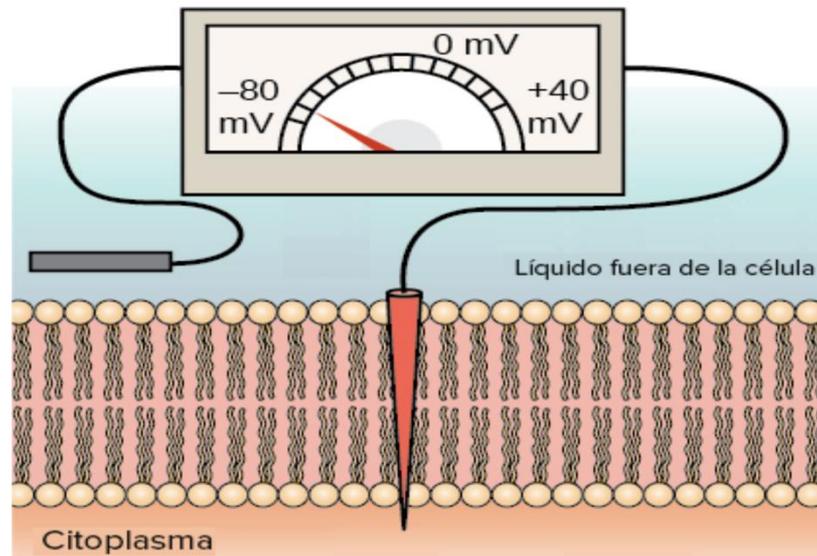


POTENCIAL DEL MEMBRANA



Gustavo Grinspan
Sección Biofísica y Biología de Sistemas
4 de mayo de 2022

- ITINERARIO DE LA CLASE:

- ¿Qué es el potencial de membrana?

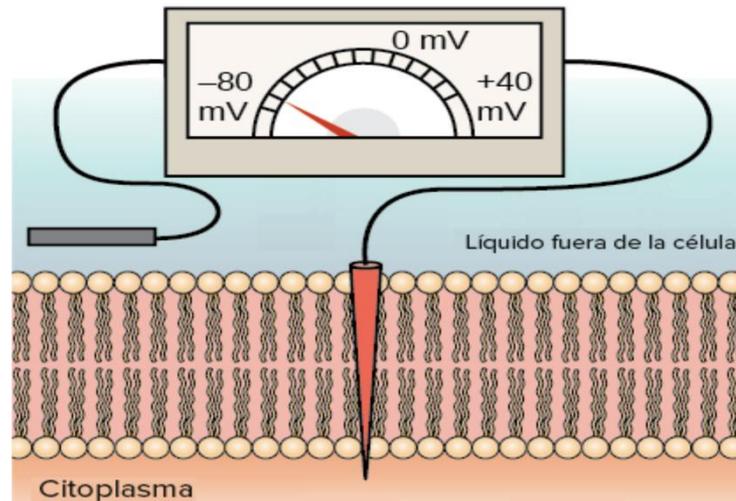
- ¿Cómo se mide el potencial de membrana?

- ¿Cuál es el origen del potencial de membrana?

- ¿Cómo se mantiene el potencial de membrana estacionario en el tiempo?

¿QUÉ ES EL POTENCIAL DE MEMBRANA?

- Las células no son eléctricamente neutras.
- Todas las células en estado de reposo, se caracterizan por presentar una diferencia de potencial eléctrico transmembrana, que se conoce con el nombre de *potencial de membrana* (ΔV_m)
- En **todos** los tipos de organismos, el compartimiento intercelular es electricamente negativo con respecto al compartimiento extracelular.
- Típicamente, la diferencia de potencial en células animales es de -70 a -90mV
- Sin embargo, pueden encontrarse valores de ΔV_m en el rango de -10 a -100mv, en diferentes tipos celulares.



compartment	potential difference (mV)
human red blood cell	-10 to -14
human/rodents resting potential in neurons	-40 to -80
squid axon membrane	-60
chicken embryo heart muscle	-70
mammalian skeletal muscle	-90
rat liver mitochondria, normal diet	-120 (-170 pmf)
rat liver mitochondria, high fat diet	-140 (-150 pmf)
<i>E. coli</i> fermentive growth on glucose	-110 (-120 pmf)
<i>E. coli</i> spheroplasts growth on aerobic rich media	-130 (-230 pmf)
<i>E. coli</i> aerobic growth on glycerol	-140 (-160 pmf)
<i>S. aureus</i> growth on aerobic rich media	-130 (-210 pmf)
alga <i>Nitella</i>	-140

Diferencias de potencial eléctrico transmembrana en distintos tipos de membranas biológicas. Los valores negativos indican que el compartimiento intercelular es electronegativo con respecto al extracelular.

Neurospora crassa



$\Delta V_m \approx -500 \text{ mV!!}$

Neurospora crassa



Scientific classification

Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotina
Class:	Sordariomycetes
Order:	Sordariales
Family:	Sordariaceae
Genus:	<i>Neurospora</i>
Species:	<i>N. crassa</i>

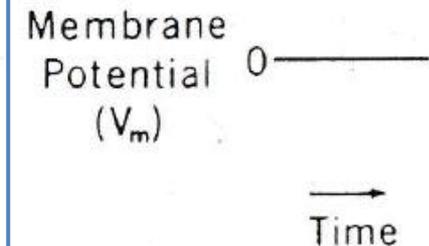
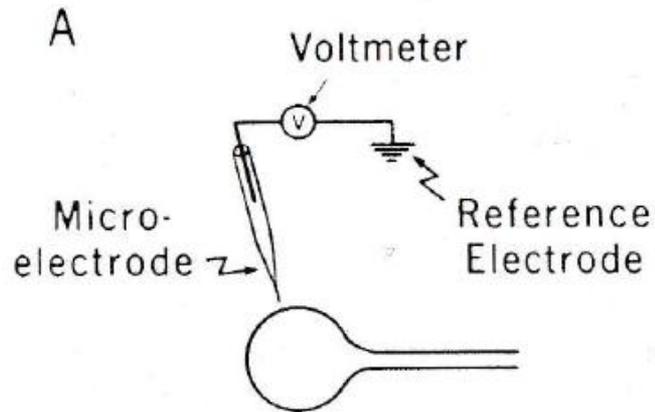
¿CÓMO SE MIDE EL POTENCIAL DE MEMBRANA?

• Registros electrofisiológicos

Microelectrodo de vidrio conectado a un voltímetro
(en medio extracelular)

+

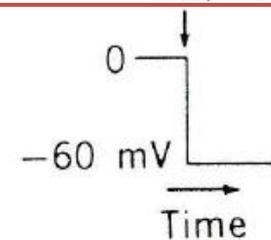
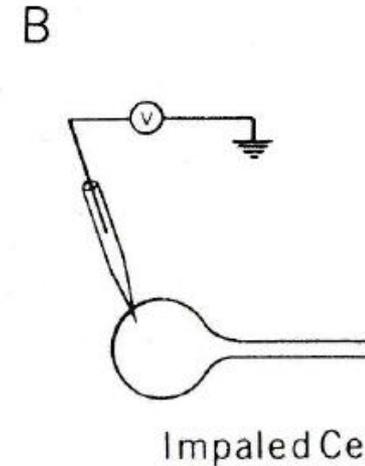
Microelectrodo lleno de solución electrolítica (ej. KCL)
(en medio extracelular)

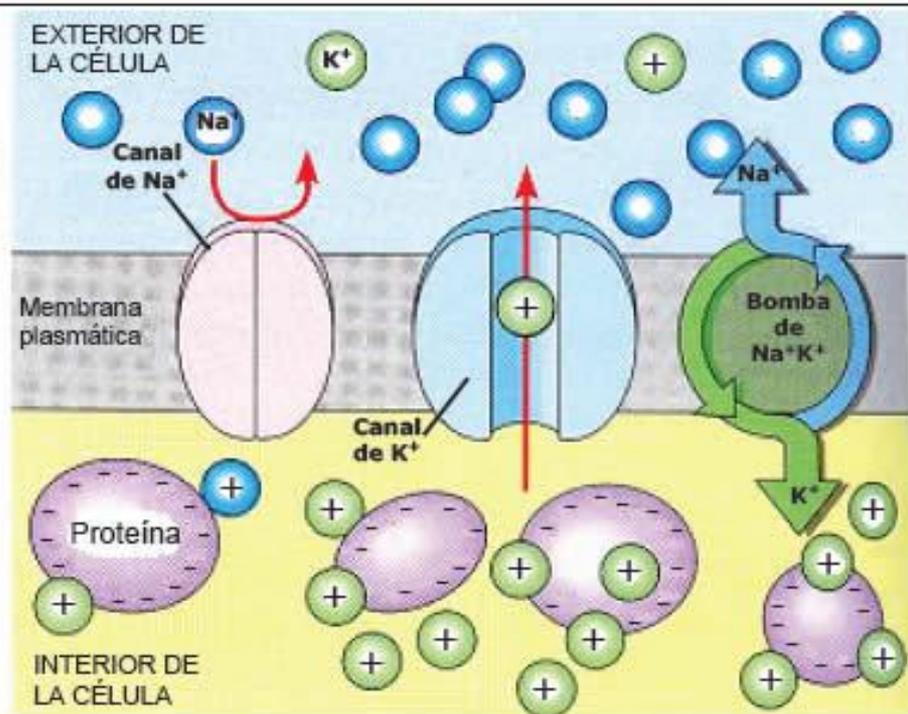
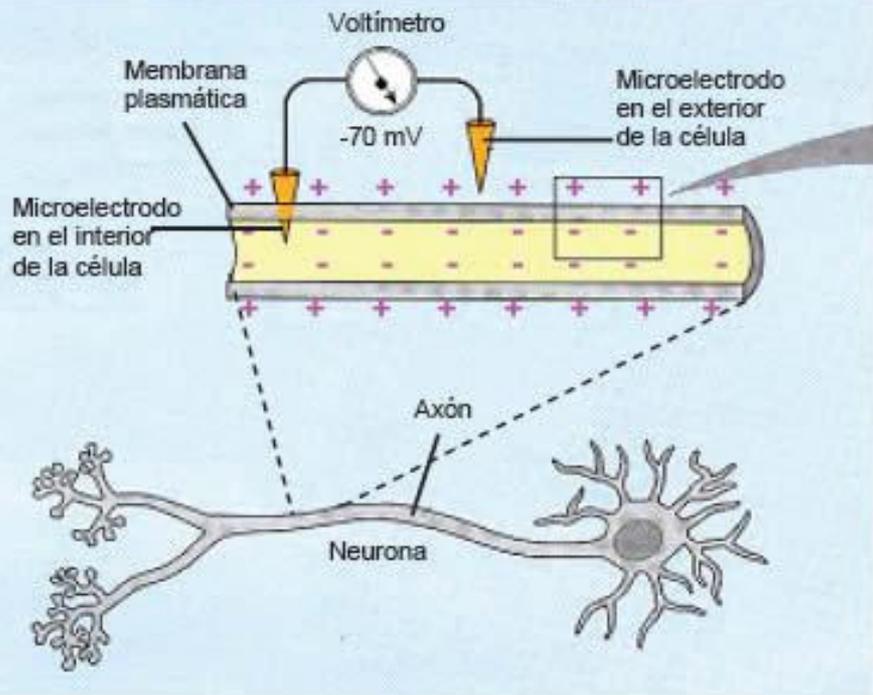


Microelectrodo de vidrio conectado a un voltímetro
(en medio extracelular)

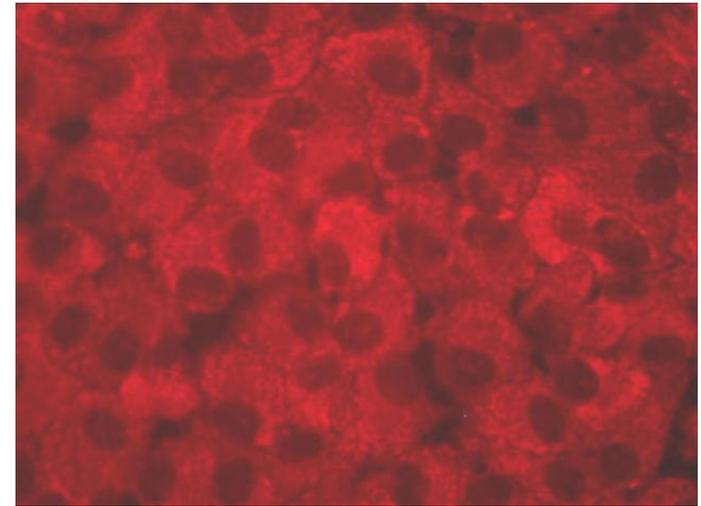
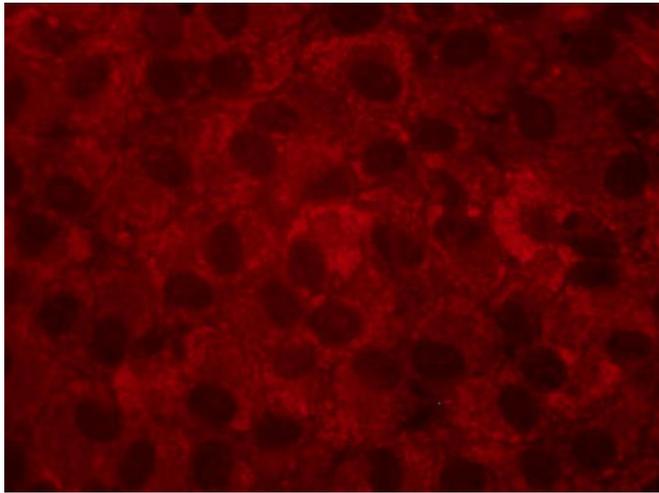
+

Microelectrodo lleno de solución electrolítica (ej. KCL)
(penetrando la membrana cel.)





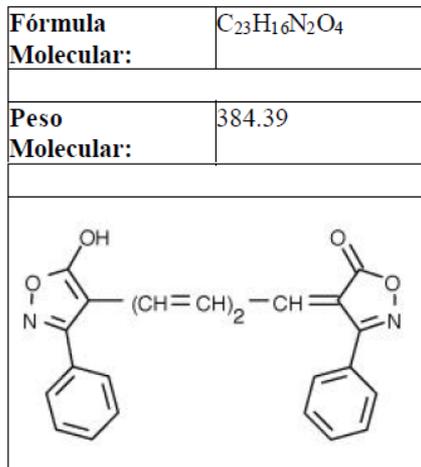
• Métodos de fluorescencia



- Agentes modificadores del potencial de membrana
- Oxonol V
- Microscopio de fluorescencia

Oxonol V

(bis-(3-phenyl-5-oxoisoxazol-4-yl) pentamethine oxonol)



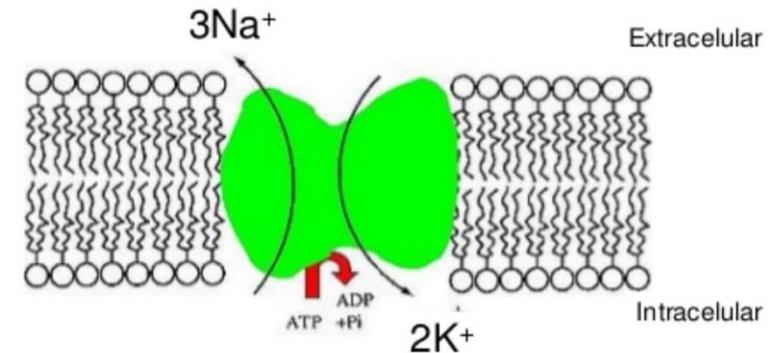
- Miembro de una familia de compuestos que se caracterizan por particionarse entre el medio extracelular y el medio intracelular de forma dependiente del ΔV_m
- Obedece a la ecuación de Nernst.
- Incremento intensidad de la fluorescencia → despolarización

¿CÚAL ES EL ORIGEN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA?

• Fuentes principales del potencial de membrana:

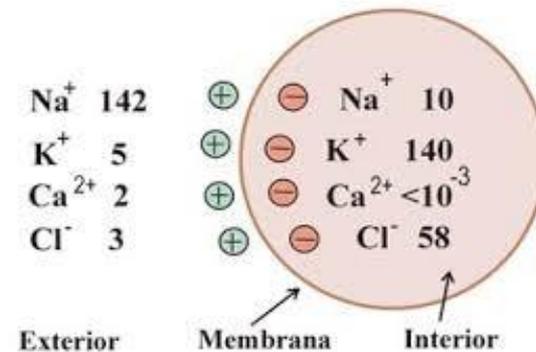
➤ Proteínas transportadoras acopladas a la hidrólisis de ATP

- Separan cargas → Electrogénicas
- Más importante: Bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$



➤ **Potencial de difusión**

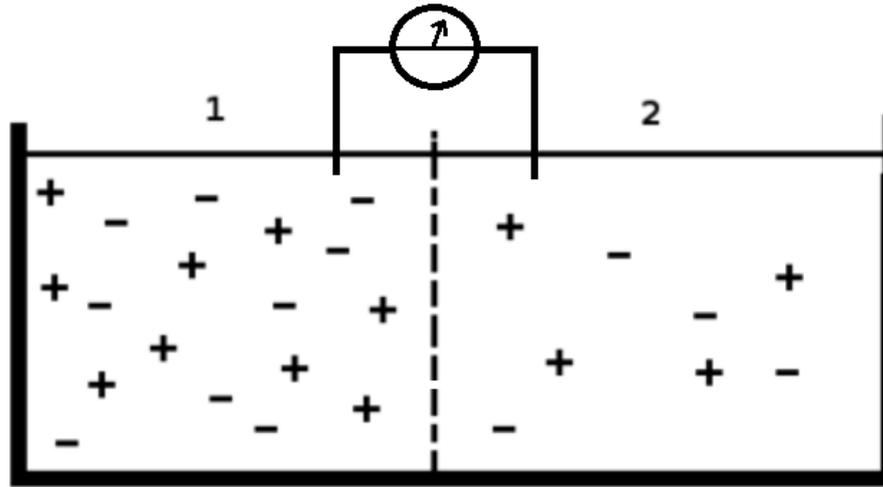
- Debido a la existencia de gradientes electroquímicos través de la membrana



Concentraciones en mM

POTENCIAL DE DIFUSIÓN

- Consideremos el siguiente modelo macroscópico:

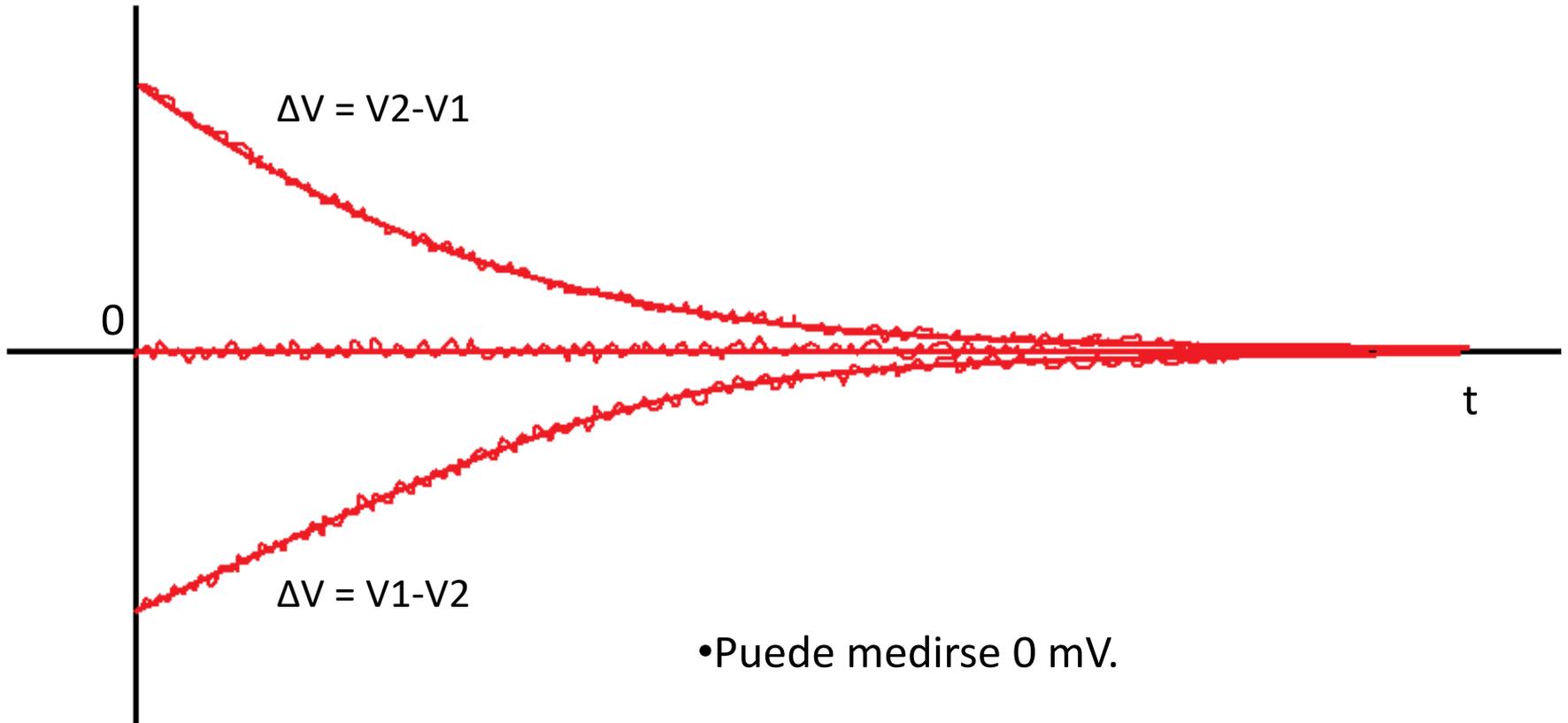


- Dos compartimientos (1 y 2) conteniendo un electrolito monovalente, separados por una membrana. $[\text{Electrolito}]_1 > [\text{Electrolito}]_2$.
- Tanto el catión (+) como el anión (-) son permeables a la membrana.
- No existe potencial eléctrico externo aplicado sobre el sistema, y tenemos un sistema de registro.

¿Qué ocurre con los flujos?

¿Se mide alguna diferencia de potencial eléctrico (ΔV) en algún momento?

- Tres posibilidades:



- Puede medirse 0 mV.

- Puede existir un TRANSITORIO (aumento o caída exponencial, según el sistema de referencia).

- ¿Cómo se explica la existencia del transitorio?

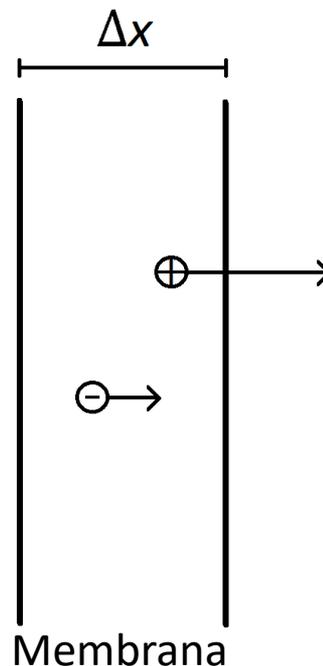
- **Movilidad diferencial de los iones (u_i).**

- Sus respectivas permeabilidades (P_i) a nivel de la membrana también serán distintas, ya que:

$$P_i = RTu_i\beta_i/\Delta x$$

(β_i , “coeficiente de partición”).

- Esto conlleva que haya una difusión más rápida del ión con mayor movilidad hacia el otro compartimento.



Ejemplo:

Movilidad del catión (u_+) es mayor que la del anión (u_-).

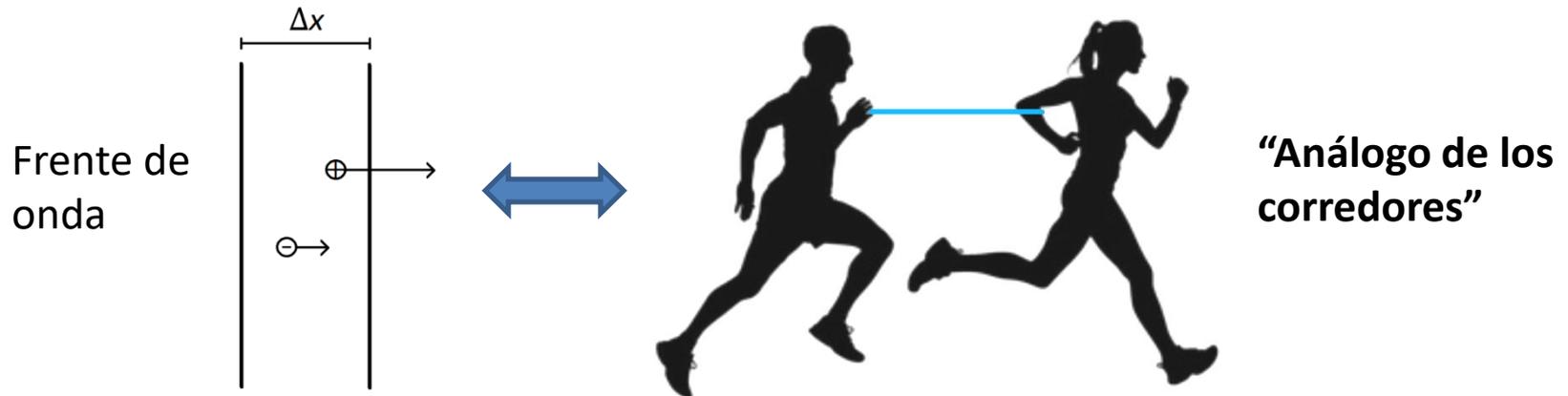
- Por otro lado, los dos iones difunden con la misma velocidad para no violar el **principio de electroneutralidad**.

“En ausencia de una corriente externa, la electroneutralidad de cada solución solo puede mantenerse si el flujo de cationes y aniones a través de la membrana es equivalente, para lo cual $J_+ = J_- = J_i$ ”.



$$I = I_+ + I_- = z_+ F J_+ + z_- F J_- = 0$$

- Esto significa que el ión más rápido difunde más despacio, frenado por el más lento.



- En el mismo tiempo, el ión más lento está acelerado por su ión opuesto.
- Como resultado, la difusión se realiza mediante una velocidad intermedia a la de los dos iones.

➤ Esta difusión de los iones crea una diferencia de potencial, que lleva el nombre de **potencial de difusión**.

$$\Delta V = - \frac{u_+ - u_-}{u_+ + u_-} \frac{RT}{F} \ln \frac{c^{int}}{c^{ext}}$$

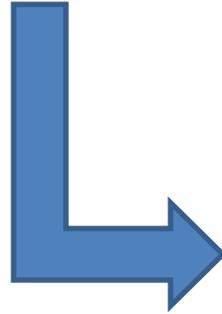
Ec. para el potencial de difusión de una sal formada por iones monovalentes

“El potencial de difusión es aquella diferencia de potencial que determina un flujo neto de carga nulo, a pesar de que ocurra la electrodifusión pasiva de iones con distinta permeabilidad”.

- Notar que si los iones tienen la misma movilidad, $u_+ = u_-$,  $\Delta V = 0$
- Por su parte, si $u_+ \neq u_-$, la condición de electroneutralidad sólo podrá ser satisfecha, si se genera un potencial de difusión ΔV que contrarreste la fuerza del gradiente de concentración.
- La orientación del mismo deberá ser tal que retarde el movimiento del ión con mayor movilidad y acelere el movimiento del ión con menor movilidad.

- ¿Qué pasa si la membrana es impermeable a uno de los iones (es decir, por ejemplo, si $u_+ = 0$)?

$$\Delta V = -\frac{u_+ - u_-}{u_+ + u_-} \frac{RT}{F} \ln \frac{c^{int}}{c^{ext}}$$



$$\Delta V = \frac{RT}{F} \ln \frac{c^{int}}{c^{ext}}$$

Ec. de Nernst

- El anión estará en equilibrio termodinámico.
- El ΔV obtenido corresponde al *potencial de equilibrio de Nernst*, el cual puede ser considerado como el equivalente eléctrico de la diferencia de concentración.

- **Ejercicio:**

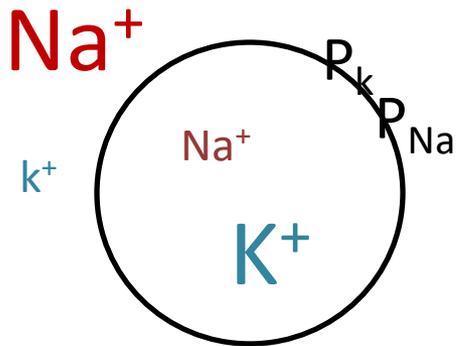
Comparar el potencial de difusión generado antes y después de aumentar la concentración de un electrolito formado por iones monovalentes, en el compartimiento interior por 2 veces.

- Ecuación de flujo de Goldman-Hodgkin-Katz o ecuación de campo constante

$$J_i = -\frac{p_i z_i F \Delta V}{RT} \left(\frac{[i]_{ext} - [i]_{int} \exp^{z_i F \Delta V / RT}}{1 - \exp^{z_i F \Delta V / RT}} \right) \quad \text{Ec. de flujo de GHK}$$

➤ A partir de ella se puede estudiar la dependencia del flujo de un componente a través de la membrana, de las concentraciones en cada uno de los compartimentos y de la diferencia de potencial existente entre ellos, cuando el sistema está en un estado estacionario.

➤ En condiciones de estados estacionario, permite deducir la **ecuación de voltaje de Goldman-Hodgkin-Katz**



$$I = I_{K^+} + I_{Na^+} = z_K F J_K + z_{Na} F J_{Na} = 0$$



$$\Delta V = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{P_K [K^+]_{ext} + P_{Na} [Na^+]_{ext}}{P_K [K^+]_{int} + P_{Na} [Na^+]_{int}} \right] \quad \text{Ec. de voltaje de GHK}$$

- **Deducción de la ecuación de voltaje de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)**

➤ Sustituyendo la ecuación de flujo de GHK

$$J_i = -\frac{p_i z_i F \Delta V}{RT} \left(\frac{[i]_{\text{ext}} - [i]_{\text{int}} \exp^{z_i F \Delta V / RT}}{1 - \exp^{z_i F \Delta V / RT}} \right)$$

en la expresión

$$I = I_{K^+} + I_{Na^+} = z_{K^+} F J_{K^+} + z_{Na^+} F J_{Na^+} = 0$$

$$z_{Na^+} = z_{K^+} = 1$$

➤ Se obtiene

$$-\frac{P_{K^+} F \Delta V}{RT} \left[\frac{[K^+]_e - [K^+]_i e^{\frac{F \Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{F \Delta V}{RT}}} \right] - \frac{P_{Na^+} F \Delta V}{RT} \left[\frac{[Na^+]_e - [Na^+]_i e^{\frac{F \Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{F \Delta V}{RT}}} \right] = 0$$

$$-\frac{P_{K^+}F\Delta V}{RT} \left[\frac{[K^+]_e - [K^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{F\Delta V}{RT}}} \right] - \frac{P_{Na^+}F\Delta V}{RT} \left[\frac{[Na^+]_e - [Na^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{F\Delta V}{RT}}} \right] = 0$$

➤ Continuando operando a partir de la expresión anterior:

$$F \left(-\frac{P_{K^+}F\Delta V}{RT} \left[\frac{[K^+]_e - [K^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{F\Delta V}{RT}}} \right] - \frac{P_{Na^+}F\Delta V}{RT} \left[\frac{[Na^+]_e - [Na^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{F\Delta V}{RT}}} \right] \right) = 0$$

$$F \cdot F\Delta V / RT = \text{cte.} \neq 0$$

$$\frac{-P_{K^+}[K^+]_e + P_{K^+}[K^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}} - P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{Na^+}[Na^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}}}{1 - e^{\frac{F\Delta V}{RT}}} = 0$$

$$-P_{K^+}[K^+]_e + P_{K^+}[K^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}} - P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{Na^+}[Na^+]_i e^{\frac{F\Delta V}{RT}} = 0$$

$$(P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i) e^{\frac{F\Delta V}{RT}} = P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{K^+}[K^+]_e$$

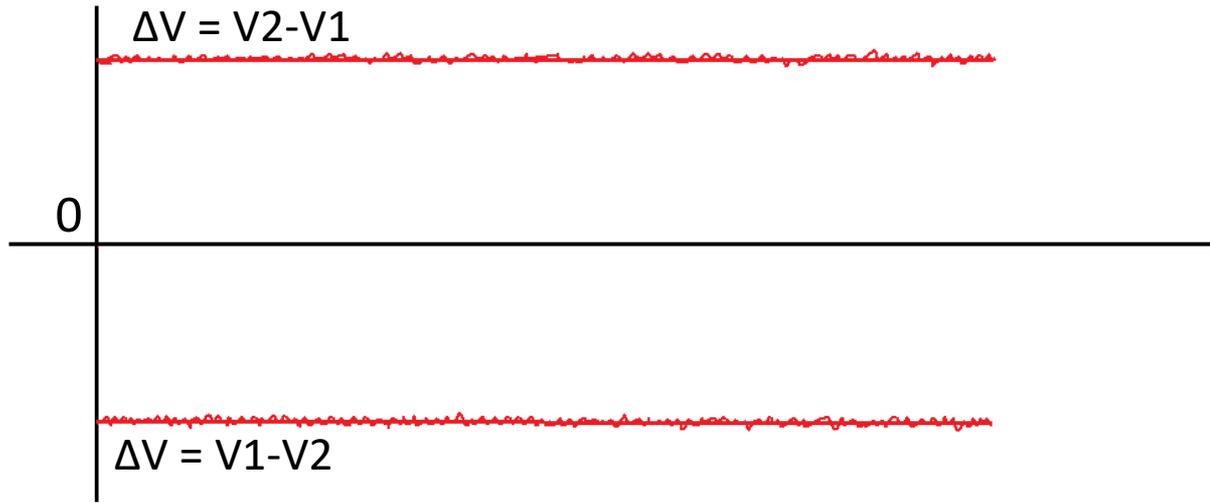
$$(P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i)e^{\frac{F\Delta V}{RT}} = P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{K^+}[K^+]_e$$

$$e^{\frac{F\Delta V}{RT}} = \frac{P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{K^+}[K^+]_e}{(P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i)}$$

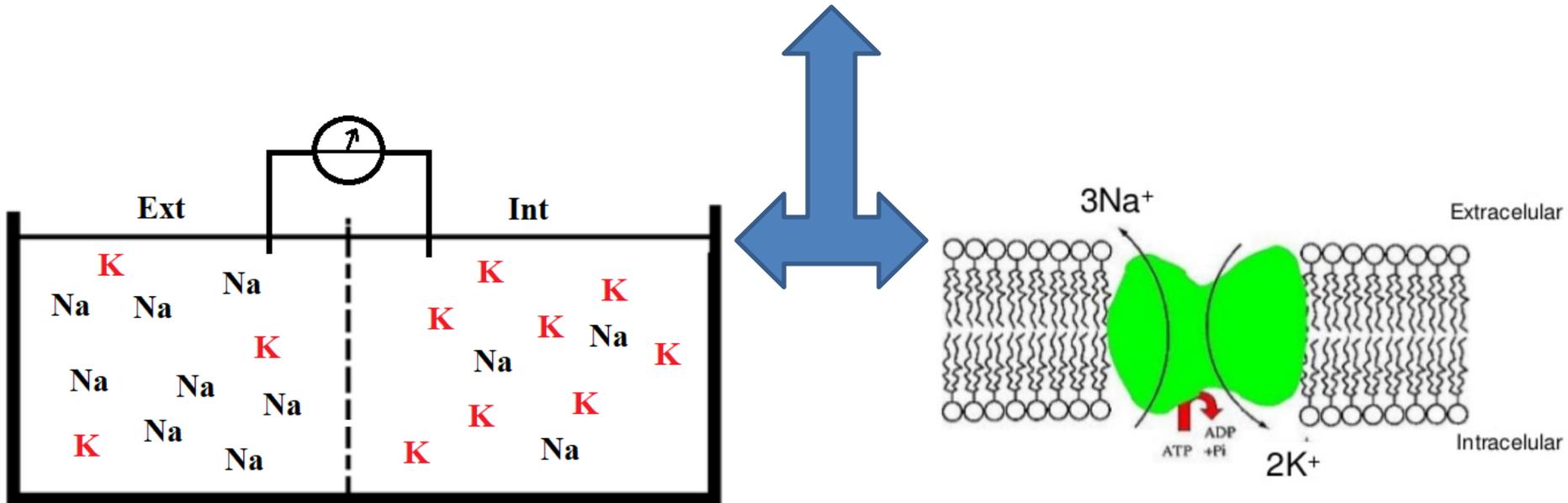
$$\Delta V = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{K^+}[K^+]_e}{(P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i)}$$

Ec. de voltaje de GHK

¿CÓMO SE MANTIENE EL POTENCIAL DE MEMBRANA ESTACIONARIO EN EL TIEMPO?



- Trabajo = Bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$
- Flujos activos (gasto 1ATP)



- La bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ mantiene los gradientes electroquímicos de iones de Na^+ y K^+ a través de la membrana, los cuales son fundamentales para el establecimiento del potencial de difusión.
- La Bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ es una ATPasa: mediante la hidrólisis de 1 molécula de ATP, transporta 3 Na^+ al exterior celular y 2 K^+ , en contra de sus respectivos gradientes de concentración.
- Balance neto: 1 carga + al exterior celular (electrogénica).
- Potencial de difusión explica ~ 90% del valor del potencial de membrana, mientras que la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ~ 10%.
- Dicha contribuciones se pueden calcular con mayor precisión a través de la ecuación de **Mullins-Noda** (o ecuación GHK modificada).

- Ecuación Mullins-Noda

$$\Delta V = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{dP_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e}{dP_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i} \right]$$

- $d = |\varphi_{Na}| / |\varphi_K|$ es la relación estequiométrica de la bomba (3/2 en el caso de los animales), siendo φ_{Na} y φ_K los flujos activos de Na^+ y K^+ , respectivamente.
- En el caso de $d = 1$, la ecuación anterior se reduce a la ecuación de voltaje GHK.
- Otros tipos de organismos presentan otros tipos de mecanismos, independientes de Na^+ y K^+ .

J. Physiol. (1967), **192**, pp. 237–256
With 3 text-figures
Printed in Great Britain

237

**THE INCORPORATION OF
INORGANIC PHOSPHATE INTO ADENOSINE TRIPHOSPHATE
BY REVERSAL OF THE SODIUM PUMP**

BY P. J. GARRAHAN* AND I. M. GLYNN

From the Physiological Laboratory, University of Cambridge

(Received 7 April 1967)

➤ La inversión de los gradientes de Na^+ y K^+ puede determinar la síntesis de ATP por parte de la Bomba Na^+-K^+ .

• Bibliografía

- Milo, R., & Phillips, R. (2015). *Cell biology by the numbers*. Garland Science.
- S. Chifflet, J. A. Hernández, S. Grasso y A. Cirillo. *Experimental Cell Research* 282, 1-13, 2003
- FERNÁNDEZ, Javier Buceta; KOROUTCHEVA, Elka Radoslavova; RUIZ, Juan Manuel Pastor. *Temas de biofísica*. Editorial UNED, 2012.
- BYRNE, J.H, SCHULTZ, S.G. *An introduction to membrane transport and bioelectricity*. Raven Press, New York, 1988.
- Garrahan, P. J., & Rega, A. F. (1977). Transporte a través de la membrana celular.
- Garrahan, P. J., & Glynn, I. M. (1967). The incorporation of inorganic phosphate into adenosine triphosphate by reversal of the sodium pump. *The Journal of Physiology*, 192(1), 237-256.