

## Práctico 4

### POTENCIAL DE MEMBRANA

*Sección Biofísica*

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República*

#### **Objetivo**

Evaluar y registrar los cambios en el Potencial de Membrana (PM) de células de endotelio de córnea bovina, generados por la adición de diversos agentes al medio, mediante el análisis de imágenes fotográficas de estas células, presentando posteriormente una posible explicación de los resultados obtenidos.

#### **Actividades a realizar**

El docente le suministrará tres secuencias de imágenes fotográficas de monocapas confluentes de células de endotelio de córnea bovina, las cuales fueron cultivadas en láminas de vidrio. Cada una de estas secuencias refleja los resultados obtenidos como consecuencia de la exposición de estas células ante agentes específicos. Mediante el uso de un programa computacional (GIMP o Adobe Photoshop) se realizará el análisis de las imágenes suministradas, registrándose los cambios en el PM según la **variación en la intensidad de la fluorescencia** de las células (cambios en la intensidad del **color rojo** que estas imágenes presentan en las sucesivas tomas) (ver “**Cambios en el Potencial de Membrana**” más abajo). Los cambios relativos al color rojo serán cuantificados mediante el uso de la opción Histograma del software GIMP o Adobe Photoshop. **Se graficará para cada secuencia de imágenes fotográficas, la intensidad de la fluorescencia versus el tiempo.**

El estudiante deberá desarrollar una posible explicación a los resultados obtenidos.

#### **Secuencia de Imágenes**

En la Primera Secuencia de Imágenes (SERIE 1, ver “**TABLAS**”), al Medio de Cultivo (MC) se le agrega, a un tiempo específico, una cierta concentración de Gramicidina D, y posteriormente se efectúan tomas fotográficas, del mismo campo, a sucesivos intervalos de tiempo.

En la Segunda Secuencia (SERIE 2, ver “**TABLAS**”), se sustituye, a un determinado tiempo, el Cloruro de Sodio Extracelular (presente en el MC), por Gluconato de Potasio; se realizan tomas fotográficas de este campo a sucesivos intervalos de tiempo, y en un determinado momento se extrae el Gluconato de

Potasio, y se lo sustituye por Cloruro de Sodio, realizándose posteriormente una nueva toma.

Finalmente, en la Tercera Secuencia (SERIE 3, ver “**TABLAS**”), al MC se le agrega, también a un determinado tiempo, Gramicidina D, realizándose a continuación sucesivas tomas fotográficas del mismo campo. Luego, en un determinado momento, se sustituye el Cloruro de Sodio existente en el medio por Cloruro de Colina (la Colina es un catión no difusible), y se efectúa una nueva toma.

### **TABLAS**

#### **SERIE 1**

<b>FIGURA</b>	<b>TIEMPO (en minutos)</b>	<b>EXPERIMENTO</b>
S1-1	0	MC
S1-2	5	MC + Gramicidina D
S1-3	8	
S1-4	18	
S1-5	28	
S1-6	38	

#### **SERIE 2**

<b>FIGURA</b>	<b>TIEMPO (en minutos)</b>	<b>EXPERIMENTO</b>
S2-1	0	MC
S2-2	5	Gluconato de K <sup>+</sup> (por Cloruro de Na <sup>+</sup> )
S2-3	8	
S2-4	11	
S2-5	16	
S2-6	26	MC
S2-7	34	

**SERIE 3**

<b>FIGURA</b>	<b>TIEMPO (en minutos)</b>	<b>EXPERIMENTO</b>
S3-1	0	MC
S3-2	5	MC + Gramicidina D
S3-3	8	
S3-4	18	
S3-5	28	MC con Cloruro de Colina (por Cloruro de Na <sup>+</sup> )
S3-6	38	

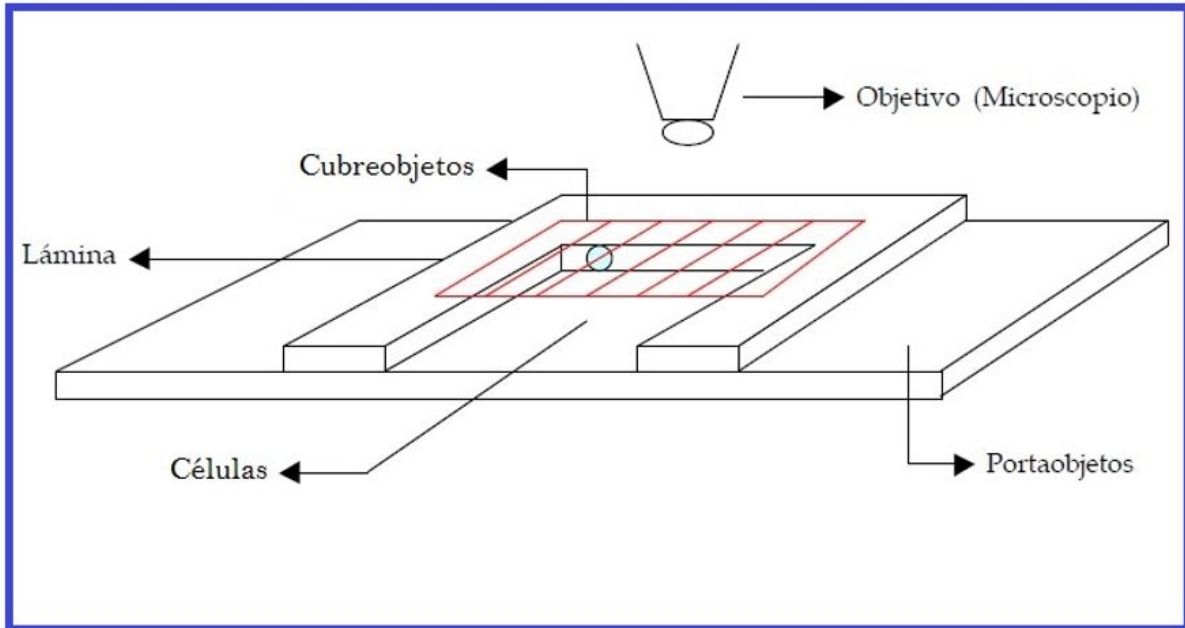
**Cambios en el Potencial de Membrana<sup>1</sup>**

Monocapas confluentes de células de endotelio de córnea (extraídas de cultivos celulares cuidadosamente preparados) se colocan, mediante procedimientos adecuados, sobre cámaras especialmente diseñadas para el trabajo experimental (ver **Figura 1**).

Estos preparados son observados y fotografiados bajo un microscopio de fluorescencia a intervalos de tiempo específicos, mientras son sometidos a diferentes agentes modificadores del PM. Los cambios relativos en el PM se monitorean a través de la observación de los cambios en la fluorescencia de los preparados. Dichos preparados se precargan con un colorante aniónico llamado oxonol-V (bis-(3-phenyl-5-oxoisoxazol-4-yl) pentamethine oxonol), durante un período de tiempo de aproximadamente una hora, con anterioridad a ser tratados con los diversos agentes modificadores del PM.

---

<sup>1</sup> (Los materiales y métodos utilizados en el práctico son de S. Chifflet, J. A. Hernández, S. Grasso y A. Cirillo. *Experimental Cell Research* **282**, 1-13, 2003).



**Figura 1:** Esquema del dispositivo experimental para obtener las imágenes de los preparados celulares.

<b>Fórmula Molecular:</b>	$C_{23}H_{16}N_2O_4$
<b>Masa Molecular:</b>	384,39 g/mol

**Figura 2:** Oxonol-V (bis-(3-fenil-5-oxisoxazol-4-yl) pentametileno oxonol) es miembro de una familia de compuestos que se caracterizan por particionarse entre el medio extracelular y el medio intracelular (organelos citoplasmáticos) de una forma dependiente del PM, obedeciendo a la ecuación de Nernst. Un incremento en la intensidad de la fluorescencia (en nuestras imágenes, aumento en la intensidad del color rojo) corresponde a un aumento en la despolarización de la membrana plasmática.