

Práctico N°1

Bases biofísicas del potencial de membrana en reposo.

Muchas funciones que lleva a cabo un ser vivo se basan en señales eléctricas generadas a nivel de la membrana de sus células. Existe, en condiciones de reposo (en ausencia de estímulos), una diferencia de potencial a través de la membrana celular conocida como potencial de membrana en reposo. Las “señales eléctricas” son cambios transitorios en este potencial de reposo. Pero para entender cómo cambia el potencial de reposo de la membrana celular, primero debemos comprender cuál es su origen.

El potencial de reposo de la membrana celular resulta de su permeabilidad selectiva principalmente al Na^+ , K^+ y Cl^- (la membrana celular presenta diferentes permeabilidades a los distintos iones) y de la distribución asimétrica de estos iones a ambos lados de la membrana (en los compartimientos intracelular y extracelular).¹

La distribución asimétrica de los distintos iones a ambos lados de la membrana se mantiene en el tiempo (estado estacionario) por diferentes mecanismos de transporte de solutos a través de la membrana. Sin embargo, aquellos iones capaces de moverse a través de la membrana que no se encuentran distribuidos en equilibrio, muestran una tendencia al escape desde uno de los compartimientos al otro. La “fuerza impulsora” que determina el flujo pasivo de un soluto iónico a favor de su gradiente electroquímico depende de cuán alejado del potencial de membrana se encuentra el potencial de equilibrio del ión (este último dado por la ecuación de Nernst).

Además, la contribución de cada especie iónica al establecimiento del potencial de membrana en reposo depende de la permeabilidad de la membrana celular a ese ión. Considerando las permeabilidades y concentraciones intra y extracelular de los tres principales iones, David Goldman, Alan Hodgkin y Bernard Katz dedujeron una ecuación para calcular el potencial de membrana en reposo (la *ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz*).

En esta actividad analizaremos los factores que determinan el potencial de equilibrio de los principales iones involucrados (Na^+ , K^+ y Cl^-) y su incidencia sobre el potencial de reposo de la membrana celular.

Para esto trabajaremos con un Programa Simulador en Software Libre “Macromedia Flash Player POTENCIAL DE REPOSO” (<http://www.nernstgoldman.physiology.arizona.edu/>).

Las figuras muestran el aspecto general de la pantalla inicial del simulador de registro del potencial eléctrico. El simulador permite optar entre aplicar la ecuación de Nernst (Figura 1) o aplicar la ecuación de Goldman (Figura 2) para calcular el potencial de equilibrio del ión o el potencial de membrana en reposo respectivamente.

Como se ve en las figuras, hay tres pasadores que permiten controlar las concentraciones intracelulares y extracelulares de los tres principales iones: K^+ , Na^+ y Cl^- . Al calcular el potencial de equilibrio de un ión a través de ecuación de Nernst, se tendrá sólo uno de los pasadores activos por vez, mientras que si se determina el potencial de membrana en reposo a través de la ecuación de Goldman, el simulador permite manipular todas las variables de los tres iones de manera simultánea (permeabilidad, concentración extracelular y concentración intracelular de cada ión).

¹También la acción de bombas iónicas electrogénicas en la membrana celular, como la ATPasa de Na^+ - K^+ , contribuye al establecimiento del potencial de reposo de la membrana, aunque en mucho menor grado.

Figura 1. Aspecto general de la pantalla del simulador en la aplicación Ecuación de Nernst.

Ecuación de Nernst y cálculo del potencial de equilibrio para el ión.

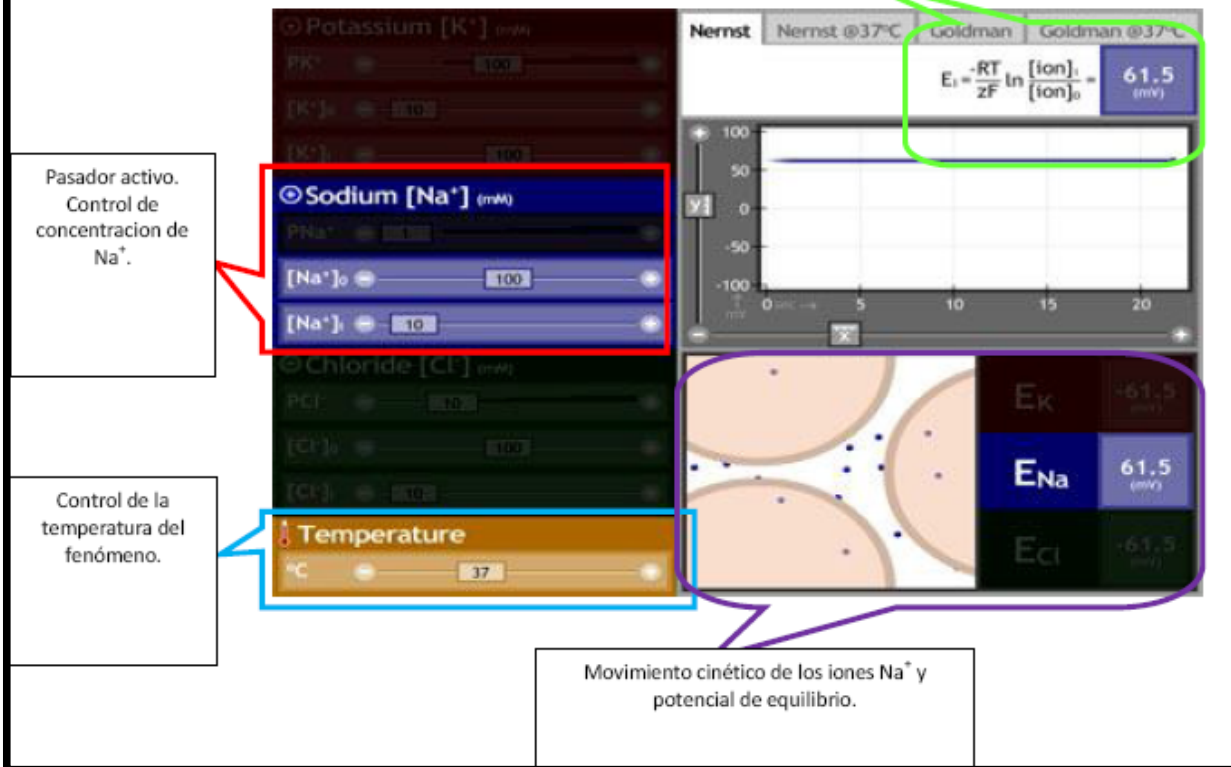
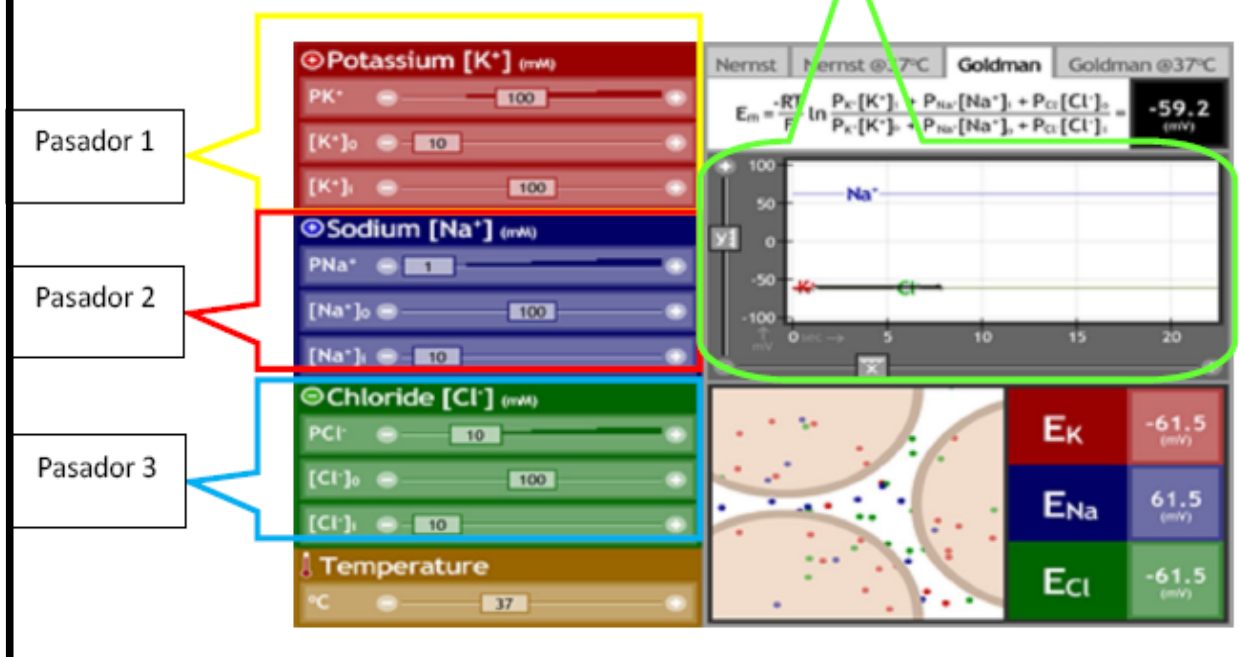


Figura 2. Aspecto general de la pantalla del simulador en la aplicación Ecuación de Goldman.

Registro en tiempo real del potencial de reposo celular.



Concentraciones Iónicas.

Las concentraciones intra- y extracelulares de cada ión pueden ser modificadas en el rango que va entre 1 y 600 mM. Al cambiar alguna de las concentraciones iónicas, la casilla del lado derecho de la pantalla del simulador indica en tiempo real el valor del potencial de equilibrio iónico o de reposo de la membrana celular en función del caso que se esté analizando.

Permeabilidad de Membrana

También es posible ajustar la permeabilidad de la membrana celular a cada ión (P_j) en un rango que va entre 1 y 10000. Este control sólo funciona al activar la ecuación de Goldman.

Temperatura

Un control del simulador permite modificar la temperatura. El valor indicado está expresado en °C, sin embargo en la ecuación de Nernst o Goldman el simulador automáticamente re-expresa la temperatura en grados Kelvin. El simulador también permite forzar las condiciones a una temperatura constante de 37 °C. En la ventana de la parte inferior de la pantalla se representa el movimiento de los iones presentes en la célula hipotética. Este movimiento se ve afectado al cambiar la temperatura de la simulación.

Constantes R y F

R es la constante para los gases, cuyo valor es de 8,314 J/K.mol

F es la constante de Faraday (la cantidad de carga eléctrica que hay en un mol de electrones) y esta tiene el valor de 96485 C/mol.

Ejercicios prácticos con el simulador de Potencial de reposo de la membrana celular

Luego de familiarizarse con el uso del simulador para el cálculo del potencial de equilibrio para cada ión (ecuación de Nernst), y para el cálculo del potencial de reposo de la membrana celular (ecuación de GHK), se deberán realizar los siguientes ejercicios y analizar cada uno de los fenómenos observados. Este análisis constituye el informe que deberá entregarse una vez finalizada la actividad.

PRIMERA PARTE: POTENCIAL DE EQUILIBRIO DE UN IÓN.

Ejercicio 1. Potenciales de equilibrio.

En las condiciones de inicio del simulador y a una temperatura de 37°C, determine el potencial de equilibrio para cada uno de los iones (K^+ , Na^+ y Cl^-). *Discuta las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos.*

Ejercicio 2. Efecto de la temperatura sobre el potencial de equilibrio de un ión.

i. Para cada uno de los iones, ajuste el cursor de la temperatura a un nivel superior al del inicio, y corra el simulador. *¿Qué observa en la cinética y el potencial de equilibrio para cada ión? Explique la razón de este cambio comparándolo con el estado inicial. ¿Cómo cambian sus respuestas si se disminuye la temperatura?*

ii. Elija uno de los iones y realice el estudio gráfico de cómo cambia el potencial de equilibrio del ión en función de la temperatura. Analice la gráfica obtenida y calcule a partir de la misma la relación entre las concentraciones extra e intracelular del ión elegido. Compare este resultado con el de su simulación.

Ejercicio 3. Efectos de las concentraciones iónicas.

Colocando nuevamente el pasador para el ión K^+ , habilite ahora el simulador en la función de ecuación de Nernst a 37 °C. El simulador cambia la expresión matemática empleada (parte superior derecha) *¿A qué se debe este cambio?*

i. Reduzca la concentración extracelular del ión K^+ a 2 mM y corra el simulador. *¿Qué sucede con el potencial de equilibrio para este ión? Discuta su observación.*

ii. Aumente la concentración extracelular del ión a 20 mM y corra el simulador. *¿Qué sucede en el experimento? Compare sus resultados con respecto a la experiencia previa.*

iii. Repita la simulación con los otros dos iones (sodio y cloro), disminuyendo primero la concentración extracelular y aumentando después esta concentración para cada ión. *Explique que observa en cada caso respecto al potencial de equilibrio de cada ión.*

iv. Ahora estudiaremos el efecto de los cambios en las concentraciones intracelulares de los iones sobre sus respectivos potenciales de equilibrio. Para ello debe tener en cuenta que las concentraciones extracelulares deben estar ajustadas a sus valores originales (10 mM para el K⁺, 100mM para el Na⁺ y 100mM para el Cl⁻). Realice este ajuste y *explique qué sucede con el potencial de equilibrio de cada ión al modificar su concentración intracelular (aumentar y disminuir).*

iv. Para cualquiera de los iones, *¿qué sucede con el potencial de equilibrio para el ión si se igualan las concentraciones extra e intracelular?*

v. Realice el estudio gráfico de cómo depende el potencial de equilibrio de un ión de :
- la concentración extracelular del ión;
- la concentración intracelular del ión;
- la relación entre las concentraciones del ión a ambos lados de la membrana (concentración extracelular/concentración intracelular)

A partir de esta última gráfica, *explique cómo puede determinar a partir del gráfico la temperatura a la que fue realizada la simulación. Determínela y compare su resultado con la valor de temperatura de la simulación.*

SEGUNDA PARTE: POTENCIAL DE REPOSO DE LA MEMBRANA CELULAR.

Para estudiar el efecto de la distribución de varios iones a ambos lados de la membrana sobre el potencial de reposo de la membrana activaremos la aplicación de ecuación de Goldman en el simulador. En esta aplicación se activan los pasadores para los tres iones y la ecuación que aparece en la parte superior derecha de la ventana corresponde a la ecuación de GHK.

El resultado de esta ecuación nos dará el potencial de membrana en reposo para las condiciones simuladas. Este potencial eléctrico estará expresado en milivoltios (mV).

Ejercicio 1. Potencial de membrana en reposo.

Determine el potencial de membrana en reposo en las condiciones iniciales a 37°C (las concentraciones de potasio intracelular y extracelular son 100 mM y 10 mM respectivamente. Las de sodio y cloro valen 100 mM en el medio extracelular y 10 mM en el intracelular).

¿Cuál es su valor?, ¿qué significa su signo?, ¿cómo es el campo eléctrico a través de la membrana?

En estas condiciones explique para cada especie iónica (K⁺, Na⁺ y Cl⁻) cómo sería la tendencia a moverse a través de la membrana si:

- sólo existieran diferencias de concentración del ión a ambos lados de la membrana;
- sólo existieran fuerzas de origen eléctrico sobre ese ión.

Ejercicio 2. Efecto de la temperatura sobre el potencial de membrana en reposo.

Corra el simulador del potencial de membrana en reposo a diferentes temperaturas y *discuta qué sucede con el resultado obtenido.*

Suponiendo que esta es una célula excitable, *explique cómo afecta la temperatura la excitabilidad de la célula.*

Ejercicio 3. Efectos de las permeabilidades iónicas sobre el potencial de membrana en reposo.

i. Seleccione la aplicación de la ecuación de Goldman a 37°C. En las condiciones iniciales, *¿cuál es el ión más permeable a la membrana en estado de reposo?*

ii. Modifique la concentración extracelular de cada ión tal cual se indica en la tabla (uno por vez teniendo la precaución de que las permeabilidades y las concentraciones de los otros dos iones sean las originales), registre el potencial de equilibrio de cada ión y el potencial de membrana obtenido en cada caso. Compare este último valor con el valor original del potencial de membrana (fila celeste). *¿Todos los cambios realizados afectaron de igual manera al potencial de membrana en reposo? Concluya sobre sus resultados.*

[K+]e	[K+]i	[Na+]e	[Na+]i	[Cl-]e	[Cl-]i	Ej (mV)			Em (mV)
						K+	Na+	Cl-	
10	100	100	10	100	10				
50	100	100	10	100	10				
10	100	500	10	100	10				
10	100	100	10	500	10				

iii. Ahora analizaremos cómo afecta la permeabilidad de un ión al potencial de reposo de la membrana celular. Para ello cambie la permeabilidad del potasio (PK+) a 10 y registre cuánto vale el potencial de membrana en reposo. Este cambio, *¿afecta al potencial de equilibrio del potasio? ¿Cómo explica las observaciones realizadas para el potencial de membrana y para el potencial de equilibrio del potasio?*

Para las concentraciones originales de potasio a ambos lados de la membrana, registre el potencial de membrana en reposo para valores menores y mayores al valor inicial de permeabilidad de potasio. Compare en cada caso el potencial de membrana en reposo con el potencial de equilibrio del potasio. Extraiga una conclusión al respecto.

Con un valor de 10 para la permeabilidad de potasio, modifique la permeabilidad del sodio a valores menores y mayores que el valor original. *Compare el potencial de membrana con el potencial de equilibrio del sodio y discuta el resultado obtenido.*