

Potencial de Membrana

Ismael Acosta
(iacosta@fcien.edu.uy)
Facultad de Ciencias, UdelaR

Contenido de la clase

- (Breve) Introducción teórica.
- Análisis de datos.

Contenido de la clase

- **(Breve) Introducción teórica.**
- Análisis de datos.

Electrodifusión

La **electrodifusión** es el proceso de transporte pasivo de moléculas en función tanto de su gradiente de concentración (químico) como de su gradiente eléctrico. El flujo electroquímico de un soluto iónico está dado por la suma de los flujos eléctrico y químico, de acuerdo con la **ecuación de Nerst-Planck**:

$$J = -uRT \frac{dC}{dx} - zFuC \frac{dV}{dx}$$

$$J = -uRT \frac{dC}{dx} - zFuC \frac{dV}{dx}$$

Donde:

$J \equiv$ *flujo*

$u \equiv$ *movilidad del ión*

$R \equiv$ *constante universal de los gases* ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

$T \equiv$ *temperatura absoluta* (K)

$\frac{dC}{dx} \equiv$ *cambio de concentración en el espacio*

$$J = -uRT \frac{dC}{dx} - zFuC \frac{dV}{dx}$$

Donde:

$F \equiv$ constante de Faraday = $N_A(e^-) = 96458 \text{ C mol}^{-1}$

$z \equiv$ Valencia del ión (Ej.: $z_{K^+} = z_{Na^+} = -z_{Cl^-} = 1$)

$C \equiv$ concentración del ión

$\frac{dV}{dx} \equiv$ variación del potencial eléctrico en el espacio

A partir de la Ecuación de Nerst-Planck, es posible obtener el **Potencial Electroquímico** μ_x de una especie iónica:

$$\mu_x = \mu_0 + RT \ln(C_x) + z_x F \psi_x$$

Donde:

$\mu_x \equiv$ *potencial electroquímico de la especie x*

$\mu_0 \equiv$ *potencial electroquímico estándar*

$\psi_x \equiv$ *potencial eléctrico de la especie x*

$$\mu_x = \mu_0 + RT \ln(C_x) + z_x F \psi_x$$

Notar que el sumando $RT \ln(C_x)$ corresponde al **potencial químico**, mientras que el sumando $z_x F \psi_x$ corresponde al **potencial eléctrico** de la especie iónica.

En particular, nos interesa conocer qué ocurre con el potencial electroquímico de algún ion entre los compartimentos intracelular y extracelular cuando se está en equilibrio.

En el equilibrio,

$$\mu_{intracelular} \equiv \mu_i$$

$$\mu_{extracelular} \equiv \mu_e$$

$$\mu_i = \mu_e$$

$$\mu_0 + RT \ln(C_i) + zF\psi_i = \mu_0 + RT \ln(C_e) + zF\psi_e$$

$$RT \ln(C_i) + zF\psi_i = RT \ln(C_e) + zF\psi_e$$

$$zF\psi_i - zF\psi_e = RT \ln(C_e) - RT \ln(C_i)$$

$$zF\psi_i - zF\psi_e = RT \ln(C_e) - RT \ln(C_i)$$

$$zF(\psi_i - \psi_e) = RT[\ln(C_e) - \ln(C_i)]$$

$$zF\Delta\psi = RT \ln\left(\frac{C_e}{C_i}\right)$$

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{C_e}{C_i}\right)$$

Potencial Eléctrico
en el Equilibrio -
Ecuación de Nerst

En **condiciones fisiológicas** (células animales),

$$[Na^+]_e \gg [Na^+]_i$$

$$[K^+]_e \ll [K^+]_i$$

$$[Cl^-]_e \gg [Cl^-]_i$$

Otros iones pueden afectar el potencial eléctrico de la membrana plasmática. Muchos de ellos no pueden atravesar la membrana (permeabilidad nula), como los **proteínatos** (proteínas cargadas negativamente).

Factores que afectan el potencial de la membrana plasmática de las células:

- 1) Difusión pasiva electrogénica de iones (**¡principal!**).
- 2) Condiciones estructurales de la membrana plasmática.
- 3) Bomba de $Na^+ - K^+$ ATPasa, canales iónicos, transportadores.
- 4) Metabolitos intermediarios electrolíticos.

En el equilibrio, la suma vectorial de todos los flujos de todas las especies iónicas debe ser 0. En otras palabras, **la corriente neta de iones debe ser nula (Condición de Electroneutralidad)**.

$$I_{neta} = \sum_{i=1}^n z_i F \vec{J}_i = 0$$

¿Por qué el Flujo es un vector?

Esta sumatoria debe contemplar no solamente las **contribuciones pasivas** (electrodifusión) sino también los **transportes electroquímicos activos** (como el que realiza la Bomba $Na^+ - K^+$ ATPasa).

Por lo tanto,

$$I_{neta} = z_{K^+} F J_{K^+} + z_{Na^+} F J_{Na^+} + \dots + z_{K^+} F \varphi_{K^+} + z_{Na^+} F \varphi_{Na^+} = 0$$

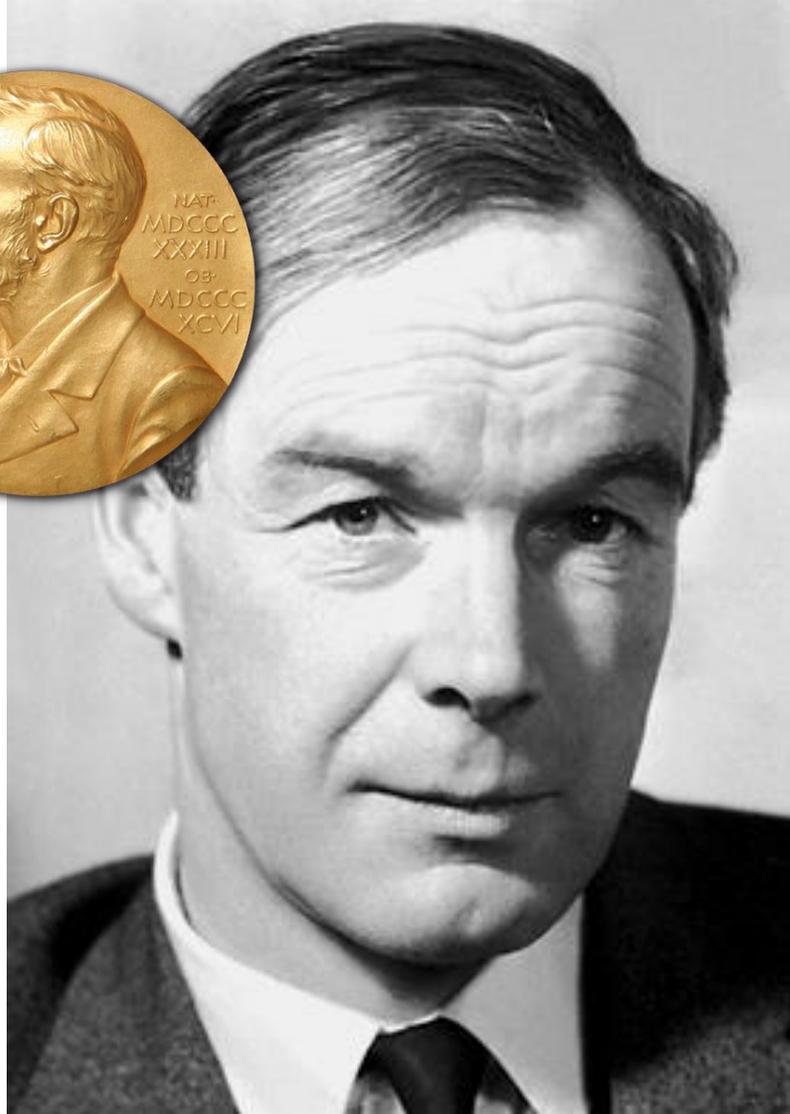
Donde,

$$\varphi_x \equiv \textit{flujo activo de la especie } x$$

Notar que el sumando $z_{K^+} F \varphi_{K^+}$ es la contribución de la **Corriente Activa** del catión K^+ a la corriente total, mientras que el sumando $z_{K^+} F J_{K^+}$ es la contribución de la **Corriente Pasiva** (Electrodifusión) del catión K^+ a la corriente total.



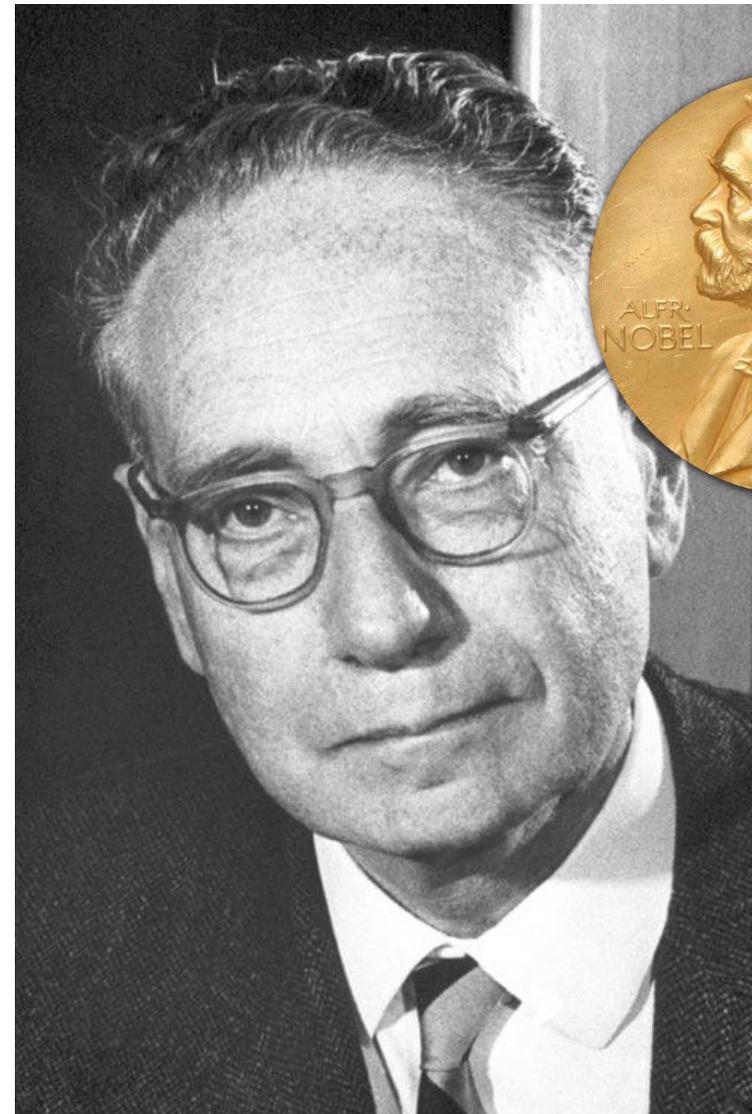
1963



A. Hodgkin



1970



B. Katz

El flujo de una especie iónica x está dado por la **Ecuación de Flujo de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)**:

$$J_x = -\frac{z_x p_x F \Delta V}{RT} \left(\frac{[X]_e - [X]_i e^{\frac{z_x F \Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{z_x F \Delta V}{RT}}} \right)$$

Donde,

$p_x \equiv$ *permeabilidad de la especie x*

La **permeabilidad** es una propiedad física que establece la facilidad de las partículas para atravesar la membrana.

La Ec. de Flujo de GHK es válida *solamente* bajo los siguientes supuestos:

- La membrana es una **sustancia homogénea**.
- El **campo eléctrico es constante** tal que el potencial transmembrana varía linealmente a lo largo de la membrana.
- Los iones tienen acceso a las soluciones intra- y extracelular *instantáneamente*.
- Los iones permanentes no interactúan.
- El movimiento de los iones es afectado tanto por la concentración como por las diferencias de voltaje.

Ver teórico de Potencial de Membrana y clase de ejercicios.

A partir de la Ecuación de Flujo GHK se puede demostrar que la diferencia de potencial de una membrana celular es:

$$\Delta V_m \approx \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{p_{K^+} [K^+]_e + p_{Na^+} [Na^+]_e + p_{Cl^-} [Cl^-]_i}{p_{K^+} [K^+]_i + p_{Na^+} [Na^+]_i + p_{Cl^-} [Cl^-]_e} \right)$$

Esta ecuación se denomina **Ecuación de Voltaje de Goldman-Hodgkin-Katz.**

En condiciones fisiológicas (Fig. 1 Anexo Práctico 04),

$$p_{K^+} \gg p_{Na^+}$$

$$\Delta V_m \propto E_{K^+} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} \right) \approx -101 \text{ mV}$$

En general, $\Delta V_m \approx E_{Cl^-}$ por lo que el anión cloruro está muy cerca del equilibrio electroquímico y suele despreciarse de la ecuación de Voltaje de GHK.

Incluyendo todas las contribuciones: $\Delta V_m \approx -94,75 \text{ mV}$.

Contenido de la clase

- (Breve) Introducción teórica.
- Análisis de datos.

Contenido de la clase

- (Breve) Introducción teórica.
- **Análisis de datos.**

Análisis de Datos

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.

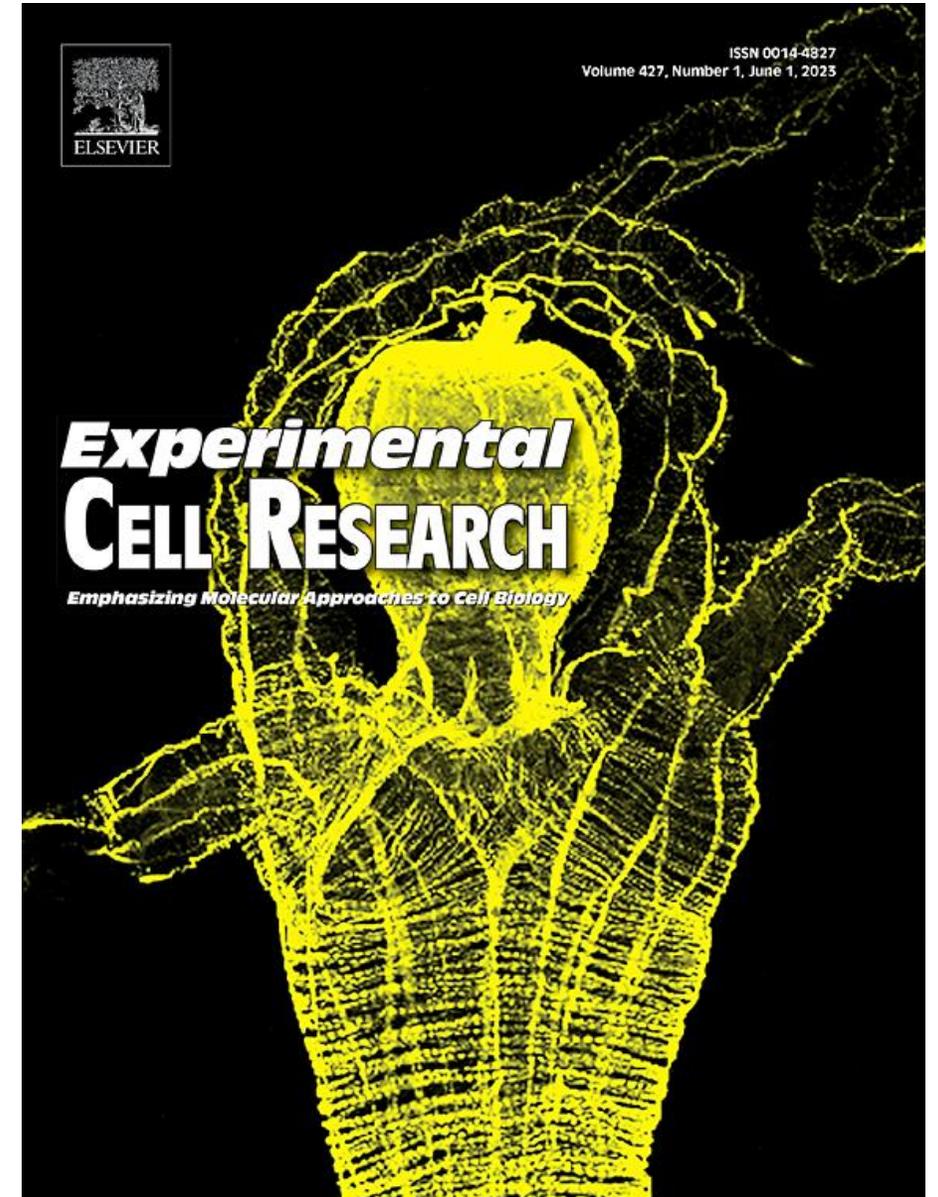
Mediante el uso de un programa computacional se realizará el análisis de las imágenes suministradas, registrándose los cambios en el PM según la variación en la intensidad de la fluorescencia de las células.

Los cambios relativos al color serán cuantificados mediante el uso de la opción Histograma del software. **Se graficará para cada secuencia de imágenes fotográficas, la intensidad de la fluorescencia versus el tiempo.**

Esta actividad está basada en el trabajo: Chifflet, S., *et al.* (2003)^[2].

El software a utilizar es [Photopea®](#), un editor de imágenes online. Los diferentes sets de imágenes están subidos a una carpeta en la [plataforma EVA](#).

[2] Chifflet, S., Hernández, J. A., Grasso, S., & Cirillo, A. (2003). Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. *Experimental cell research*, 282(1), 1-13.

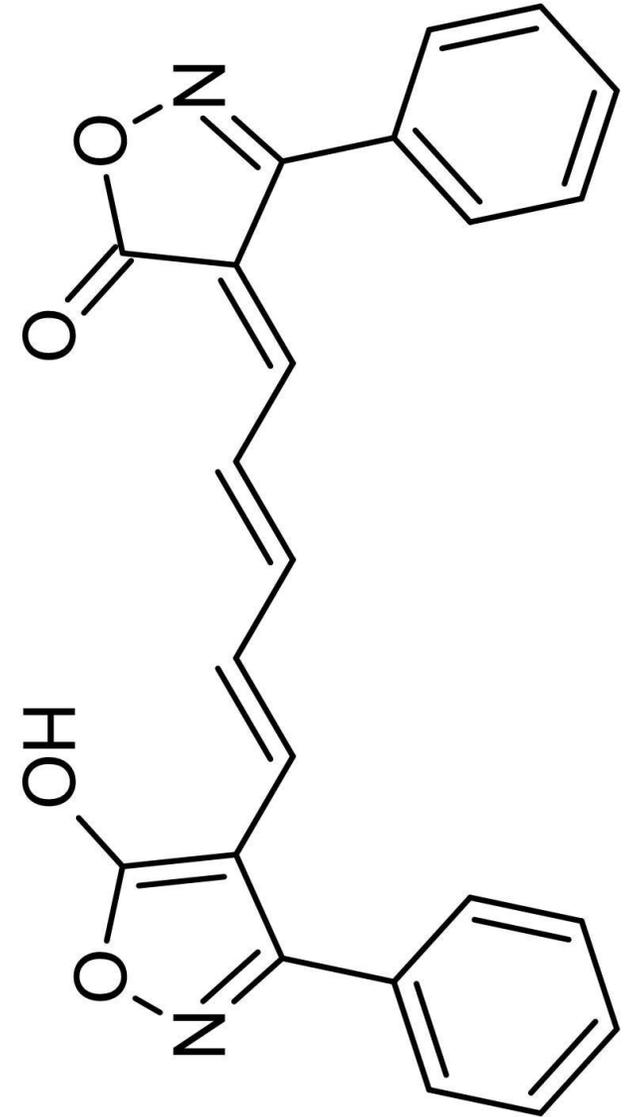


¿Cómo visualizamos las imágenes en el software?

- 1) Descargar las imágenes en la computadora.
- 2) Subir las imágenes al software. Pueden hacerlo a través de la pestaña “*Archivo*” → “*Abrir*”, o simplemente arrastrar la imagen desde la carpeta donde está guardada al recuadro *Drop any files.*

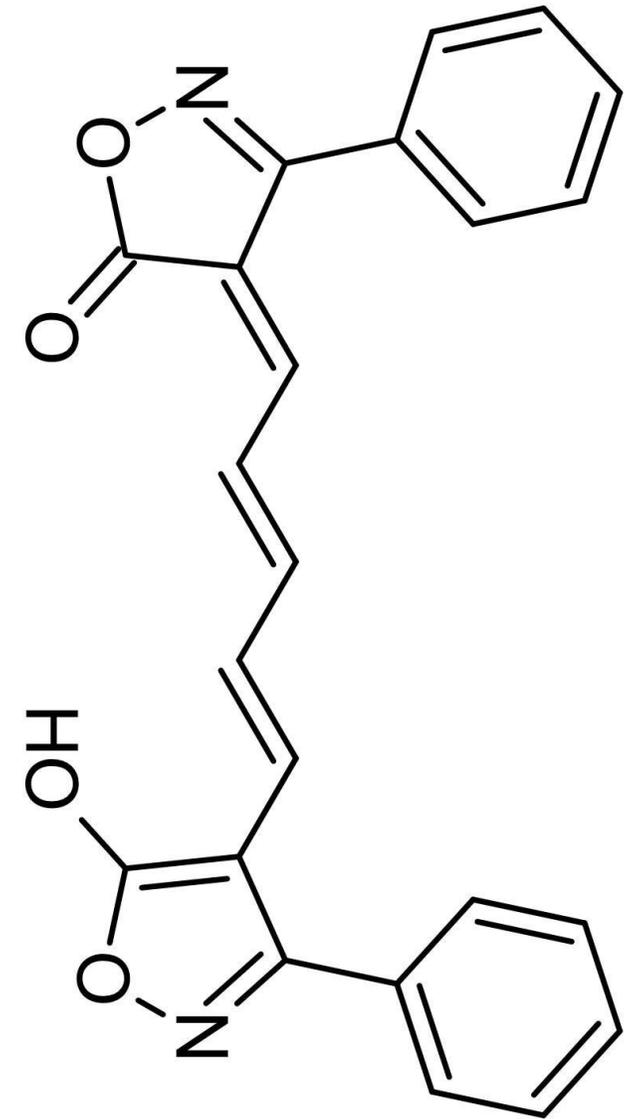
En esta actividad tomaremos la intensidad de color rojo como una variable asociada proporcionalmente al cambio en el potencial de membrana (ΔV_m).

El color rojo se debe a la presencia del colorante aniónico **Oxonol V**, cuyo flujo se acopla a **cambios positivos del potencial de membrana**.



De esta manera, cuanto más rojo es la imagen (mayor intensidad), más positivo es el potencial de membrana (**Despolarización**).

Por tanto, una pérdida de la intensidad del rojo se asocia con un potencial de membrana más negativo.

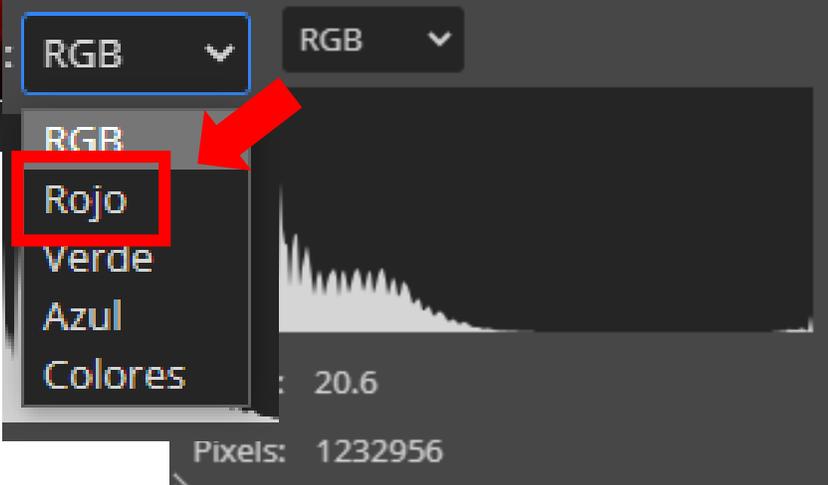
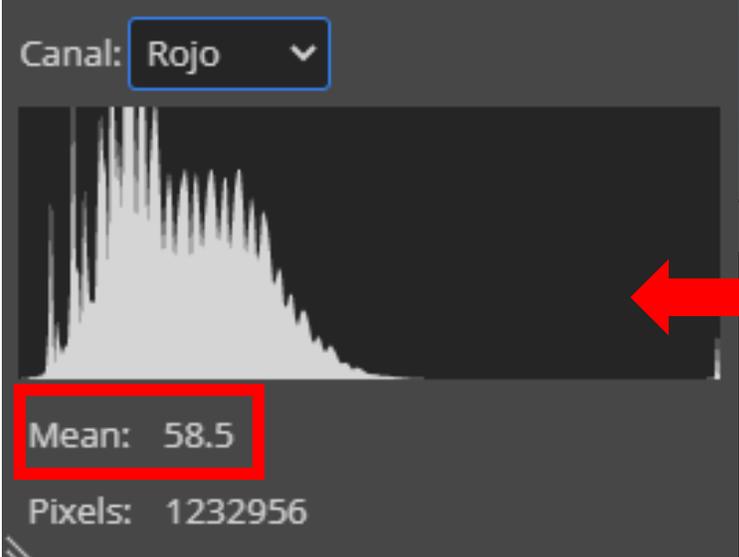
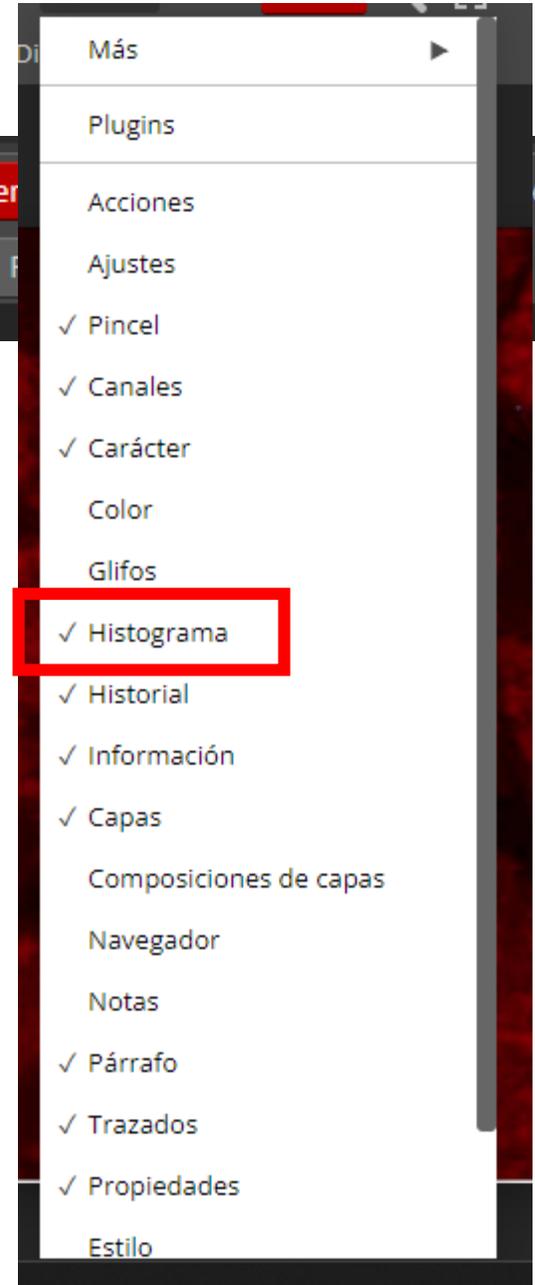
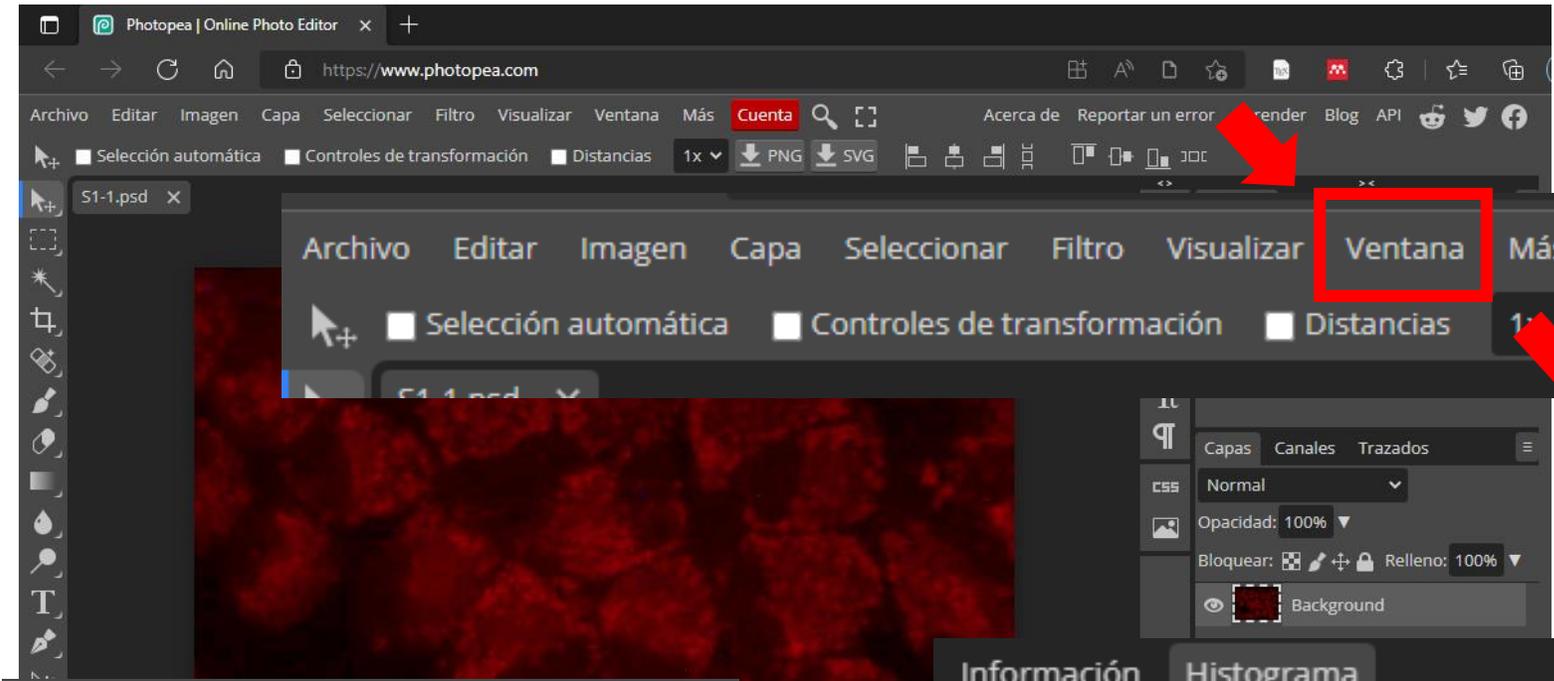


¿Por qué usamos un histograma para cuantificar la intensidad?

La distribución espacial del Oxonol V en la imagen es irrelevante en este análisis.

Lo que sí interesa saber es la intensidad del color rojo como una función asociada al cambio en el potencial de membrana. Dicha intensidad se toma a partir del promedio de todas las intensidades registradas por unidad de pixel^2 .

El histograma registra el número de fotones por pixel^2 .



Registrando la intensidad media de fotones por píxel confeccionamos una tabla de valores, asociándolos con el tiempo correspondiente a cada imagen.

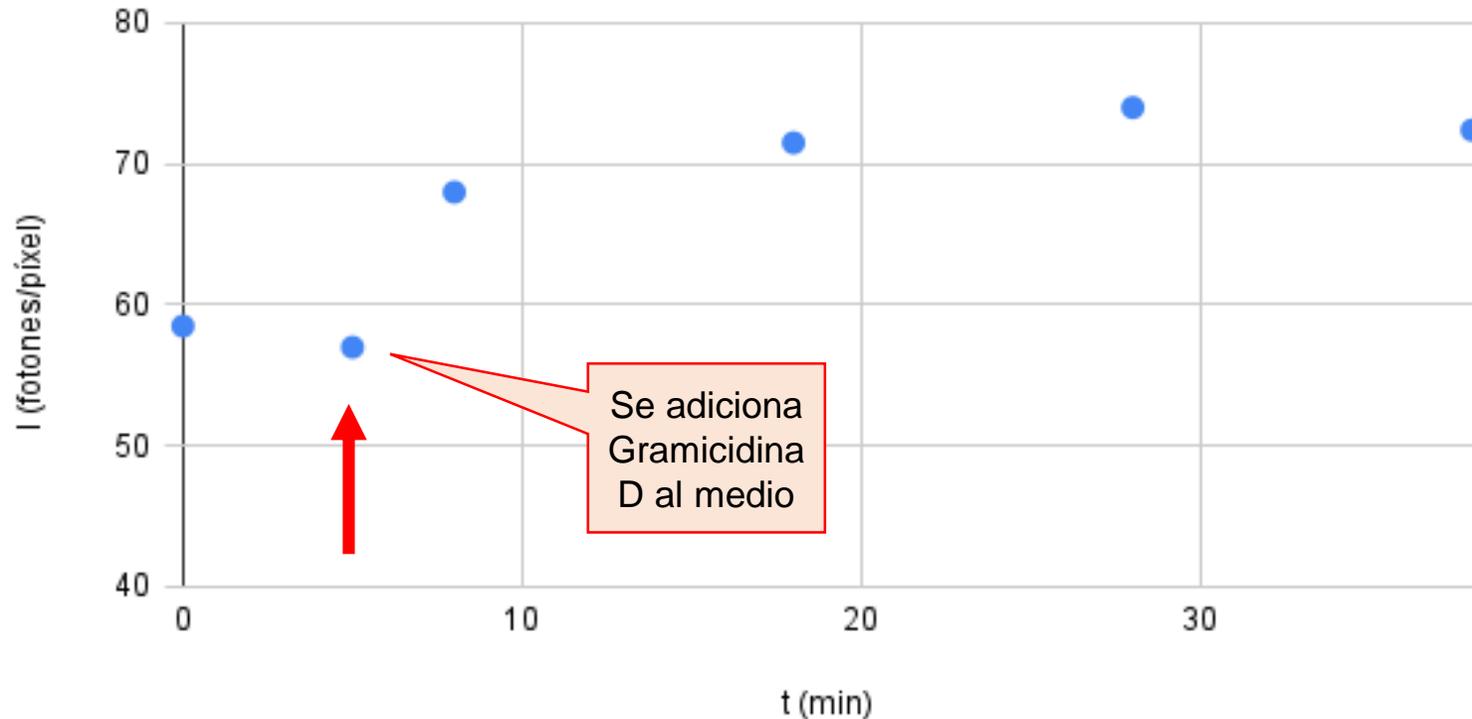
Para cada set de imágenes realizamos el mismo procedimiento, **graficamos I vs. t** y estudiamos el comportamiento de la membrana en las diferentes condiciones experimentales.

t	I
t_1	I_1
t_2	I_2
t_3	I_3

Análisis de Datos: Serie 1

Intensidad de fotones/píxel vs. Tiempo (min)

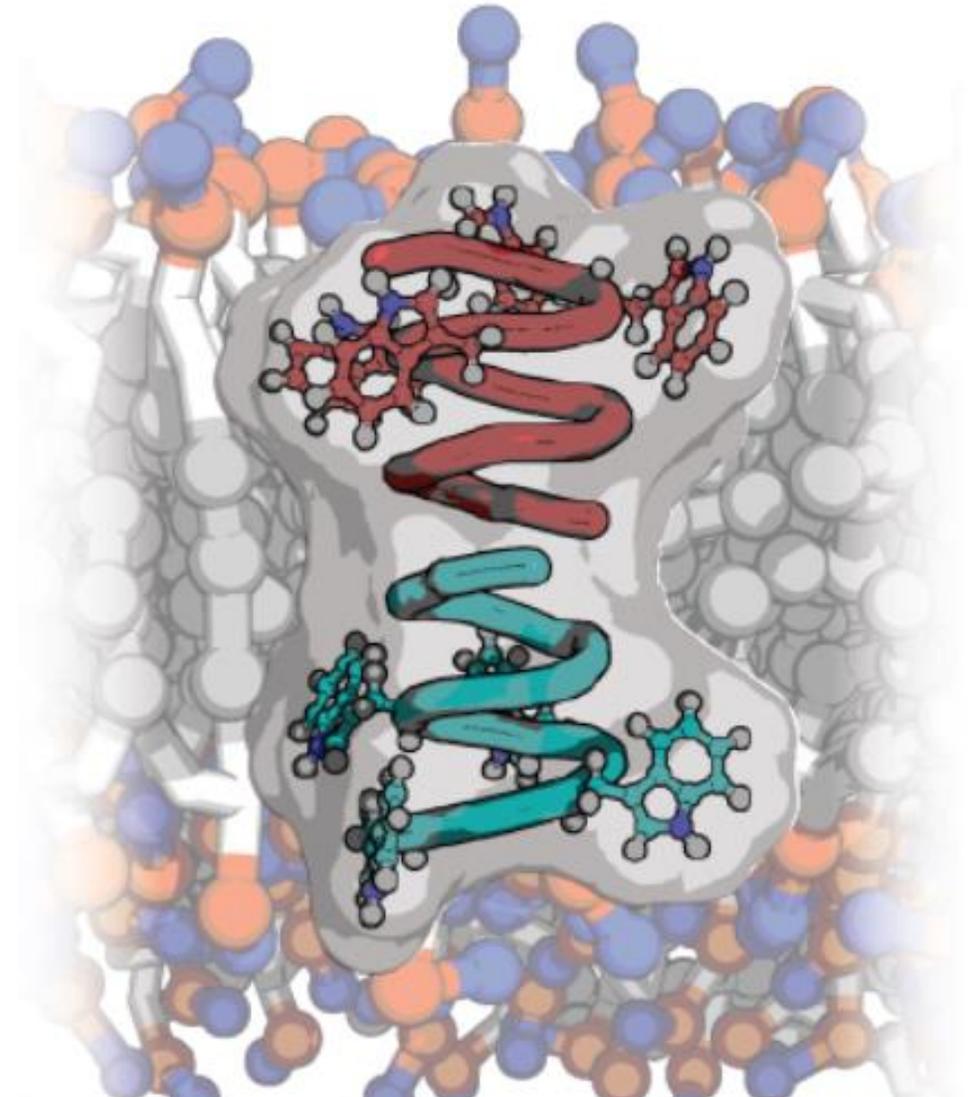
Potencial de Membrana



¿Qué puede decir respecto al efecto de la Gramicidina D en el potencial de membrana?

La **adición de Gramicidina D** al medio de cultivo genera un cambio en el potencial de membrana.

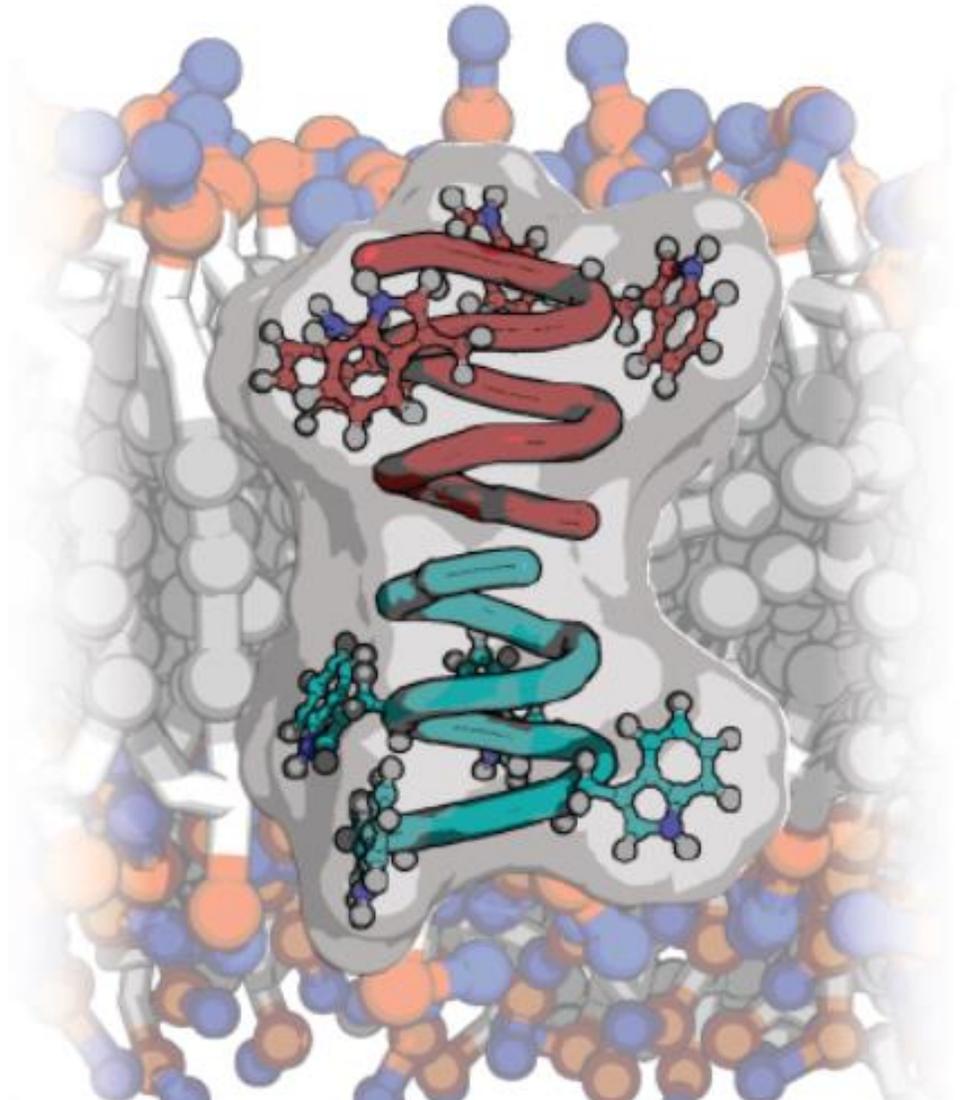
Dicho cambio **implica una Despolarización** de la membrana, es decir, se vuelve menos negativa al aumentar la intensidad del color rojo.



Stevenson, P. (2017). *Membrane and Membrane Protein Dynamics Studied with Time-Resolved Infrared Spectroscopy* (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Department of Chemistry).

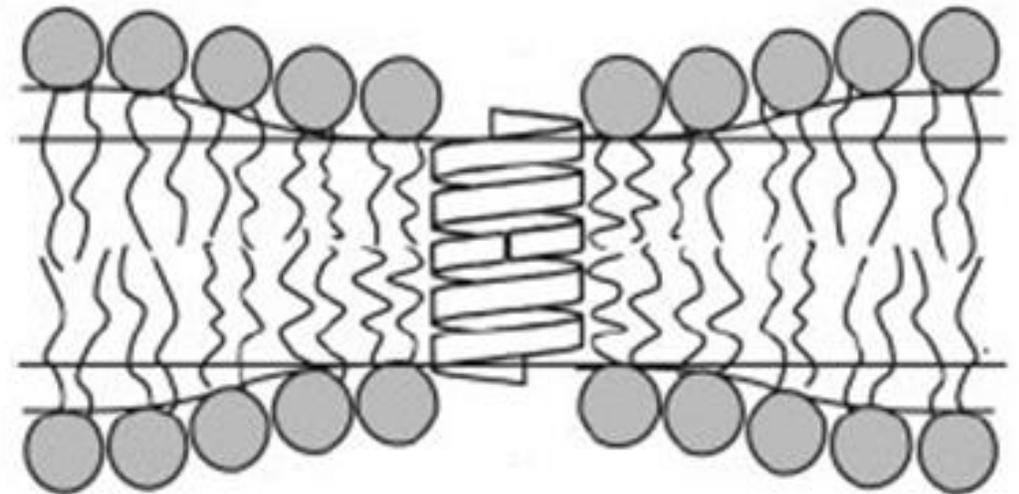
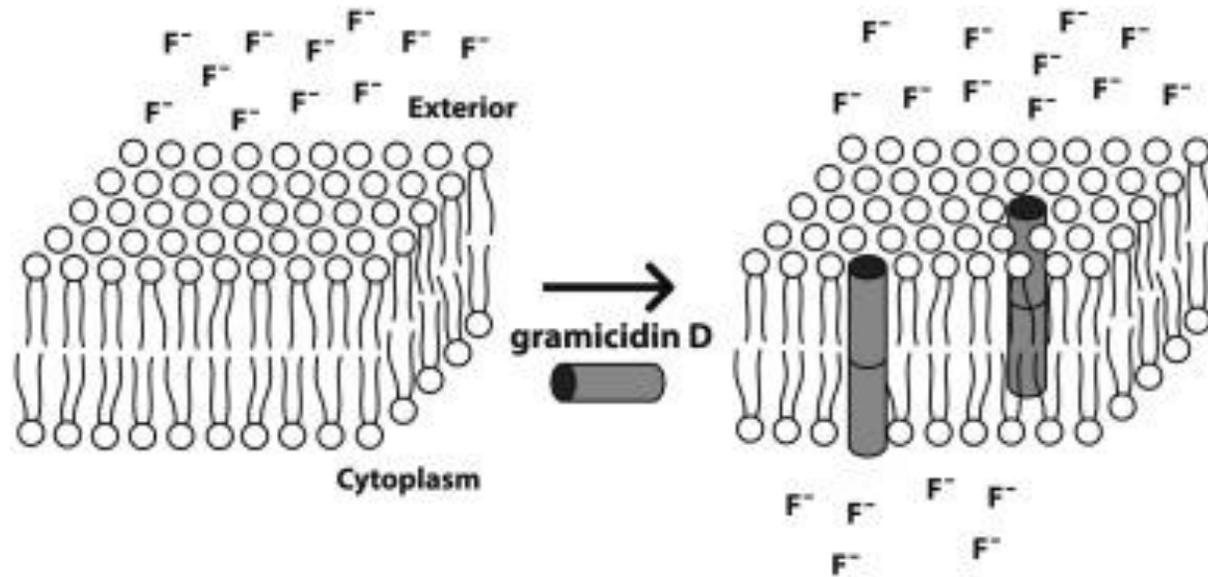
La Gramicidina D es un **ionóforo**, es decir, una molécula que **aumenta la permeabilidad de los iones**, en particular, de los cationes monovalentes, al integrarse en la membrana plasmática de las células.

Esto genera un aumento en las permeabilidades tanto de Na^+ como del K^+ .



Stevenson, P. (2017). *Membrane and Membrane Protein Dynamics Studied with Time-Resolved Infrared Spectroscopy* (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Department of Chemistry).

La Gramicidina D modifica las propiedades físicas de la membrana plasmática, y por tanto, genera un efecto en la permeabilidad de todos los iones.

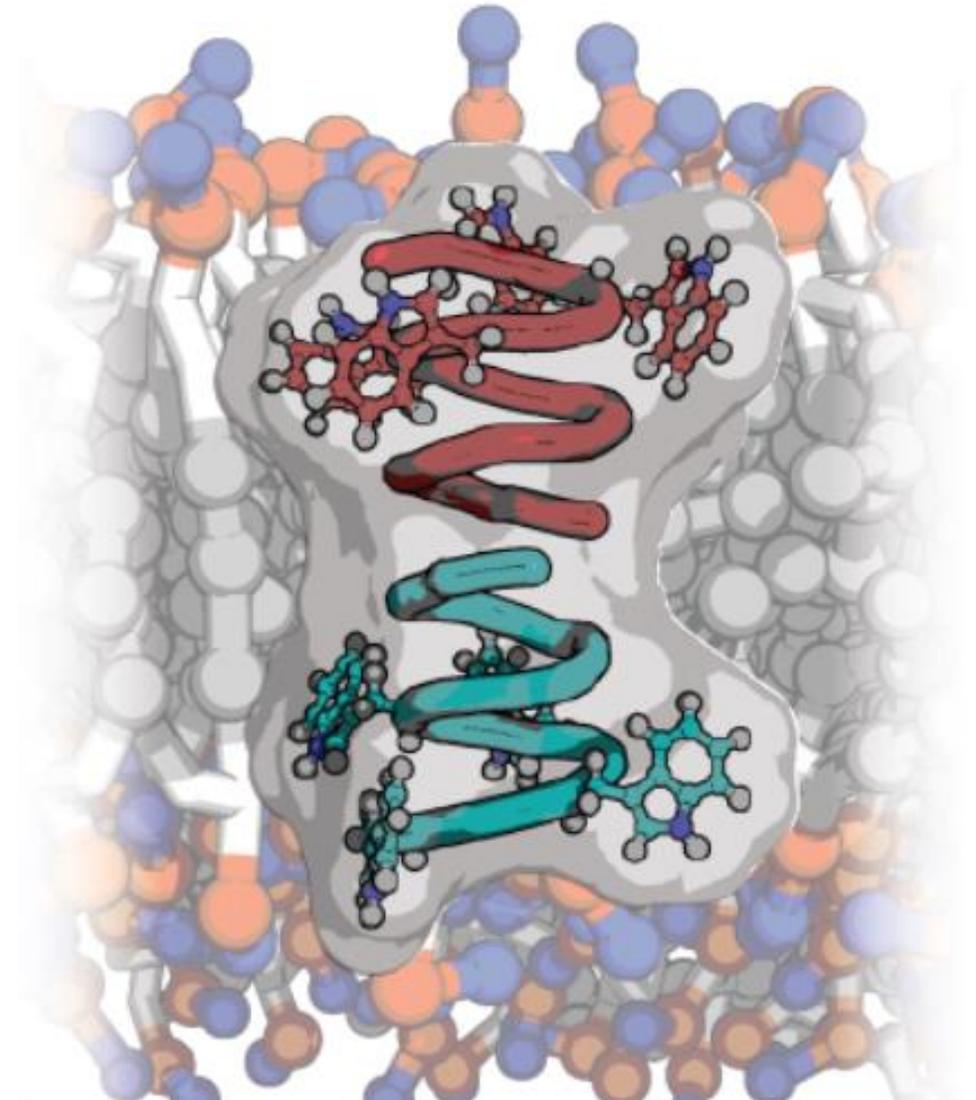


Nelson, et al. (2014). Gramicidin D enhances the antibacterial activity of fluoride. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(13), 2969-2971.

Lundbaek, et al. (2005). Capsaicin regulates voltage-dependent sodium channels by altering lipid bilayer elasticity. *Molecular pharmacology*, 68(3), 680-689.

Puesto que la membrana se despolariza, su potencial tiende a acercarse más hacia el potencial de equilibrio del Na^+ ($E_{Na^+} \sim +55 \text{ mV}$) que del K^+ ($E_{K^+} \sim -100 \text{ mV}$), a pesar de que la Gramicidina D afecta la permeabilidad de ambos cationes.

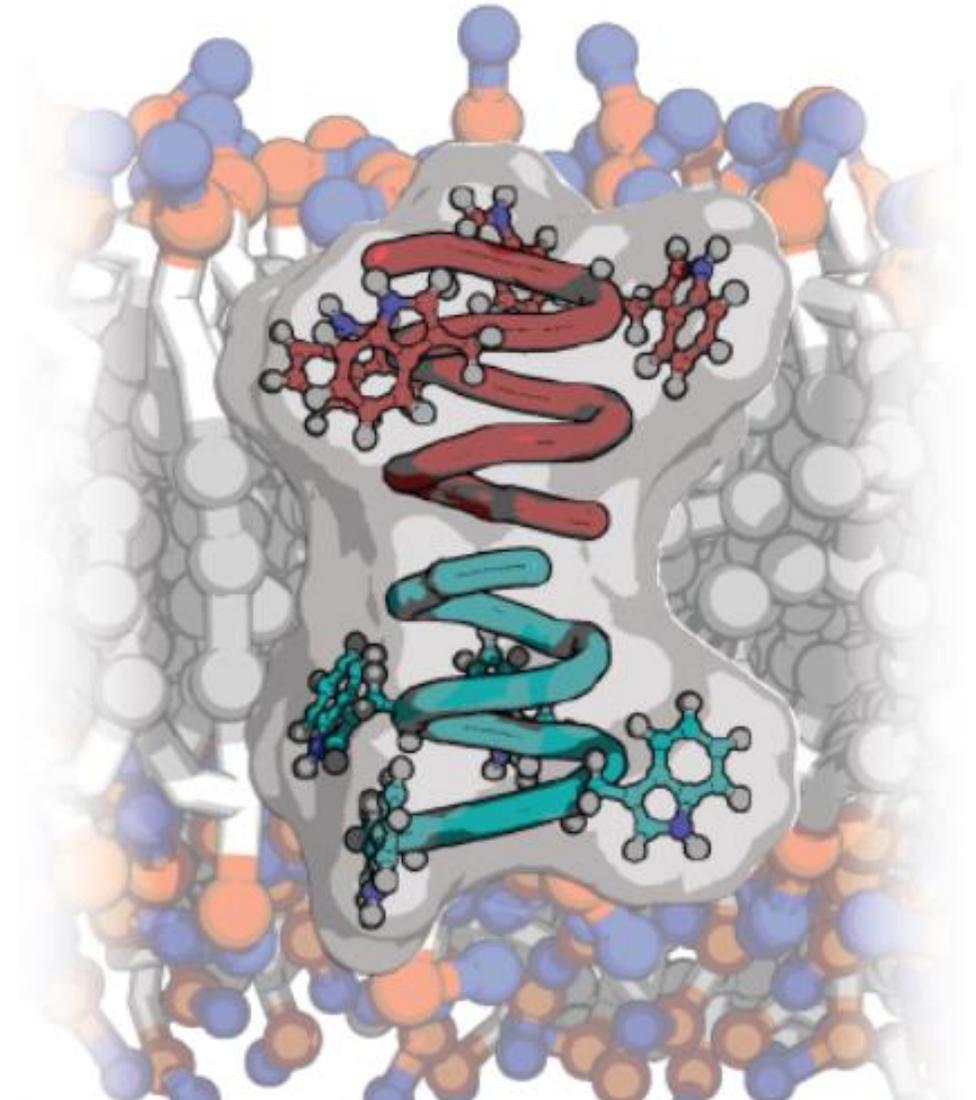
¿Por qué ocurre esto?



Stevenson, P. (2017). *Membrane and Membrane Protein Dynamics Studied with Time-Resolved Infrared Spectroscopy* (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Department of Chemistry).

La permeabilidad del Na^+ se ve más afectada que la del K^+ , ya que, en proporción, el aumento es más significativo para el Na^+ .

Un cambio en la permeabilidad de los cationes **afecta más permeabilidades bajas** que permeabilidades altas.

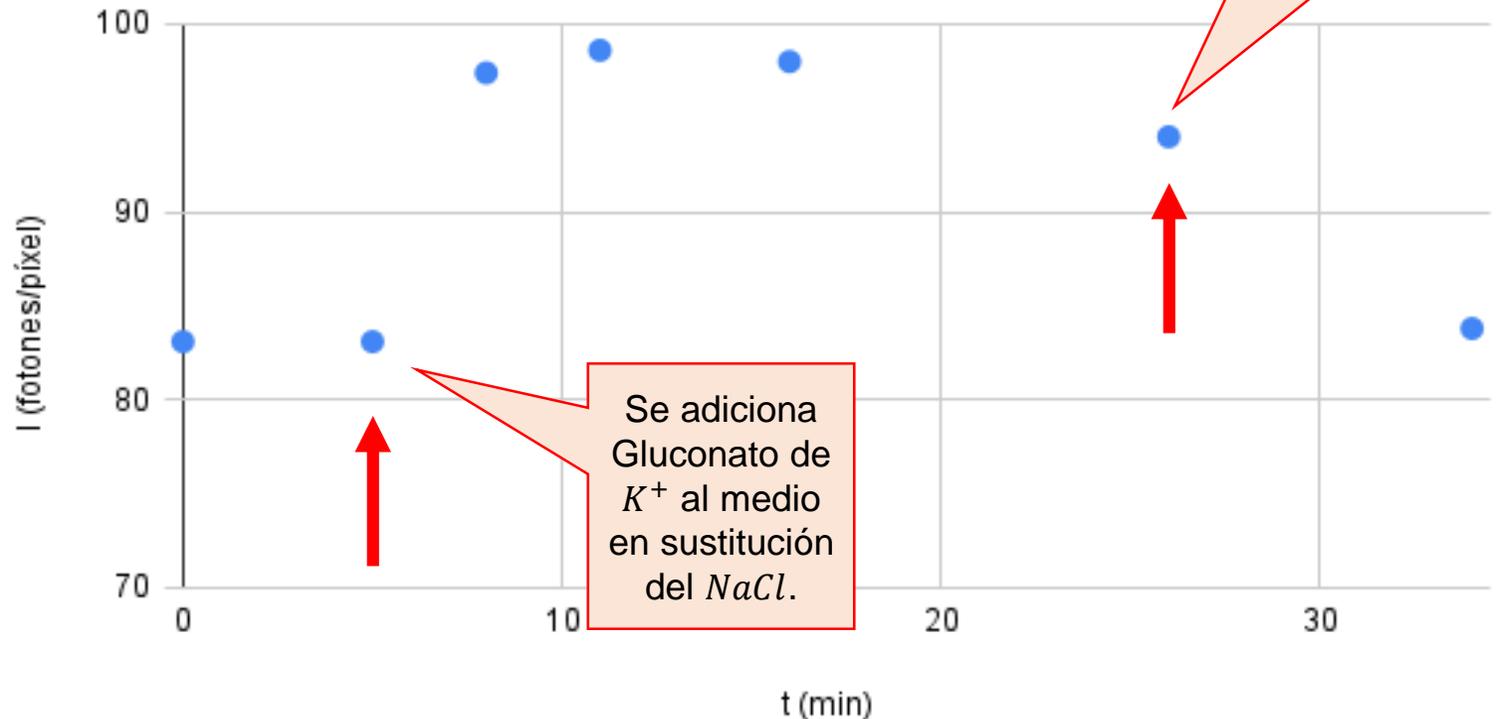


Stevenson, P. (2017). *Membrane and Membrane Protein Dynamics Studied with Time-Resolved Infrared Spectroscopy* (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Department of Chemistry).

Análisis de Datos: Serie 2

Intensidad de fotones/píxel vs. Tiempo (min)

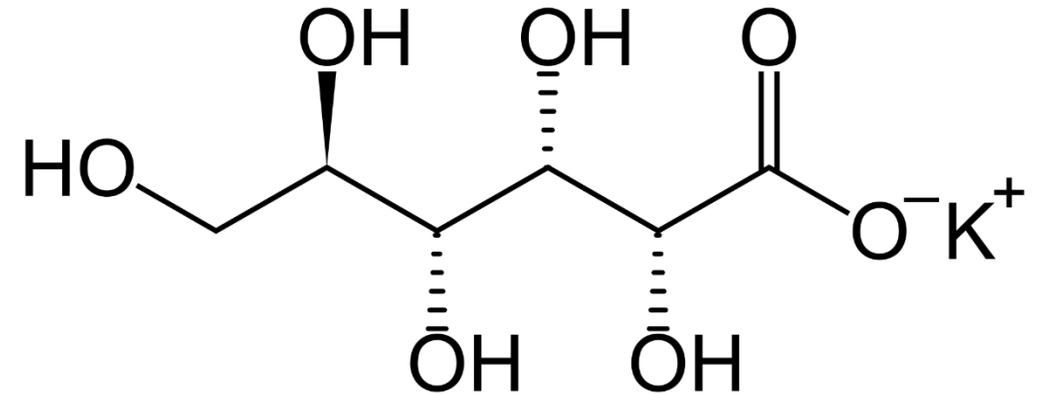
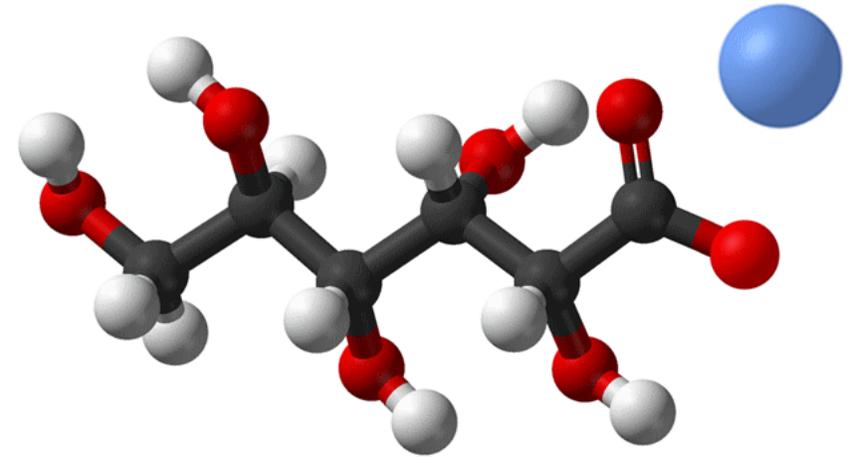
Potencial de Membrana



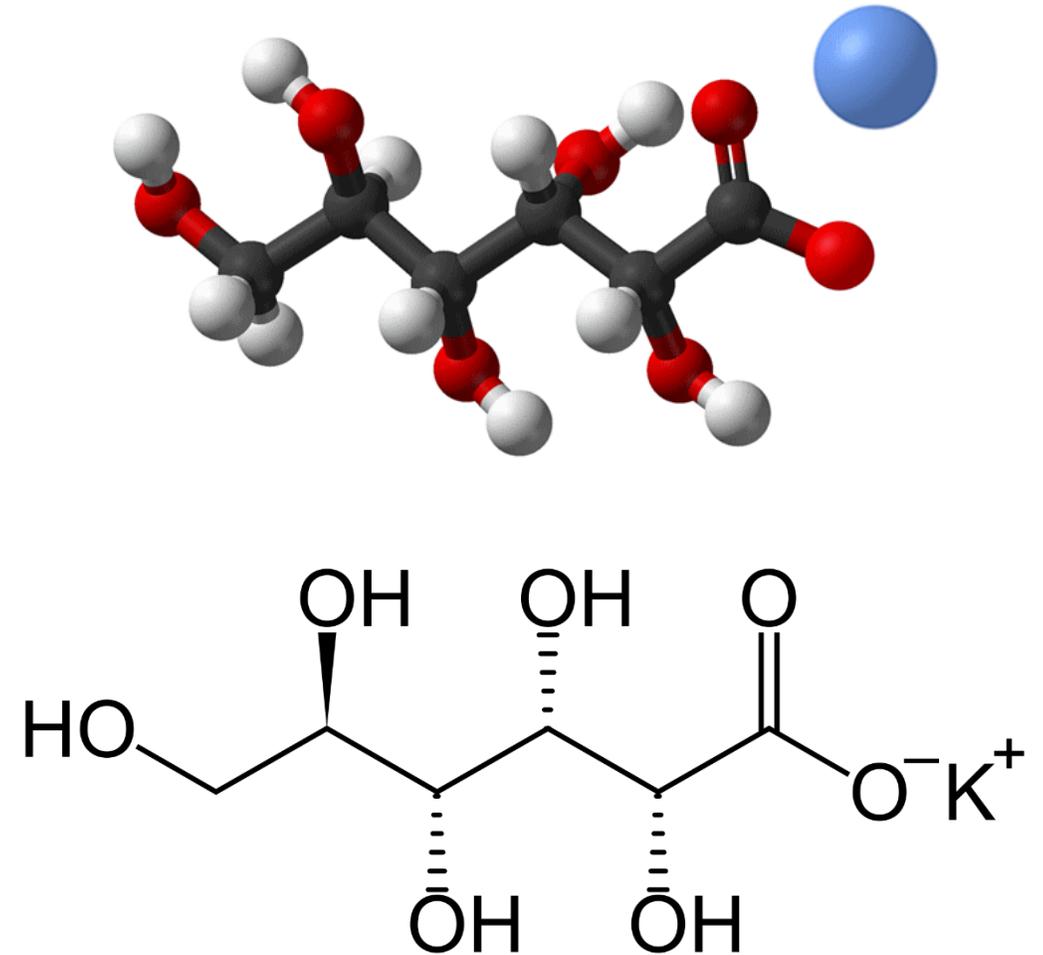
¿Qué puede decir respecto al efecto de la adición de Gluconato de K^+ en el potencial de membrana? ¿Qué ocurre cuando se restituye el medio de cultivo?

La **adición de Gluconato de Potasio** al medio de cultivo en sustitución del Cloruro de Sodio genera un cambio en el potencial de membrana.

Dicho cambio **implica una Despolarización** de la membrana, es decir, se vuelve menos negativa al aumentar la intensidad del color rojo.

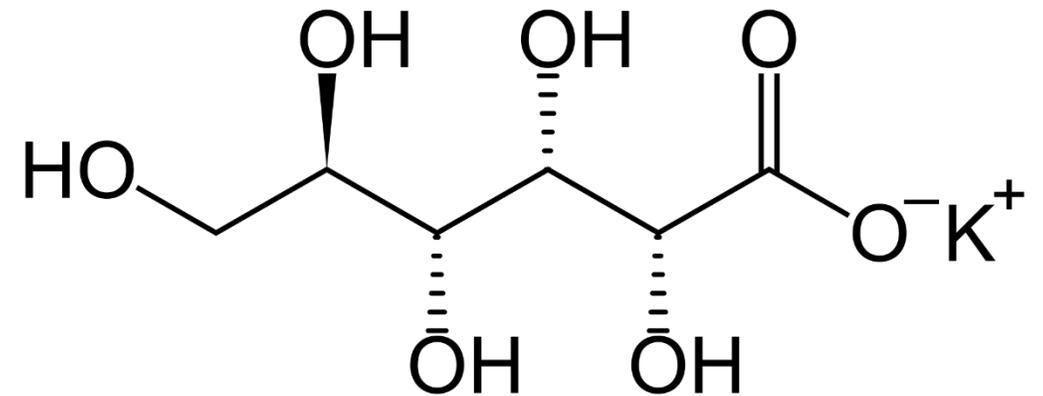
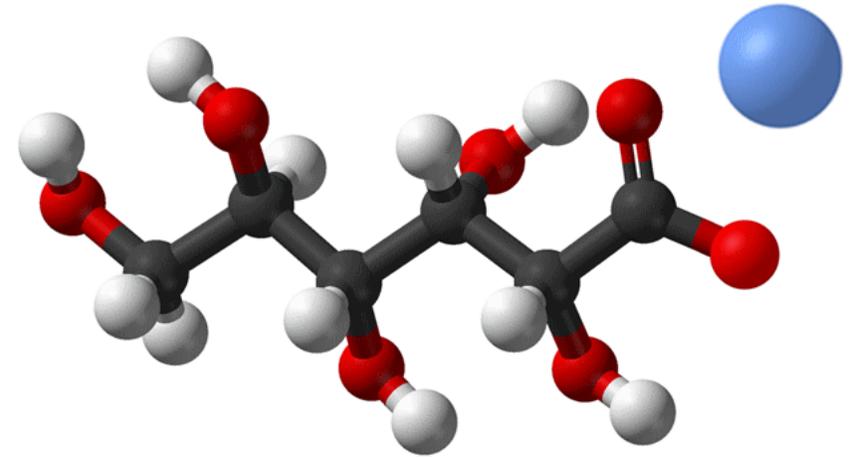


La Despolarización se debe a un **cambio en los potenciales de equilibrio** tanto del K^+ como del Na^+ , ya que aumenta la cantidad de K^+ en el espacio extracelular al tiempo que disminuye la cantidad de Na^+ . Los nuevos potenciales electroquímicos de los cationes generan que la membrana se vuelva más positiva.

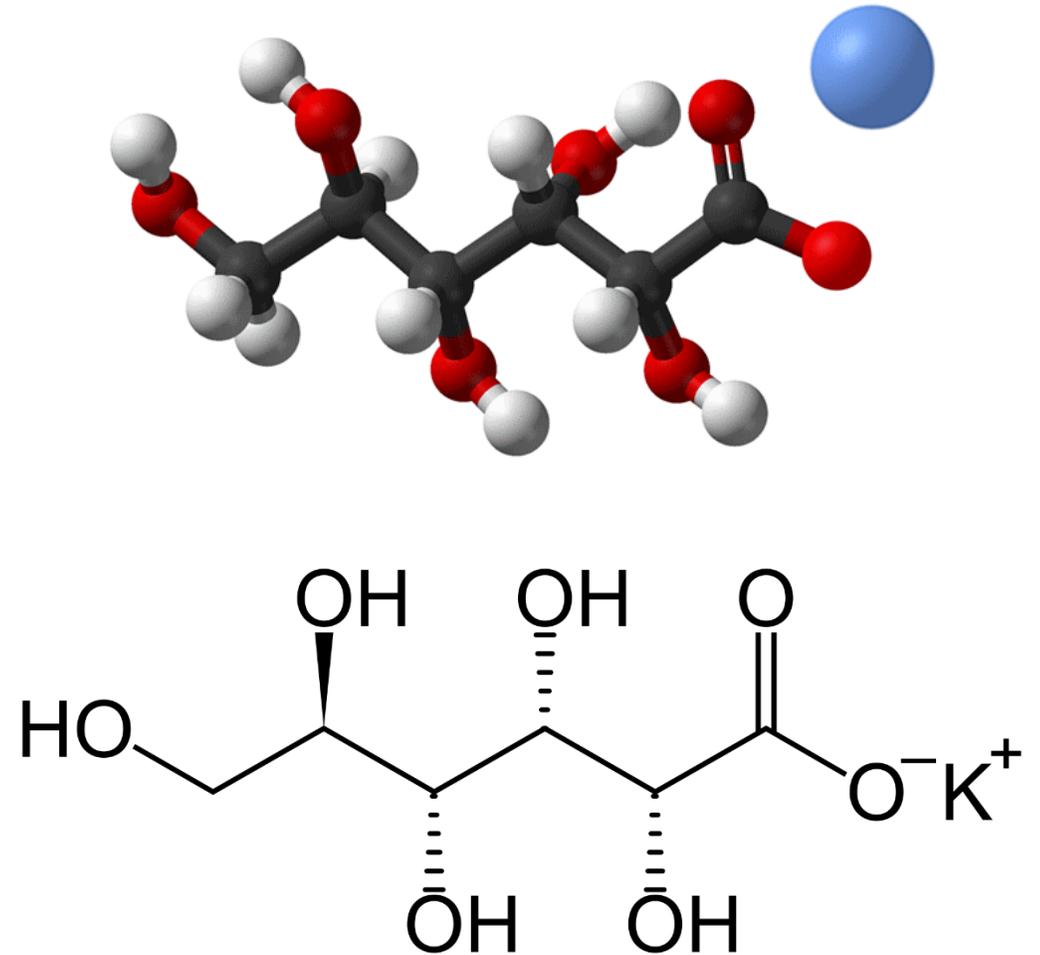


La introducción de **Gluconato de Potasio** al espacio extracelular **modifica los gradientes de concentración** de ambas especies iónicas.

En este caso, la despolarización de la membrana no depende de un cambio en las propiedades físicas de la membrana plasmática.



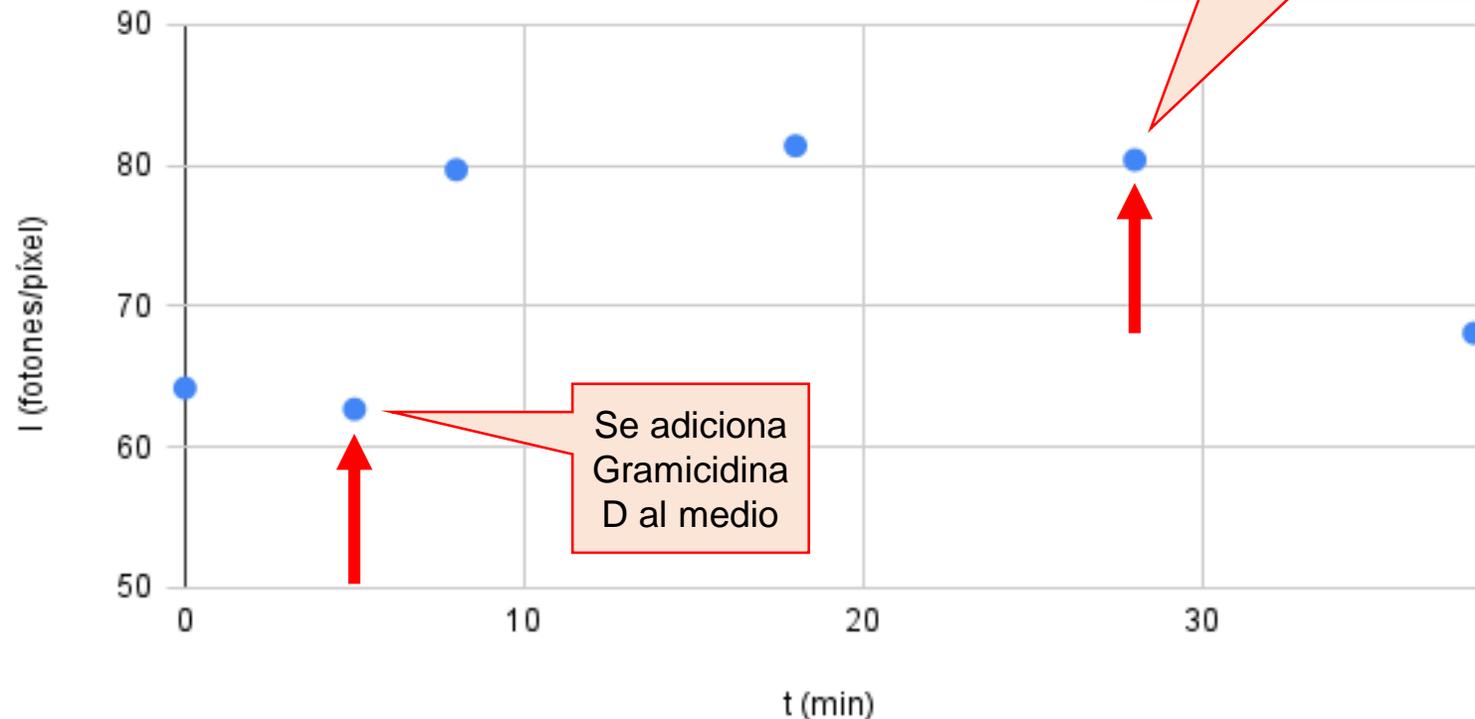
Al restituir las condiciones de cultivo con Cloruro de Sodio, el **potencial de membrana tiende a volver a un *nuevo estado de equilibrio***, pero ahora a partir de los nuevos potenciales establecidos anteriormente por la adición de Gluconato de Potasio.



Análisis de Datos: Serie 3

Intensidad de fotones/píxel vs. Tiempo (min)

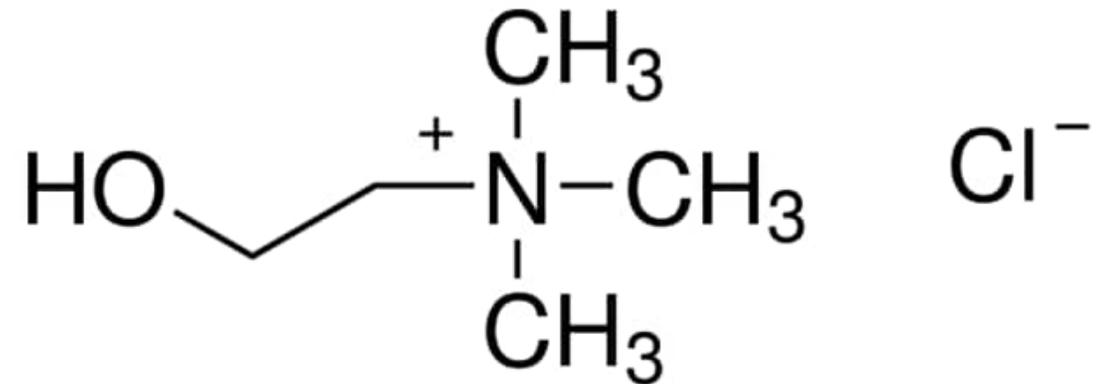
Potencial de Membrana



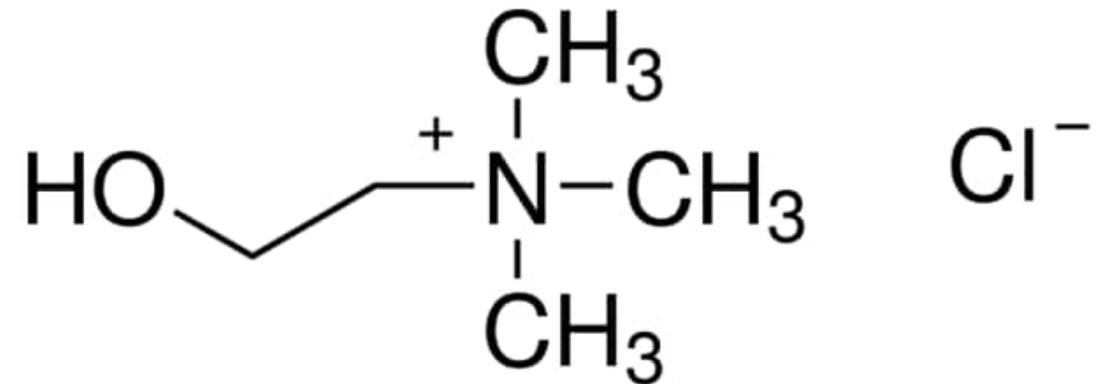
¿Qué puede decir respecto al efecto de la adición de Gramicidina D en el medio de cultivo? ¿Qué ocurre cuando se sustituye *NaCl* por Cloruro de Colina en presencia de Gramicidina D?

El efecto inicial por la adición de Gramicidina D es análogo al de la serie de datos 1: **aumento de la permeabilidad** de los cationes, generando una **despolarización** de la membrana.

La posterior sustitución de *NaCl* por Cloruro de Colina genera un **cambio en el potencial de Na^+** .

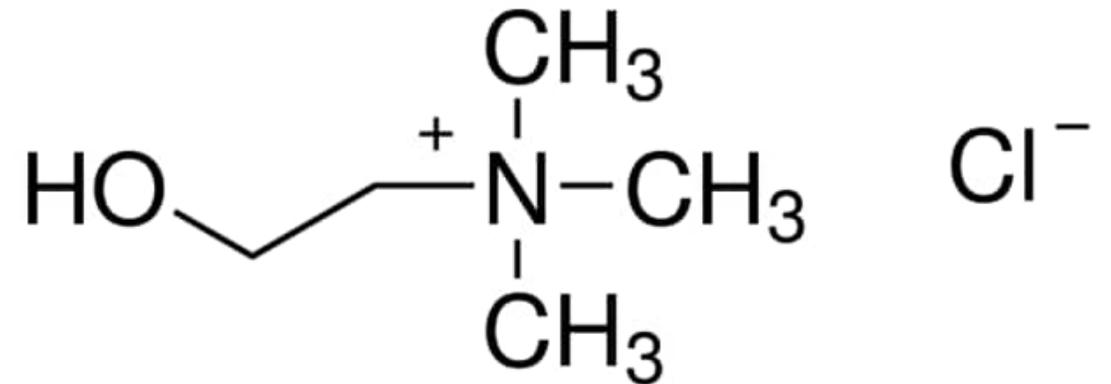


El cambio en el potencial de equilibrio del Na^+ modifica el potencial de la membrana, el cual volverá a un nuevo estado de equilibrio a partir del nuevo potencial de equilibrio del Na^+ , **tomando en cuenta tanto el cambio en la concentración extracelular de Na^+ como su nueva permeabilidad.**



La adición de Cloruro de Colina también modifica la concentración extracelular del anión cloruro, modificando su potencial de equilibrio.

Este nuevo potencial de equilibrio también tendrá un efecto en el potencial de membrana.



Resumen

La Ecuación de Nerst-Planck permite estudiar el fenómeno de la electrodifusión, es decir, el transporte pasivo de partículas cargadas en función de su gradiente de concentración (químico) y de su gradiente eléctrico.

La Ecuación de Potencial Electroquímico permite obtener la Ecuación de Nerst para el Potencial Eléctrico de una especie iónica, estableciendo una relación entre la diferencia de potencial eléctrico y la variación de concentración entre compartimentos intracelular y extracelular.

Resumen

En condiciones fisiológicas, la difusión electrogénica de las especies iónicas permeables a la membrana es la principal contribuyente a la generación del potencial de membrana.

La condición de Electroneutralidad establece que la corriente neta de especies iónicas entre el espacio extracelular e intracelular debe ser nula. A partir de esta idea y la Ecuación de Flujo de GHK se puede demostrar la dependencia de la diferencia de potencial de la membrana en función de los iones permeables a ésta (Ecuación de Voltaje de GHK).

Resumen

En condiciones fisiológicas, y dadas las relaciones entre permeabilidades de los iones principales, la diferencia de potencial de la membrana es cercana al valor del potencial eléctrico del K^+ .

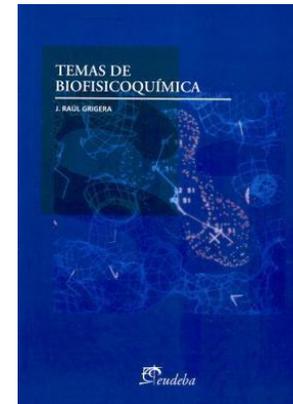
Diferentes agentes electrogénicos pueden modificar el potencial de membrana, ya sea alterando sus propiedades físicas (como la Gramicidina D) o alterando las concentraciones de los iones permeables principales (como el Gluconato de Potasio o el Cloruro de Colina).

Bibliografía



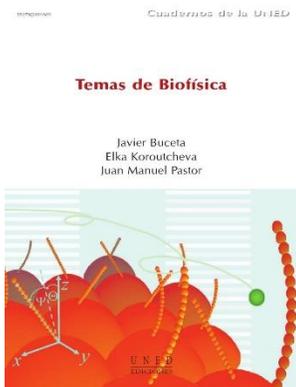
Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2016). *Medical physiology E-book*. Elsevier Health Sciences. Cap. 5: Transport of Solutes and Water. Cap. 6: Electrophysiology of the Cell Membrane.

[\[Disponible en Biblioteca\] \(en español\)](#)
[\[Disponible en EVA\] \(en inglés\)](#)



Grigera, J. R. (2011). *Temas de biofísicoquímica* (No. 577.3 GRI). Cap. 7: Potenciales de Membrana.

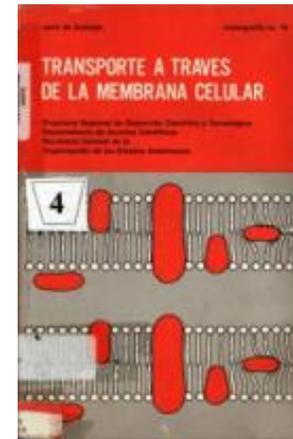
[\[Disponible en Biblioteca\]](#)



Fernández, J. B., Koroutcheva, E. R., & Ruiz, J. M. P. (2012). *Temas de biofísica*. Editorial UNED.

Cap. 4: Fenómenos de Transporte de Membrana. Págs.: 117-140.

[\[Disponible en Biblioteca\]](#)
[\[Disponible en EVA\]](#)

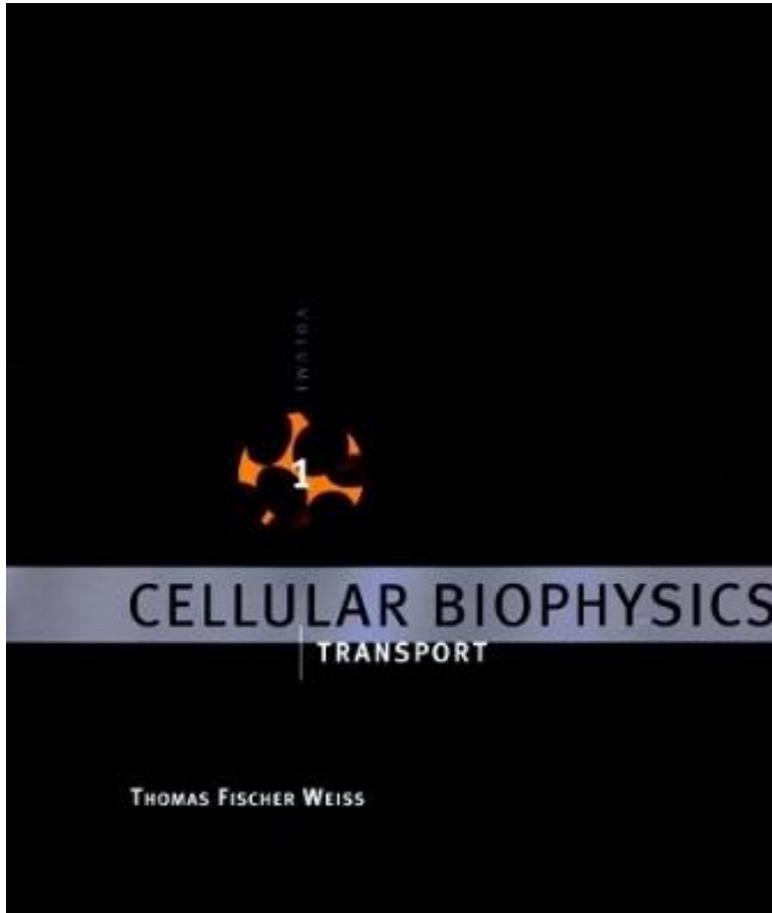


Garrahan, P. J., & Rega, A. F. (1977). *Transporte a través de la membrana celular*. Cap. 2: Distribución de solutos a través de membranas biológicas.

Cap. 3: Transporte de solutos por difusión simple.

[\[Disponible en Biblioteca\]](#)

Bibliografía *(continuación)*



Weiss, T. F. (1996). *Cellular biophysics. Vol. 1: Transport*. MIT Press.
Cap. 7: Ion Transport and Resting Potential.
[Disponible en Biblioteca]