

# DIFUSIÓN DE UN TRAZADOR EN UN ESPACIO BIDIMENSIONAL: MODELO DE DIFUSIÓN DE AGUA EN UNA MEMBRANA BIOLÓGICA

## TRACER DIFFUSION IN A TWO-DIMENSIONAL SPACE: MODEL OF WATER DIFFUSION IN A BIOLOGICAL MEMBRANE

E. A. Perez Leale<sup>1</sup>, P. M. Jacovkis<sup>2</sup> and O. Chara<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de la Licenciatura en Ciencias de la Computación - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) - Universidad de Buenos Aires (UBA)

<sup>2</sup>Departamento de Computación e Instituto del Cálculo - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) - Universidad de Buenos Aires (UBA)

<sup>3</sup>Laboratorio de Biomembranas - Departamento de Fisiología y Biofísica - Facultad de Medicina (FMed) - Universidad de Buenos Aires (UBA)

Paraguay 2155 – (C1121ABG) – Buenos Aires - Argentina  
e-mail: ochara@fmed.uba.ar

En este trabajo se llevaron a cabo simulaciones del transporte de un trazador a través de un espacio bidimensional, simulando un proceso de difusión de agua a través de una membrana biológica. Dos modelos fueron considerados: una membrana fosfolipídica pura y una membrana con proteínas transmembrana. Cada membrana fue simulada mediante una matriz de ocupación en la que cada elemento representa la probabilidad  $p$  de que el sitio correspondiente en la membrana se encuentre libre, permitiendo al trazador pueda pasar por él. En el primer modelo, cada trazador puede moverse y ocupar la posición de cada uno de sus primeros vecinos (con igual probabilidad) dentro de la membrana, mientras que en el segundo modelo, el trazador sólo puede moverse de esta manera si no colisiona con una proteína. Las dimensiones de la mencionada membrana y del trazador así como los tiempos de sus movimientos se establecieron con la intención de emular el fenómeno biológico. En cada simulación un trazador inicia su recorrido en un extremo de la membrana y se cuenta el tiempo que demora en llegar al otro extremo. Las simulaciones se llevaron a cabo mediante un programa escrito en C++. Mediante este programa se calcularon los coeficientes de difusión en la membrana. Este trabajo muestra que sería posible interpretar el transporte de agua a través de una membrana biológica en términos de un simple modelo bidimensional de difusión.

Palabras claves: Difusión de agua, Percolación, Membrana biológica, Simulación, Modelo matemático, Coeficiente de difusión.

In this work simulations of tracer transport through a two-dimensional space were carried on, simulating water diffusion through a biological membrane. Two models were studied: a pure fosfolipidic membrane and a membrane with transmembrane proteins. Every membrane was simulated by means of an occupation matrix in which every element represents the probability  $p$  that the corresponding place on the membrane be free allowing a tracer to cross it. In the first model, each tracer can move to occupy any of the first four neighbor places inside the membrane with the same probability. In the second model, the tracer only can move according to this rule if it does not impact with a protein. The membrane, tracer dimensions and their displacement times were established to emulate a biological membrane. In each simulation a tracer started its journey at the bottom of the membrane and finished it at the top of the membrane allowing counting the time spent on the journey. The simulations were implemented on a program written in C++ allowing the computation of the diffusion coefficient of the membrane. This work shows that it would be possible to interpret the water transport through a biological membrane in terms of a simple two-dimensional diffusive model.

Key words: Water diffusion, Percolation, Biological membrane, Simulation, Mathematical model, Diffusion coefficient.

### I. INTRODUCCIÓN

El transporte de agua a través de la membrana plasmática de una célula ha sido extensamente estudiado experimentalmente <sup>(1,2)</sup> así como mediante simulaciones llevadas a cabo, por ejemplo, mediante dinámica molecular <sup>(3)</sup>. En este trabajo se llevó a cabo un estudio mediante simulaciones numéricas con el objeto de abordar la problemática experimental arriba

señalada: es decir, se estudió el fenómeno de difusión de un trazador a través de un espacio bidimensional con el objeto de simular el fenómeno de difusión de agua a través de la membrana plasmática de una célula. Para ello se llevaron a cabo dos clases de simulaciones que denominaremos F y F + P. En estas se estudió el comportamiento de un trazador, o bien en una superficie homogénea - imitando una membrana fosfolipídica pura

\* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

(F) -, o bien en una superficie heterogénea, emulando una membrana con una determinada proporción (25%) de su área (estimada en nuestra simulación bidimensional mediante la longitud mayor de la membrana) ocupada por proteínas transmembrana (F + P) -.

La membrana está distribuida en forma de cuadrícula y cada celda de la misma representa una parte de una molécula fosfolipídica o proteica (o de ninguna de las dos). El movimiento del trazador dentro de la membrana está sujeto a reglas muy simples: en cada intervalo de tiempo (paso de la simulación) el trazador puede acceder a cualquiera de sus 4 primeros vecinos con igual probabilidad (0,25) en la simulación F y semejantemente en la simulación F + P con la salvedad de que aquí, cada vez que se encuentra con una proteína, sufre un choque elástico. De este modo, el trazador “decide” a qué posición contigua se podrá trasladar (cada una de esas posiciones tiene igual probabilidad 0,25), y podrá trasladarse a esa posición con probabilidad  $p$  (donde  $p$  es la probabilidad de que el sitio de destino esté libre). En cada simulación, la celda en la que se ubique el trazador tendrá una probabilidad  $p$  definida, excepto que esta celda se encuentre dentro del espacio asignado a una proteína, en cuyo caso  $p = 0$ . Como se ve, cada trazador sufre una caminata al azar en dos ambientes diferentes, según cual sea la simulación.

En este trabajo se calculó la fracción de trazadores, simulando moléculas de agua, que atravesaron la membrana respecto de las totales ( $f$ ) así como el coeficiente de difusión perpendicular a la membrana ( $D_p$ ) en función de la probabilidad  $p$  de pasaje a través de cualquier posición de la misma.

## II. MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos clases de simulaciones, la Simulación F y la Simulación F + P:

### Simulación F:

Se simuló una membrana bidimensional fosfolipídica (ver Figura 1A) mediante una matriz que denominaremos matriz de ocupación ( $O$ ). Cada celda de  $O$  representa la probabilidad  $p$  de que un determinado lugar de la membrana esté libre u ocupado por un fosfolípido. De este modo, cuando un trazador arriba a dicha posición puede ocuparla con probabilidad  $p$ . Cada celda de la matriz emula un suceso que acaece en el área ocupada por una molécula de agua (estimada como el cuadrado de 0,3 nm). La matriz  $O$  es una  $O^{30 \times 1000}$ , representando el espesor real de una membrana plasmática y el 10% del ancho luminal (o basal) de una célula epitelial.

### Simulación F + P:

Se simuló una membrana fosfolipídica con un 25% de su área ocupada con proteínas (ver Figura 1B). Las proteínas se simularon mediante 83 pequeñas matrices  $P_i^{30 \times 3}$  uniformemente distribuidas ( $1 \leq i \leq 83$ ) a lo largo de las 1000 posiciones que conforman el ancho luminal arriba especificado. Como ya dijéramos, cada celda que pertenece a las matrices  $P_i$  tiene una probabilidad  $p = 0$ , con lo que el agua no puede atravesar la región del espacio correspondiente. Mediante estas matrices se compone una matriz  $P$  conformada por regiones de ceros y regiones ocupadas por las pequeñas matrices  $P_i$ . La membrana resulta simulada, entonces por la matriz  $O + P$ .

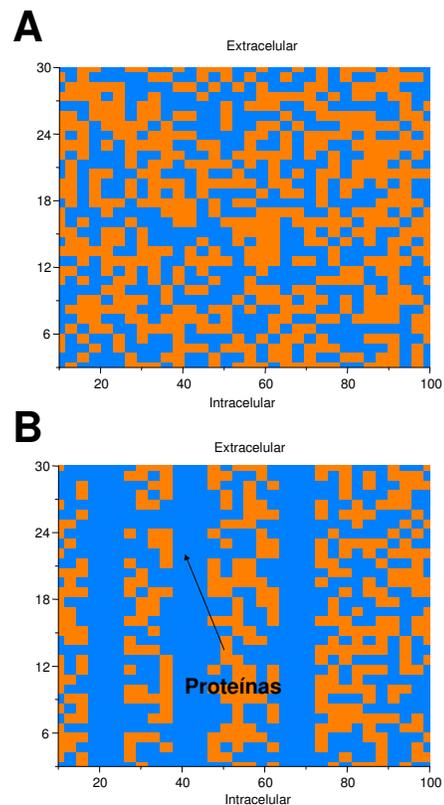


Figura 1. En A se muestra una región de la matriz de Ocupación  $O$ . Cada celda representa la probabilidad  $p$  de que la membrana esté libre (en naranja) u ocupada (en azul) por una parte de un fosfolípido. En B puede verse la matriz resultante  $O + P$ . Se señalan las proteínas transmembrana.

### Programa:

Este trabajo se llevó a cabo mediante un programa implementado en C++, utilizando el entorno de desarrollo Visual C++ 6.0. El programa emplea un generador de números pseudo-aleatorios (que genera una distribución uniforme  $Un[0;1]$ ) para definir la ocupación de los elementos de la matriz  $O$  según la probabilidad  $p$ , así como los movimientos de la molécula simulada en la membrana. Los resultados generados por este programa fueron procesados en una

base de datos de SQL Server (Microsoft) para su ulterior análisis.

Durante cada corrida el programa suelta (de a una por vez) 100 trazadores desde cada una de las 1000 posiciones de la base de la membrana y se cuenta el número de pasos hasta que arriba al otro extremo de la membrana. Cada trazador tiene una probabilidad de 0,25 de ir hacia cualquiera de sus 4 primeros vecinos. Cada intervalo de tiempo (el paso de la simulación) se obtuvo a partir de coeficientes de difusión experimentales de agua en agua, asumiendo que la menor distancia que una molécula de agua puede cubrir es su propio diámetro (asumiéndola una esfera rígida). Para cada probabilidad  $p$  se simularon 100 membranas diferentes; de este modo, cada probabilidad emplea 100 moléculas x 1000 posiciones x 100 membranas =  $10^7$  seguimientos. Con el objeto de comprobar la calidad del generador de números pseudo-aleatorios empleado se llevó a cabo un test de chi-cuadrado, el cual demostró su correcto funcionamiento.

El coeficiente de difusión perpendicular a la membrana ( $D_p$ ) se calculó según la fórmula  $D_p = \frac{L^2}{x \cdot \Delta t}$ ,

donde  $L$  es el espesor de la membrana simulada (expresado como el número de filas de la matriz  $O$  multiplicada por el espesor de la distancia que representa cada fila (el diámetro de una molécula de agua),  $x$  el número de pasos dados por la molécula de agua dentro de la membrana y  $\Delta t$  es el tiempo que demora la transición de una posición, representada por una celda de la matriz de ocupación, a otra posición, representada por una celda contigua, en la matriz mencionada. En virtud de la mencionado más arriba, la distancia entre dos posiciones contiguas en la matriz correspondería a una distancia, en el espacio de la membrana, igual al diámetro de una molécula de agua, suponiéndola una esfera rígida ( $\sim 0,3$  nm). En este modelo se supuso que la demora  $\Delta t$  dentro de la membrana sería la misma que tendría lugar fuera de ella. De este modo, la diferencia entre los coeficientes de difusión en la membrana y en agua libre se debería al distinto número de pasos cubiertos durante la caminata al azar ( $x$ ). Entonces,  $\Delta t$  se estimó a partir del coeficiente de difusión en agua libre experimental <sup>(4)</sup>.

En primer lugar se calculó el promedio de  $D_p$  por posición de la membrana (para una dada membrana de una determinada probabilidad). A continuación se calculó el promedio y desvío standard por membrana (para una determinada probabilidad). A partir de este último se obtuvo el error standard de la media del coeficiente de difusión perpendicular a la membrana

( $ESM-D_p$ ) mediante  $ESM - D_p = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  donde  $\sigma$  es el desvío standard de  $D_p$  y  $n$  el número de resultados.

### III. RESULTADOS

En una primera parte del trabajo se estudió el transporte de un trazador a través de la membrana simulada mediante un parámetro  $f$ , la fracción de moléculas que atravesaron la membrana respecto de las totales, en función de la probabilidad  $p$  de las matrices de ocupación simulando las membranas fosfolipídicas en ausencia y en presencia de proteínas transmembrana (ver Figura 2). Este parámetro mostró que la mínima probabilidad a partir de la cual el transporte de agua tiene lugar es  $p = 1/2$ .

En una segunda parte del trabajo se calculó el coeficiente de difusión perpendicular a la membrana ( $D_p$ ) en función de la probabilidad  $p$  de las matrices, simulando las membranas fosfolipídicas en ausencia y en presencia de proteínas transmembrana (ver Figura 3).

Se evaluó la dispersión de  $D_p$  en función de la posición de la membrana mediante el error standard de la media ( $ESM-D_p$ ) (ver Figura 4 A y B).

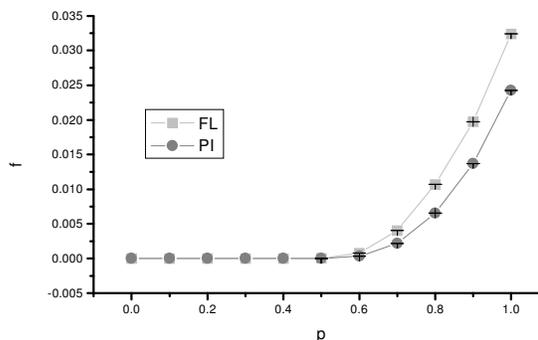


Figura 2. Se muestra  $f$ , la fracción de moléculas que atraviesan la membrana, en función de la probabilidad  $p$  de las matrices de ocupación  $O$  y  $O + P$ , en las simulaciones  $F$  y  $F + P$ , respectivamente (ver texto).

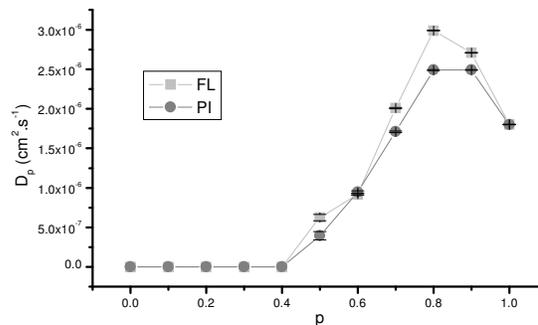


Figura 3. En A se muestra el coeficiente de difusión ( $D_p$ ) en función de la probabilidad  $p$  de las matrices de ocupación  $O$  y  $O + P$ , en las simulaciones  $F$  y  $F + P$ , respectivamente (ver texto).

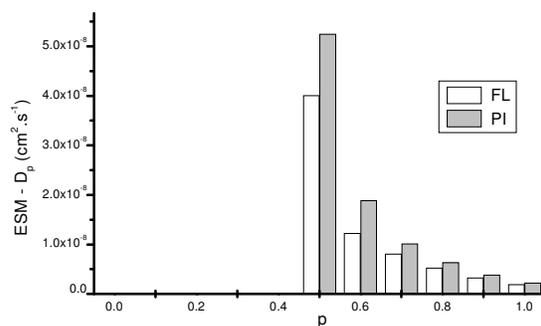


Figura 4. Se muestra el error standard de la media del coeficiente de difusión ( $ESM-D_p$ ) en función de la probabilidad  $p$  de las matrices de ocupación  $O$  y  $O + P$ , en las simulaciones  $F$  y  $F + P$ , respectivamente (ver texto).

#### IV. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que  $f$  crece con  $p$  (ver Figura 2), siendo mayor en las simulaciones de membranas fosfolipídicas que en las proteicas, como es de esperar. Por otro lado, sorprendentemente,  $D_p$  en función de  $p$  tiene un máximo (ver Figura 3). Este resultado puede explicarse de la siguiente manera. A valores bajos de  $p$ , la probabilidad de que cada molécula de agua ocupe una posición de la membrana es pequeña, logrando que la difusión en la misma sea difícil y que, por lo tanto,  $D_p$  sea bajo. Conforme  $p$  se incrementa, la probabilidad de que un trazador pueda ocupar alguna posición en la membrana es razonable y, por lo tanto, la difusión a través de esta se incrementa, calculándose un  $D_p$  alto. Sin embargo, a valores muy altos de  $p$ , la probabilidad de que un trazador ocupe alguna posición de la membrana es tan alta que el tiempo que demora la molécula dentro de la membrana es grande. De este modo, la membrana se transforma en una suerte de trampa cinética que genera cierta retención de la molécula en ella, determinando un  $D_p$  menor que el anterior. El máximo de  $D_p$  vs  $p$  es mayor en las membranas de fosfolípidos que en las de proteínas. Este hecho puede comprenderse en términos de la menor proporción, en este último caso, de sitios libres para el paso del trazador. El máximo se encuentra, por otro lado, en valores de  $p$  menores para la simulación de la membrana fosfolipídica que para el caso de proteínas. Esto puede explicarse aduciendo que es preciso que la probabilidad de cualquier posición de la membrana sea mayor en el segundo caso comparado con el primero para que la máxima difusión tenga lugar. Interesantemente, las distribuciones de  $D_p$  versus la posición en la membrana manifestaron una dispersión decreciente con  $p$  (ver Figura 4). Este resultado es explicable de la siguiente manera: cuanto más apartado esté  $p$  de  $1/2$ , más probable es que dos posiciones consecutivas de un trazador dentro de la membrana se encuentren en el mismo estado (ocupada o libre). Cuando  $p - 1/2$  es positivo, las dos posiciones consecutivas estarán probablemente libres y el trazador

se moverá en un ambiente más homogéneo, obteniéndose coeficientes de difusión con baja dispersión. Cuando  $p - 1/2$  es negativo, las dos posiciones consecutivas estarán probablemente ocupadas y el trazador se moverá en un ambiente más homogéneo: de hecho, obviamente, no se moverá, con lo que no será posible medirlo. Cuanto más cercano a cero sea  $p - 1/2$ , las dos posiciones consecutivas estarán libres u ocupadas con la misma probabilidad y el trazador se moverá en un ambiente menos homogéneo, obteniéndose coeficientes de difusión con mayor dispersión.

Dada la similitud entre el modelo aquí presentado y una percolación de sitios, cabe preguntarse si es este un modelo de percolación<sup>(5)</sup>. Sin embargo, en una percolación de sitios la denominada probabilidad crítica es  $p_c = 0,593...$ <sup>(5)</sup>, mientras que en nuestro modelo a  $p = 0,5$  los trazadores ya atraviesan la membrana. Esto puede explicarse considerando que nuestras matrices (tanto  $O$  como  $O + P$ ) son de  $30 \times 1000$ . De este modo, el número de filas probablemente sea muy pequeño para que el proceso aquí estudiado pueda ser considerado una percolación. En efecto, llevando a cabo estas simulaciones en matrices de  $1000 \times 1000$  (datos no mostrados) puede verse que la mínima probabilidad para que el transporte de trazadores tenga lugar es aproximadamente el valor crítico  $0,593...$ , o sea para el valor  $1000$  el proceso podría considerarse como una percolación. De todas formas, nuestro proceso no puede ser caracterizado por una matriz cuyo número de filas sea muy superior al empleado, ya que este es el orden del número de moléculas de agua que caben en el espesor de una membrana biológica. Por esta razón, este modelo no puede ser considerado un modelo de percolación.

Cabe ahora formular la siguiente pregunta: tiene este modelo alguna relación con el fenómeno real caracterizado por una molécula de agua atravesando una dada membrana? Ya han sido simuladas moléculas más complejas que el agua difundiendo por una membrana plasmática mediante modelos similares a este – aunque en una dirección paralela a la membrana –<sup>(6)</sup>. Por otro lado, los órdenes de magnitud para coeficientes de difusión calculados<sup>1</sup> a partir de medidas de permeabilidad difusional efectuadas en membranas artificiales<sup>(7)</sup>, así como los calculados a partir de permeabilidad osmótica en células renales<sup>(8)</sup> coinciden con el coeficiente por nosotros simulado con  $p = 0,5$ . Nuestros resultados mostraron que, a esa misma probabilidad, el coeficiente de difusión fue menor, en presencia de proteínas (simulaciones  $F + P$ ) que en ausencia de ellas (simulaciones  $F$ ). Con el objeto de comprender estos resultados es menester contemplar lo siguiente. Las proteínas transmembrana son estructuras que pueden, en principio, dividirse en dos clases<sup>(9)</sup>. I) Por un lado, existen proteínas que conforman un canal

<sup>1</sup> Asumiendo coeficientes de partición de un orden razonable ( $10^{-3}$ ).

por el cual el agua puede pasar. Dentro de esta clase, algunas son lo suficientemente grandes como para dejar pasar iones (además de agua) y se denominan canales iónicos. En 1991 se descubrió otra clase de proteínas que sólo permiten pasar agua, exclusivamente<sup>2</sup>: las acuaporinas<sup>(10)</sup>. II) Por otro lado, existen proteínas que no conforman canales. La proporción relativa entre las proteínas que conforman canales y las que no lo hacen es muy variable entre los distintos tipos celulares<sup>(9)</sup>. Algunas células, pueden, de hecho, cambiar esta proporción relativa en el curso de su vida<sup>(11,12)</sup>. Por otro lado, es también posible incrementar artificialmente esta proporción mediante procedimientos bioquímicos (transfección, por ejemplo<sup>(9)</sup>). Claramente, en este trabajo se han simulado proteínas no formadoras de canales, siendo, por lo tanto, nuestros resultados razonables para explicar el transporte de agua en membranas ricas en este tipo de proteínas. Nuestro modelo predice la caída en la permeabilidad al agua (magnitud proporcional al coeficiente de difusión) debido al aumento de proteínas que no conforman canales, hecho que ha sido observado experimentalmente<sup>(13)</sup>.

El modelo aquí estudiado es sumamente simple, tanto desde el punto de vista teórico como computacional. A pesar de ello, reproduce órdenes de magnitud de coeficientes relevantes del transporte de agua a través de membranas. De este modo, este modelo podría considerarse para estudiar procesos vinculados con la biofísica del movimiento de agua celular.

## V. REFERENCIAS

- 1 - Finkelstein, A. "Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes - Theory and reality", John Wiley & Sons. New York (1987).
- 2 - Capurro, C., E. Escobar, C. Ibarra, M. Porta and M. Parisi. "Water permeability in different epithelial barriers", *Biol. Cell*, 66, 145-148 (1989).
- 3 - Egberts, E., S.J. Marrink and H.J. Berendsen. "Molecular dynamics simulation of a phospholipid membrane", *Eur. Biophys. J.*, 22, 423-36 (1994).
- 4 - Wang, J., Robinson, C. and Edelman, E. "Self-diffusion and structure of liquid water. III. Measurements of the self-diffusion of liquid water with H<sup>2</sup>, H<sup>3</sup> and O<sup>18</sup> as tracers". *J Amer Chem Soc* 75:766 (1953).
- 5 - Stauffer, D. and A. Aharony. "Introduction to Percolation Theory", 2nd ed. Taylor & Francis. London (1992).
- 6 - Saxton, M. "Lateral diffusion in an archipelago" *Biophys. J.* 52, 989-997 (1987).
- 7 - Finkelstein, A. "Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes", *J. Gen. Physiol.*, 68, 127-135 (1976).

<sup>2</sup> Por este descubrimiento se le otorgó el Premio Nobel de Química a Peter Agre en 2003.

- 8 - Chara, O., Ford, P., Rivarola, V., Parisi, M. and Capurro, C. "Asymmetry in the osmotic response of a rat cortical collecting duct cell line: role of aquaporin-2", *J. Membr. Biol.*, 207, 143-150 (2005).
- 9 - Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. "Molecular Biology of the cell", Fourth Edition. Garland Science. Taylor & Francis. London (2002).
- 10 - Preston, G., Carroll, T., Guggino, W. and Agre, P. "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein" *Science*. 256:385-387 (1992).
- 11 - Knepper, M. and Inoue, T. "Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin" *Curr Opin Cell Biol.* 9:560-564 (1997).
- 12 - Brown, D. "The ins and outs of aquaporin-2 trafficking" *Am J Physiol Renal Physiol.* 284:F893-F901 (2003).
- 13 - Hu, P., S. Meyers, F.X. Liang, F.M. Deng, B. Kachar, M.L. Zeidel and T.T. Sun. "Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability", *Am. J. Physiol., Renal Physiol.* 283, F1200-F1207 (2002).

## VI. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Lic. M. Ozu por su valiosa colaboración.