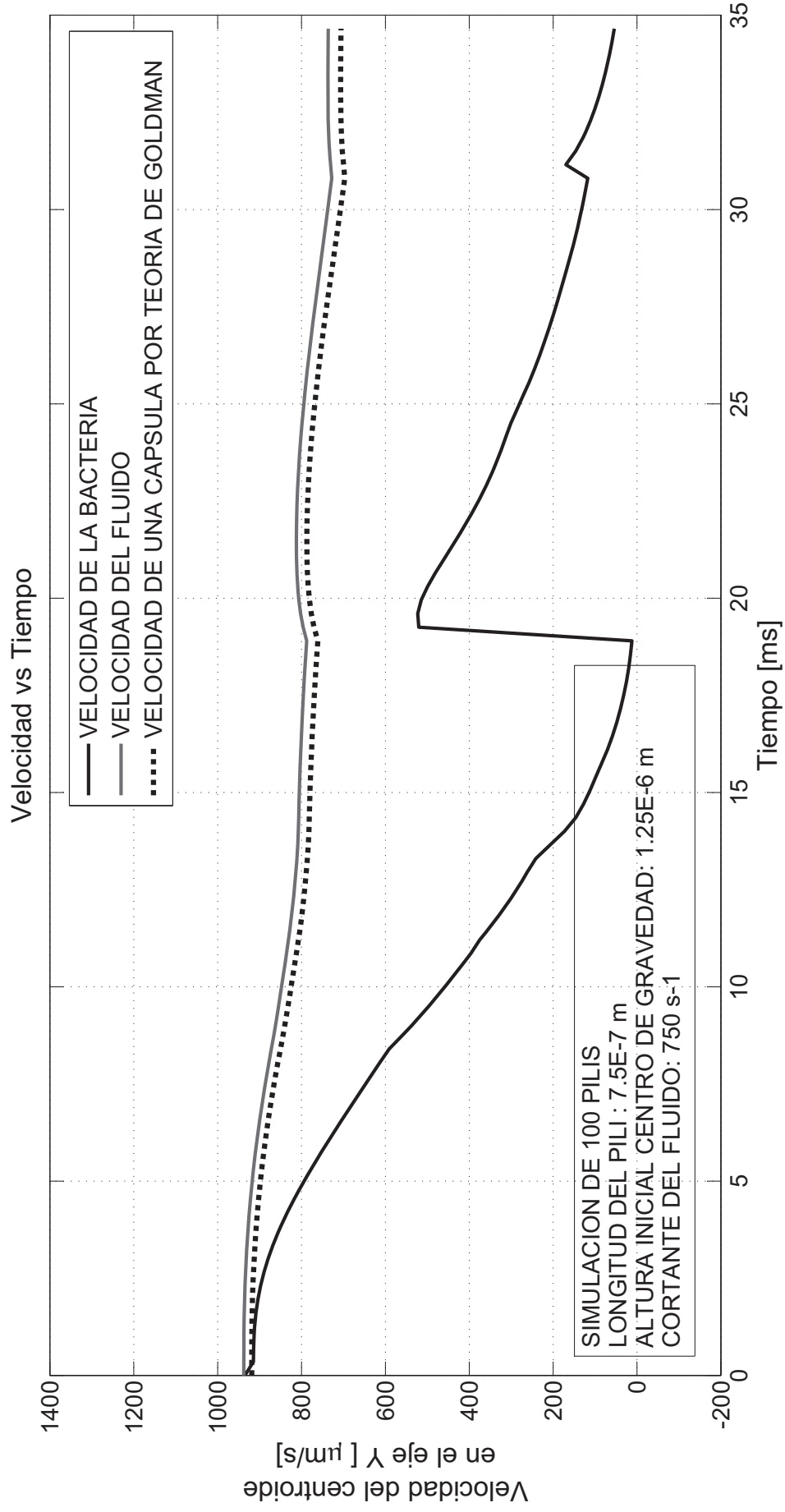


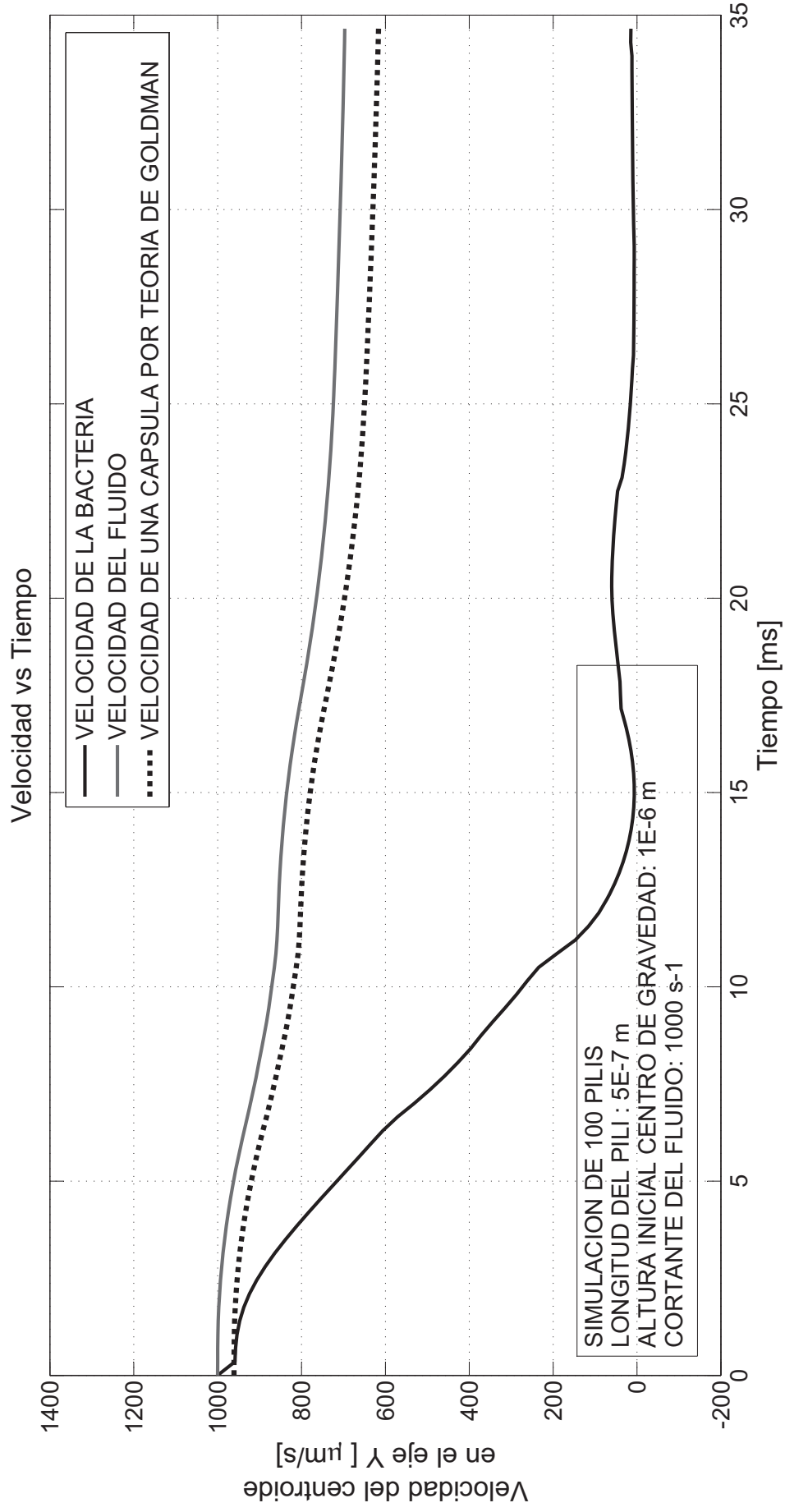


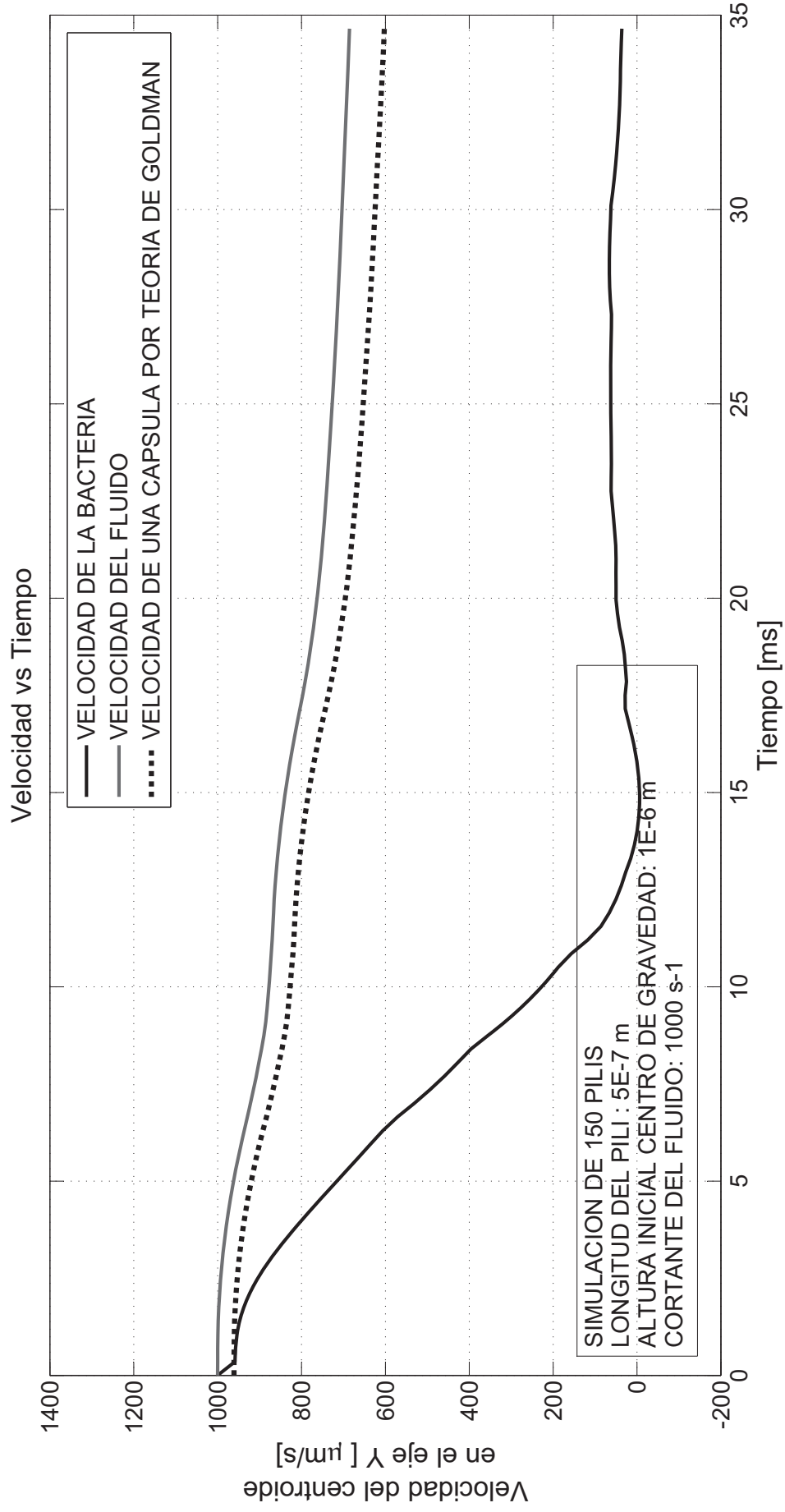




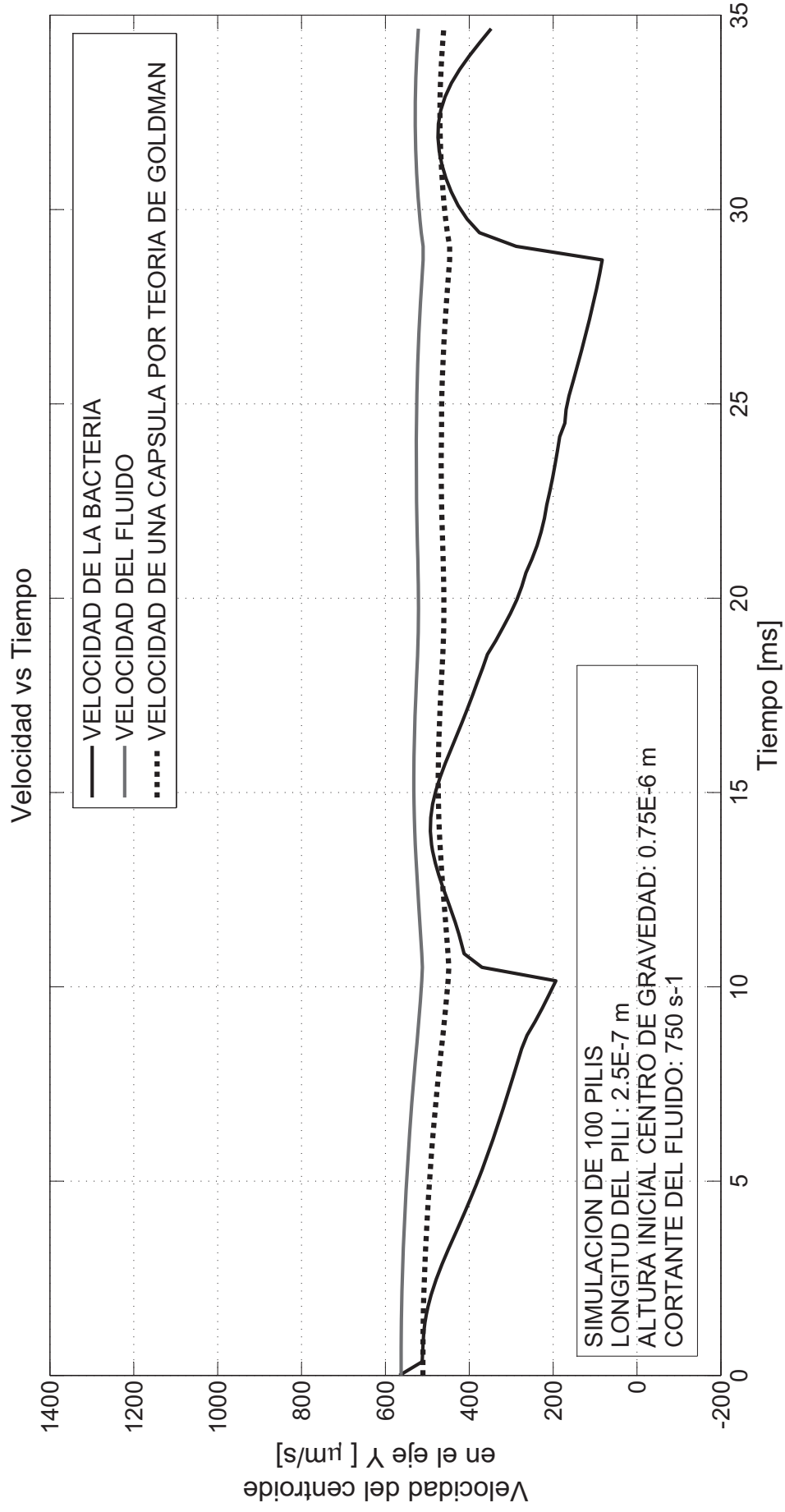


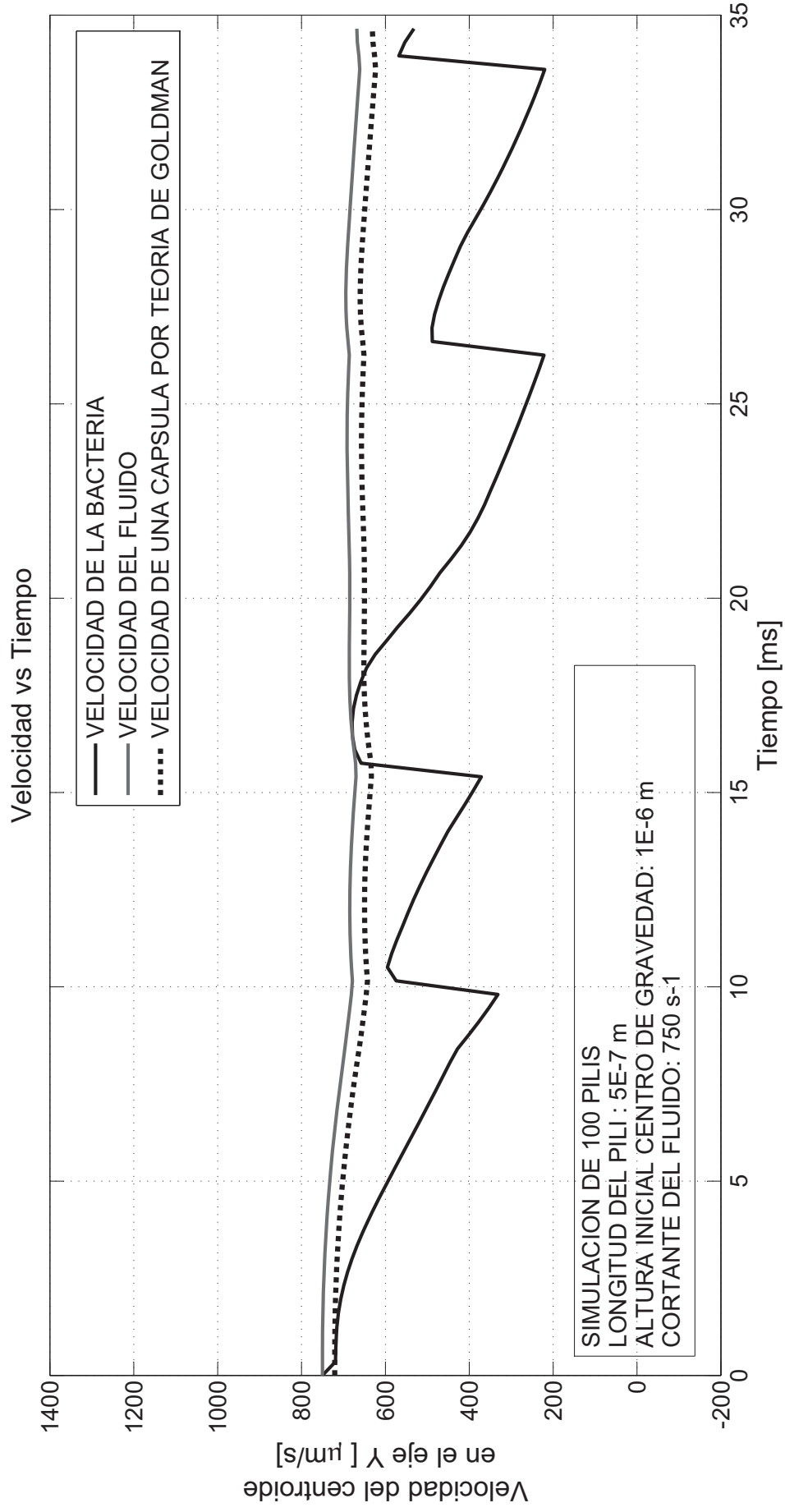


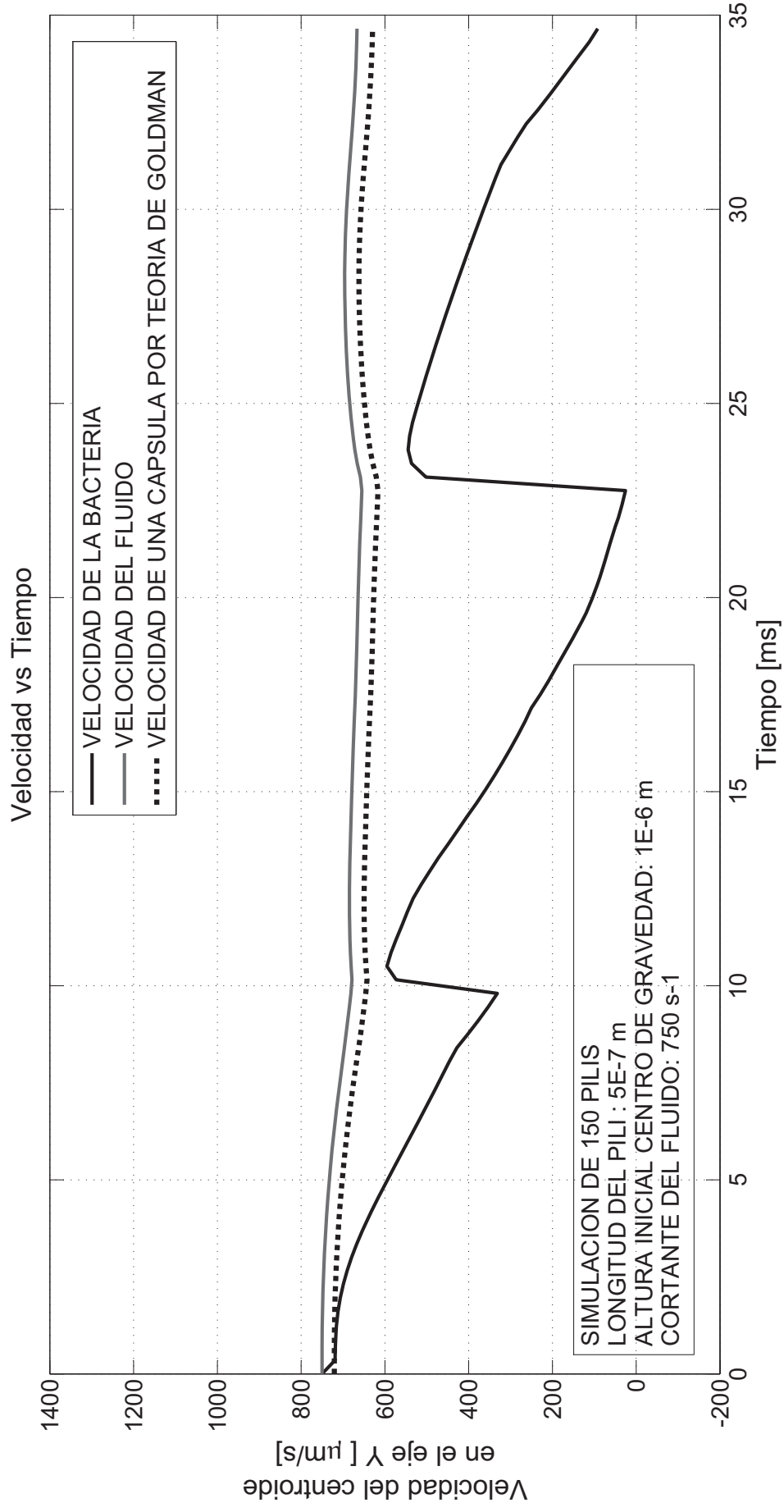


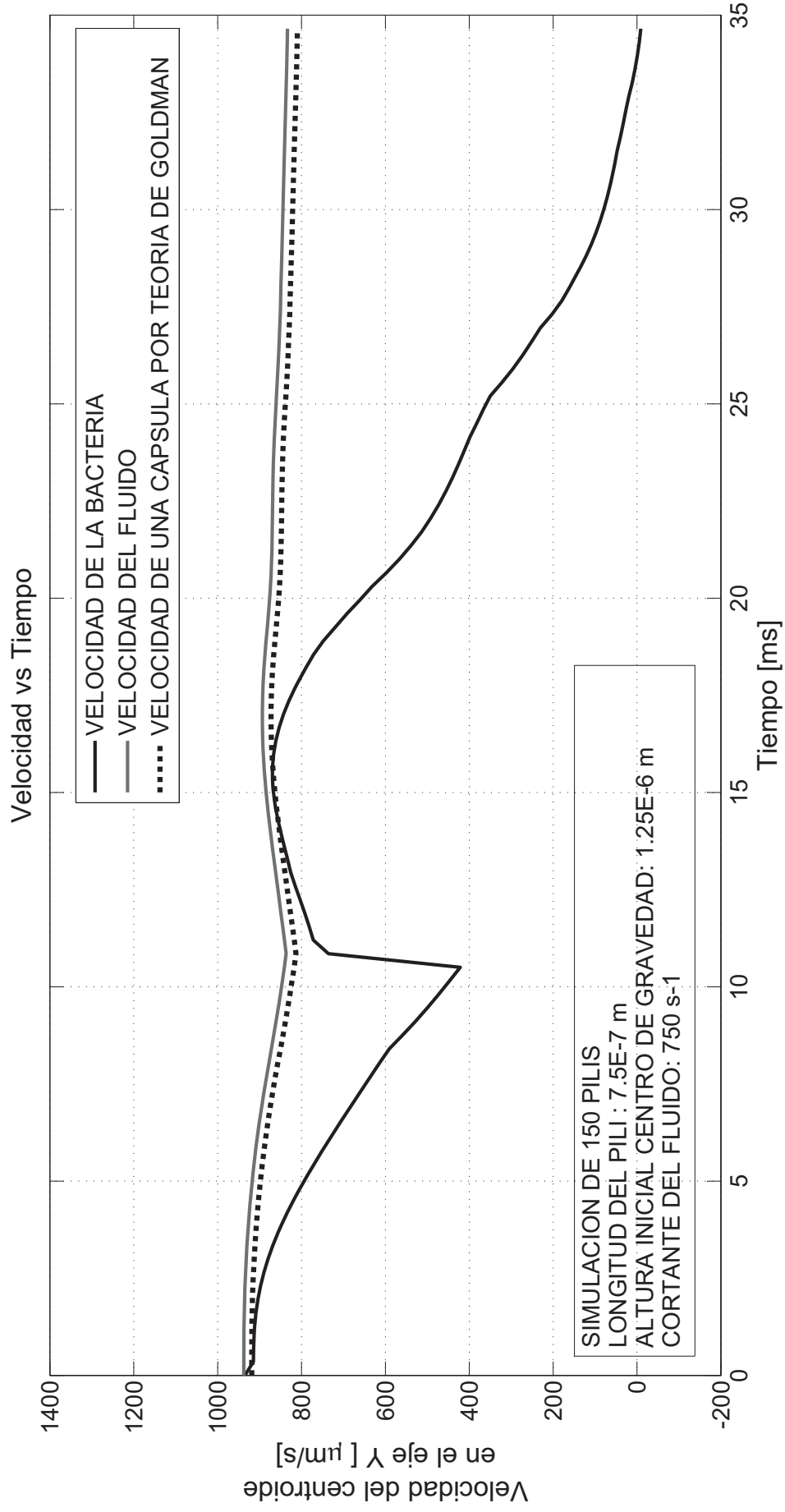


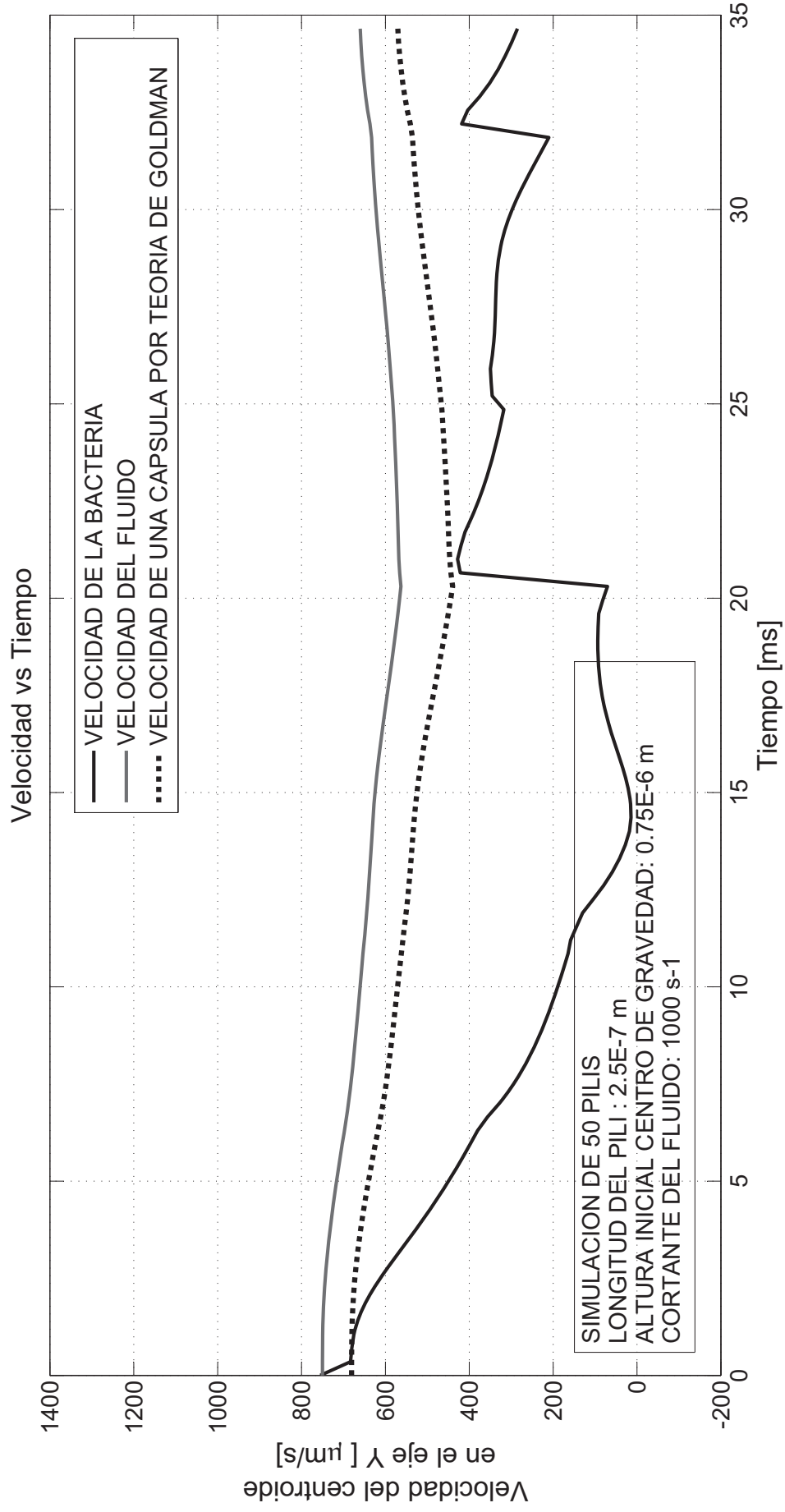
RÉGIMEN DE RODADURA (ROLLING)

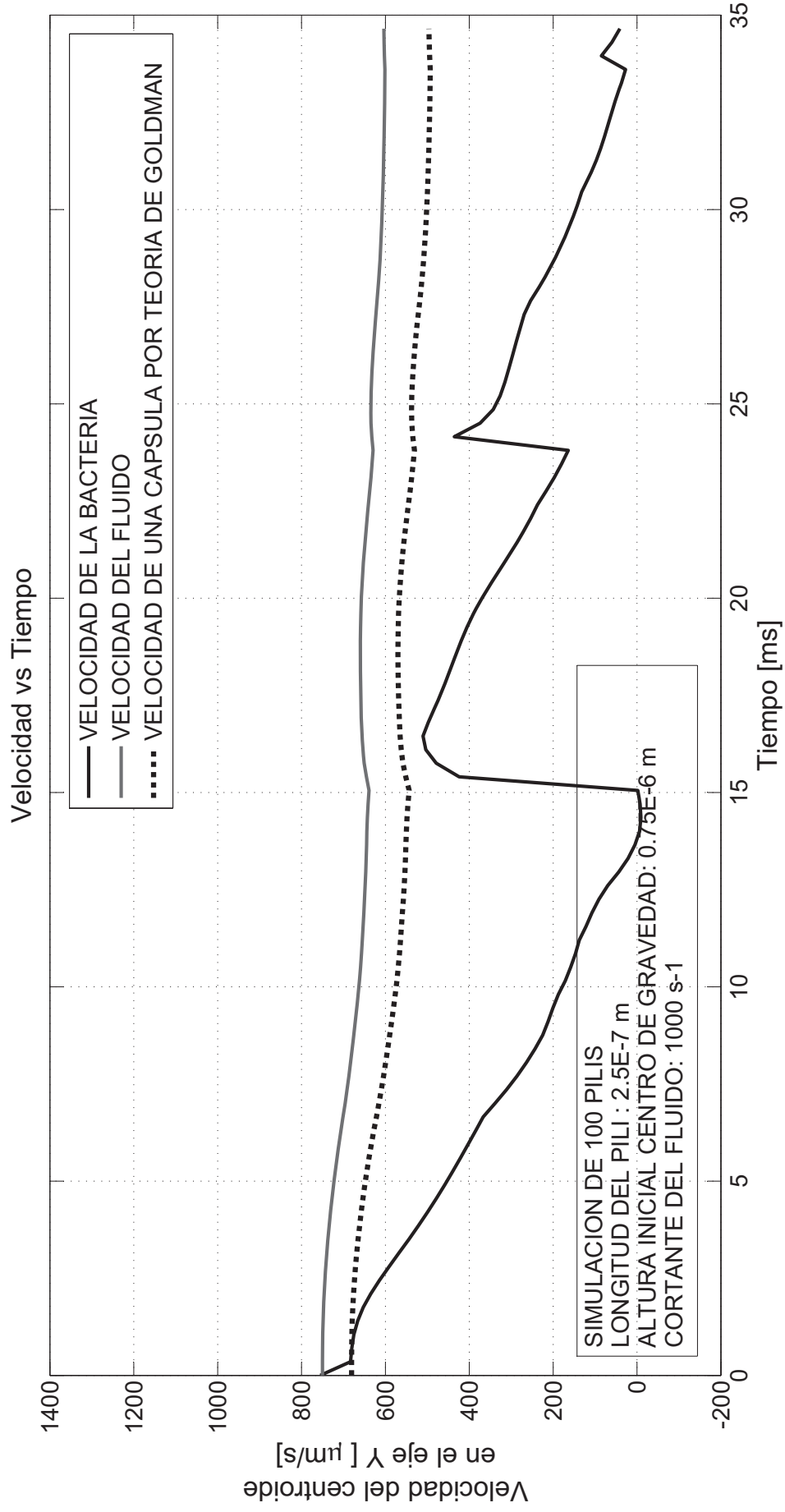


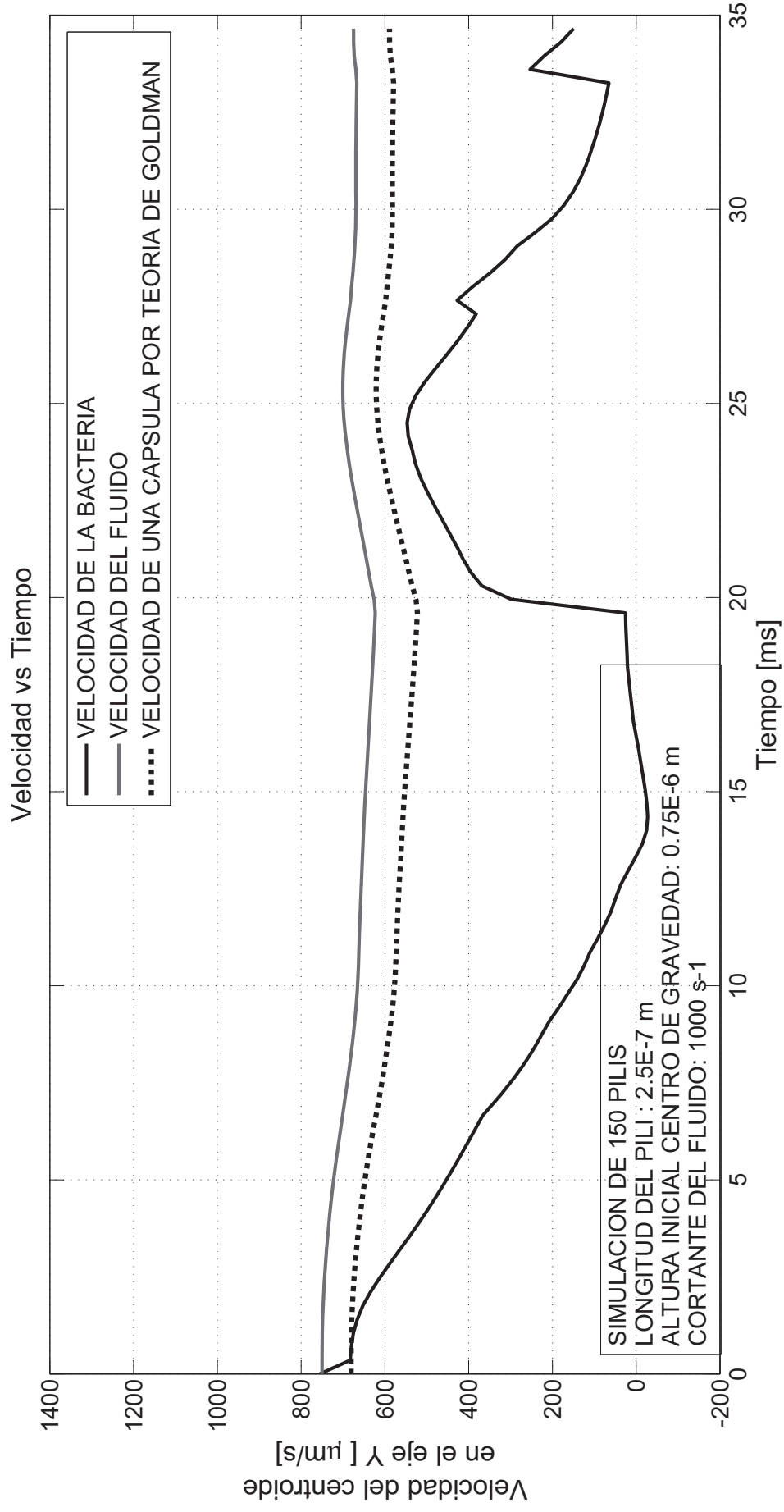


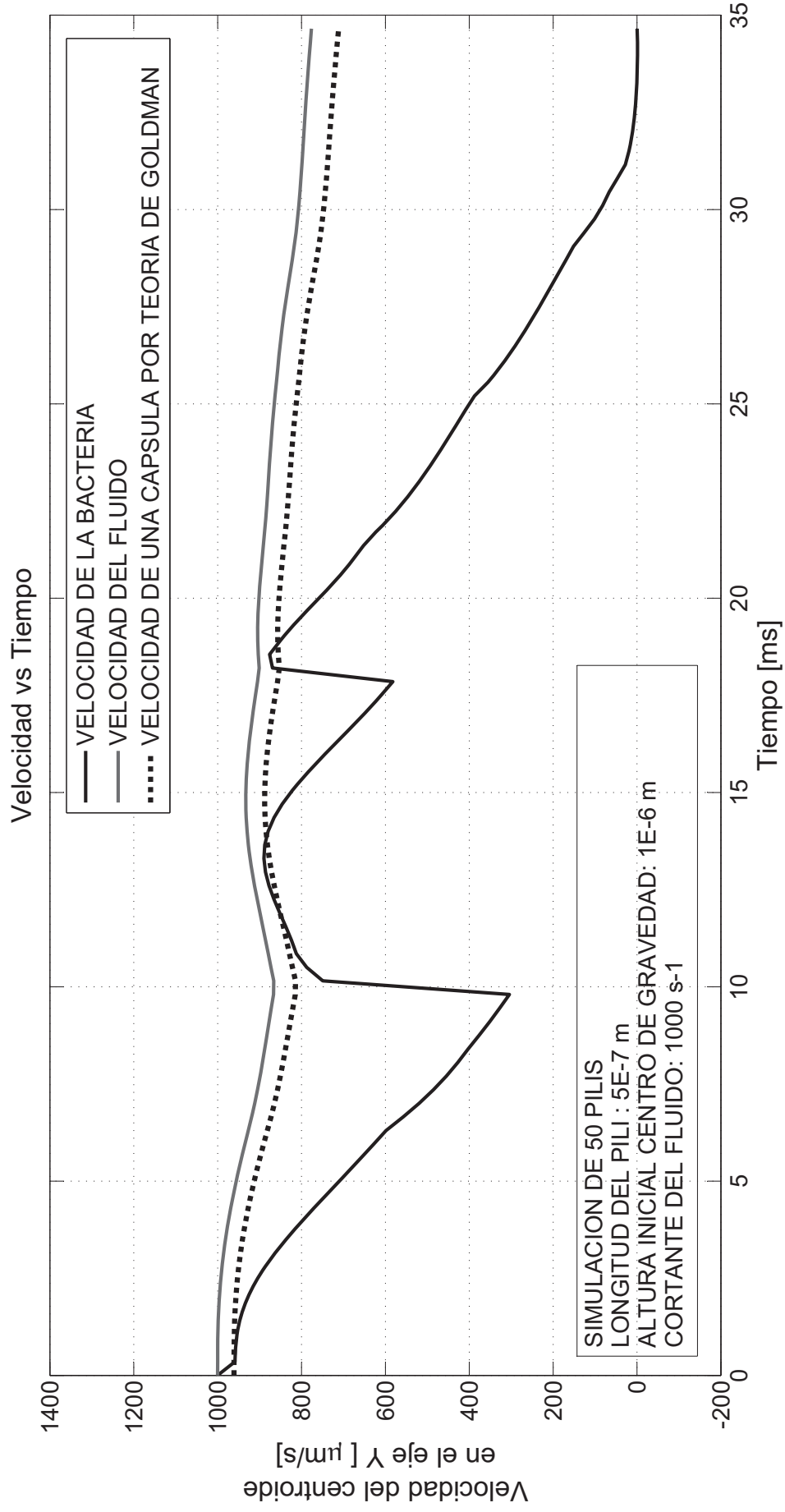


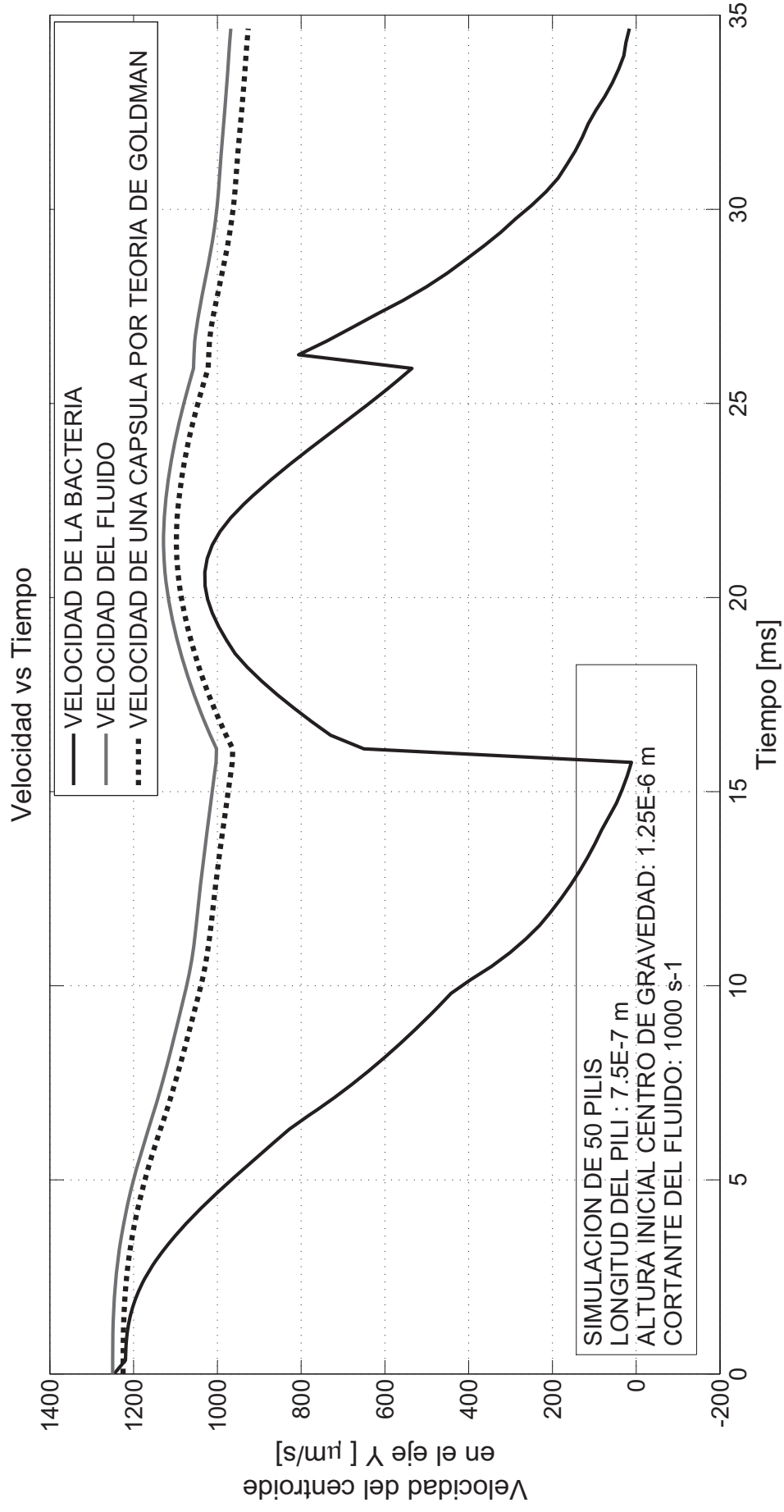


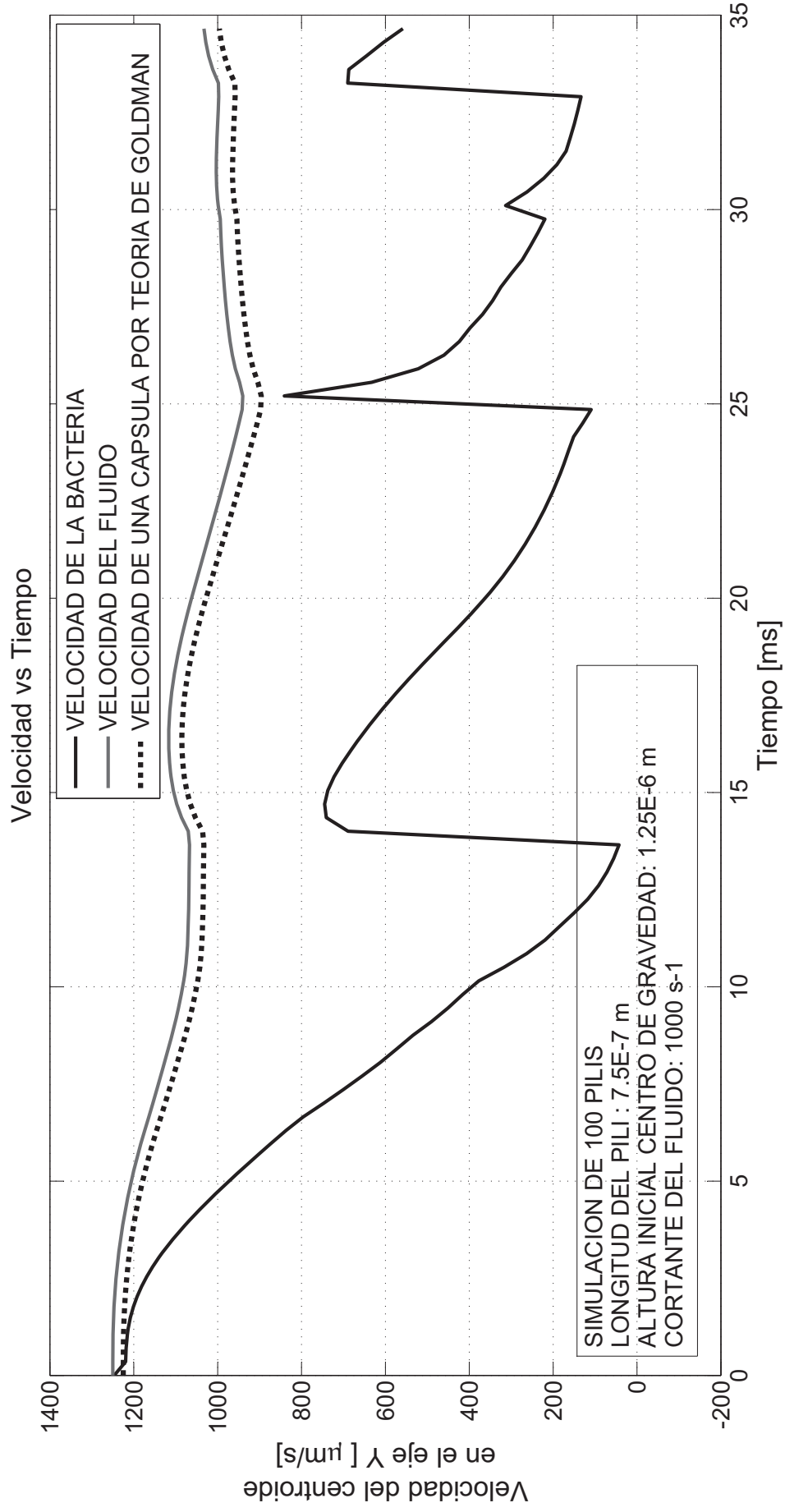


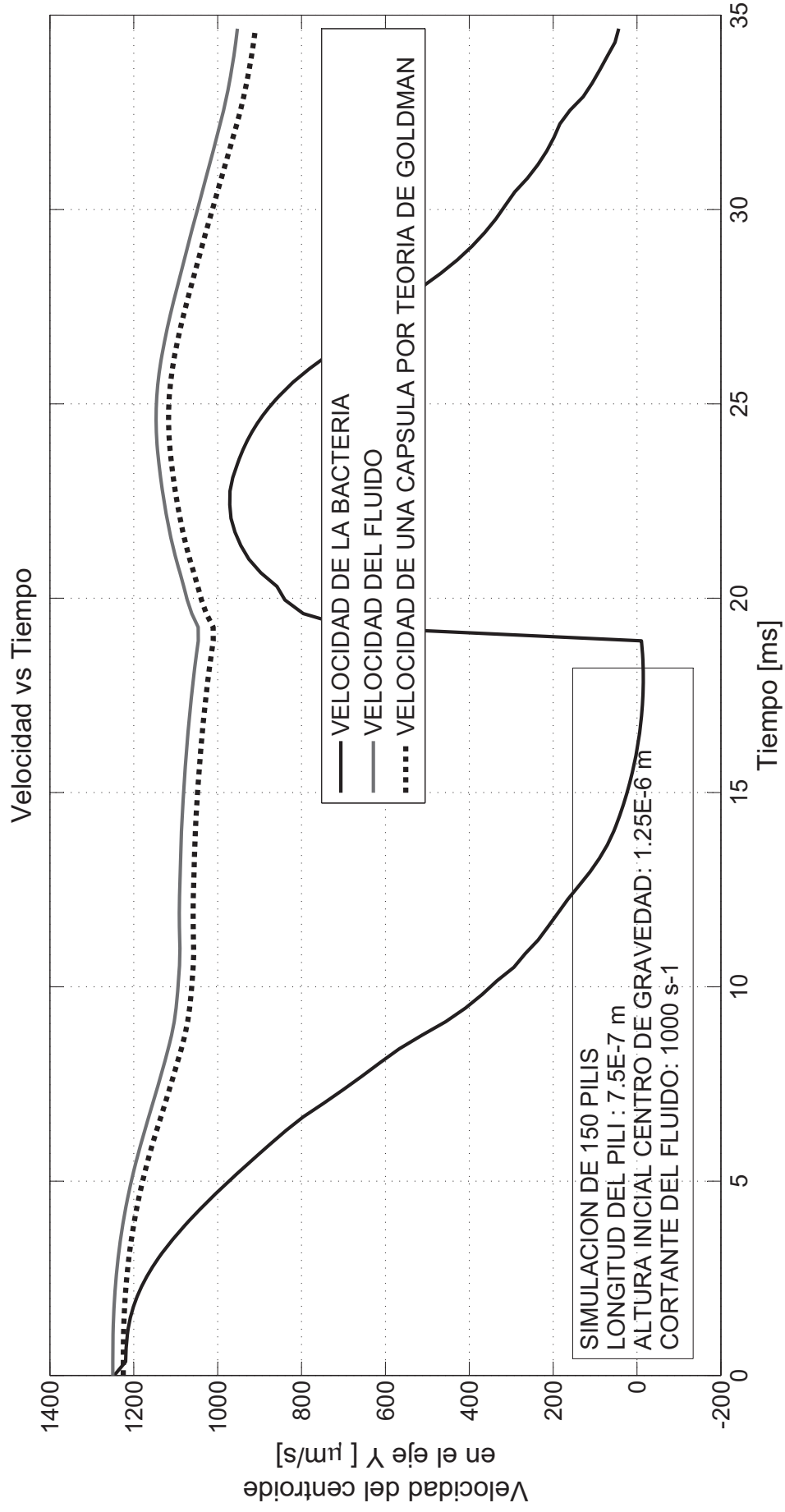












Bibliografía

no es una referencia
académica

- [1] [Escherichia coli, www.slideshare.net/wao2008/escherichia-coli-presentation](http://www.slideshare.net/wao2008/escherichia-coli-presentation).
- [2] Ghose T. Whitfield M. and Thomas W. Shear-stabilized rolling behavior of e. coli examined with simulations. *Biophysical Journal*, 2010.
- [3] Oscar Björnham Axner and Ove. s.l. Catch-bond behavior of bacteria binding by slip bonds. *Biophysical Journal*, 2010.
- [4] S. Schedin . O. Axner. s.l. Fällman, E. A sticky chain model of the elongation and unfolding of escherichia coli p pili under stress. *Biophysical Journal*, 2006.
- [5] S. Schedin . O. Axner. s.l. Fällman, E. Dynamic force spectroscopy of e. coli p pili. *Biophysical Journal*, 2006.
- [6] S. Schedin . O. Axner. s.l. Fällman, E. The unfolding of the p pili quaternary structure by stretching is reversible, not plastic. *EMBO Rep.*, 2005.
- [7] Ove Axner. s.l. Jana Jass, Staffan Schedin. Physical properties of escherichia coli p pili measured by optical tweezers. *Biophysical Journal*, 2004.
- [8] B. E. Uhlin Andersson, M. and E. Fällman. s.l. The biomechanical properties of e. coli pili for urinary tract attachment reflect the host environment. *Biophysical Journal*, 2007.
- [9] A. Sjöström . M. Andersson. s.l. Castelain, M. Unfolding and refolding properties of s pili on extraintestinal pathogenic escherichia coli. *Biophysical Journal*, 2009.
- [10] O. Axner . E. Fällman. s.l. Andersson, M. Physical properties of biopolymers assessed by optical tweezers: analysis of folding and refolding of bacterial pili. *ChemPhysChem*, 2008.
- [11] O. Björnham . M. Andersson. Axner, O. Unraveling the secrets of bacterial adhesion organelles using single molecule force spectroscopy. *Berlin : Springer Verlag*, 2009.
- [12] Gay Guillaume Tellez Gabriel Leidy Chad. Gonzalez M. Andres, Rey S. Ivan. Effect of electrostatic interactions on sedimentation dynamics and deformability of lipid vesicles. 2012.
- [13] M en C. Guadalupe Rodríguez-Angeles. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de escherichia coli. *Salud pública México*, 2002.
- [14] Hultgren S. Oberhauser A. Miller E., Garcia T. The mechanical properties of e. coli type 1 pili measured by atomic force microscopy techniques. *Biophysical Journal*, 2006.

autores en desorden,
mejorar bibliografía

- [15] Sokurenko E.V. Thomas W.E. Vogel V. Forero M., Yakovenko O. Uncoiling mechanics of escherichia coli type i fimbriae are optimized for catch bonds. *PLoS BIOLOGY*, 2006.
- [16] G.I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 1978.
- [17] Konstantopoulos Konstantinos. Jadhav Sammer, Eggleton Charles D. A 3d computational model predicts that cell deformation affects selectin-mediated leukocyte rolling. *Biophysical Journal*, 2005.

