

Práctico 3 – Algunas propiedades de la membrana plasmática

PERMEABILIDAD DE MEMBRANA Y VIABILIDAD CELULAR

Objetivos:

- Analizar los fenómenos de ósmosis a través de la membrana plasmática de células animales y vegetales.
- Comprender los conceptos de permeabilidad de membrana, osmolaridad e isotonicidad y su importancia.
- Introducción a las pruebas de viabilidad celular mediante el uso de colorantes vitales.

1) PERMEABILIDAD DE MEMBRANA

Las membranas biológicas comparten una estructura general común. Están constituidas por una bicapa muy delgada de moléculas lipídicas (principalmente fosfolípidos) y proteicas (aproximadamente 5 nm de espesor) que forman estructuras dinámicas y fluidas. En microscopía electrónica de transmisión las membranas se observan como una estructura trilaminar debido a que la región ocupada por las cabezas de los fosfolípidos se tiñe con el tetróxido de osmio permaneciendo electrón-densa y la región hidrofóbica electrón lúcida. Una de las principales funciones que desempeñan las membranas es mantener las diferencias esenciales entre el medio intracelular y extracelular actuando como barreras selectivamente permeables.

Conceptos básicos:

1) Permeabilidad de membrana:

- *membranas permeables*: permiten el pasaje de todo tipo de moléculas.
- *membranas semipermeables*: permiten el pasaje de un sólo tipo de molécula.
- *membranas selectivamente permeables*: poseen diferentes grados de permeabilidad a distintas moléculas.

2) Tonicidad de una solución:

- *solución hipotónica*: menor concentración de solutos no difusibles con respecto al interior celular u otra solución.
- *solución isotónica*: igual concentración de solutos no difusibles con respecto al interior celular u otra solución.
- *solución hipertónica*: mayor concentración de solutos no difusibles con respecto al interior celular u otra solución.

* Soluciones hipo/iso/hiperosmóticas con respecto al interior celular: clasificación de soluciones independiente de la naturaleza del soluto (si el mismo atraviesa o no la membrana).

3) Ósmosis:

Movimiento de agua en respuesta al gradiente de concentración de solutos. La fuerza que ejerce este movimiento se conoce como presión osmótica. No todos los solutos ejercen el mismo efecto osmótico (concentraciones iguales de sales y de moléculas no ionizables no ejercen la misma presión osmótica).

4) Osmolaridad:

Es una medida de concentración que indica la presión osmótica ejercida por una solución. Depende del número de partículas disueltas en la solución independientemente de su naturaleza. La concentración fisiológica del interior celular es aproximadamente 0,3 osmolar. Es de suma importancia considerar esta condición para la preparación de toda solución que interactúe con células vivas.

Ejemplo:

- 1 mol de glucosa disuelta en 1 litro de agua (solución de glucosa 1 M) genera una solución 1 osmolar.
- 1 mol de NaCl disuelto en 1 litro de agua (solución de cloruro de sodio 1 M) genera una solución 2 osmolar debido a que el cloruro de sodio se disocia en Na^+ y Cl^- generando 2 partículas osmóticamente activas en la solución.

2) PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR

La determinación de la viabilidad celular es el conteo de las células vivas (sanas) o muertas en una muestra. Generalmente los métodos de determinación de la viabilidad se basan en el análisis de dos parámetros: actividad metabólica de la célula o integridad de membrana plasmática. Los métodos más comunes para evaluar la integridad de membrana y así determinar el índice de células viables en una suspensión celular son los test de exclusión de colorantes vitales (ej.: Azul Tripán). Las células vivas, cuyas membranas celulares estén integras, excluyen a estos colorantes en forma activa. El método del Azul Tripán pone en evidencia el funcionamiento de un mecanismo de transporte activo a través de la membrana plasmática. Por este procedimiento se visualizan las células mediante un microscopio y se cuentan las células muertas (azules) en el total de la muestra. Este método es utilizado por ejemplo previo a iniciar un cultivo, para determinar cuántas células vivas existen, permitiendo optimizar las condiciones de cultivo. Además, puede emplearse para determinar la eficacia de agentes terapéuticos en la búsqueda de drogas, o en tests toxicológicos.

Protocolo de obtención de células para iniciar un cultivo primario (no será utilizado en clase)

- Cortar los órganos en trozos de menos de 2 mm con 2 escalpelos en una gota de tampón salino (PBS, pH 7.2-7.4).
- Agregar 1-1,5 ml de solución de tripsina (en tampón salino pH 7,2 - 7,4, con EDTA).
- Incubar 15 min a 37° C y agregue aproximadamente 4 ml de medio de cultivo suplementado con suero.
- Pipetear repetidamente (sin hacer espuma) a fin de obtener una suspensión celular homogénea.
- Tomar una muestra de 500 μl y agregar 500 μl de solución de Azul Tripán diluida.
- Observar rápidamente al microscopio montando una gota entre porta y cubreobjeto.

Tampón fosfato salino (PBS) NaCl (8,0 g), KCl (0,2 g), Na_2HPO_4 (2,1 g), KH_2PO_4 (0,2 g), H_2O (1litro).

Solución concentrada de azul tripán: 200 mg de Azul Tripán en 50 ml de agua destilada.

Solución de uso de azul tripán: Diluir 4 veces en PBS la solución concentrada.

Tripsina: enzima proteolítica no específica.

EDTA: agente quelante de cationes divalentes.