

30
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGISTROS ELECTROFISIOLOGICOS EN
LINFOCITOS HUMANOS DE PACIENTES CON
ENFERMEDADES LINFOPROLIFERATIVAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ELVIA COBALLASE URRUTIA



MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pag
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	19
EQUIPOS Y METODOS	20
RESULTADOS	28
DISCUSION	34
CONCLUSION	38
BIBLIOGRAFIA	39

RESUMEN

A partir de los trabajos de Huxley y Hodgkin (11), se ha demostrado que todas las células vivas presentan un potencial de reposo característico que se conserva dentro de ciertos límites y que depende del estado fisiológico en que se encuentren éstas.

Por otra parte se ha observado también que cuando las células han alcanzado su máximo grado de diferenciación, el potencial de membrana tiende a estabilizarse.

Así, se han podido caracterizar algunas poblaciones celulares por el valor de su potencial de membrana. Sin embargo cuando las células se activan, el potencial de membrana se modifica, por lo que algunos autores lo han relacionado con la proliferación celular (36, 37, 40, 42, 44, 45, 46, 47, y 48).

Se sabe que durante la división celular, en general existe un cambio en la conductancia para los diferentes iones, lo que modifica en consecuencia el potencial de membrana (28).

En el caso de linfocitos de sangre periférica de humanos, se ha determinado por técnicas fluorimétricas que tienen un potencial de membrana que oscila entre -70 a -80 mV, y éste se modifica cuando las células son activadas por diferentes mitógenos (30, 36, 38, 41, y 43).

En diversos procesos patológicos como las leucemias se presentan múltiples alteraciones celulares, entre lo más significativo, esta la pérdida en la regulación de la proliferación, lo que les impide llevar a cabo sus funciones normales.

En el presente trabajo se utilizó la técnica de registros electrofisiológicos intracelulares y, se determinó que el valor del potencial de membrana de linfocitos de sangre periférica de humanos oscila en un intervalo de -60 a -70 mV en condiciones normales, se encontró que éste se modifica cuando las células se encuentran alteradas patológicamente, de acuerdo al tipo de leucemia que presente el paciente.

Con el análisis de varianza, se obtuvieron diferencias significativas para una $F_{0.05}(4,56) = 43.936$ entre los grupos en estudio. Con la prueba de Tukey se encontraron diferencias en todas las muestras con respecto al control.

INTRODUCCION

La célula está rodeada por una estructura altamente compleja denominada membrana plasmática. El núcleo y los orgánulos celulares también están rodeados por membranas, las cuales tienen diferencias en su estructura química y por lo tanto en sus propiedades funcionales respecto a la membrana plasmática.

Al tomar como modelo el propuesto por Singer y Nicolson (1), se sabe que la membrana plasmática, por lo general tiene aproximadamente 7.5 nm de espesor y está formada principalmente de proteínas y fosfolípidos. La parte fosfolipídica está constituida por una bicapa que consta de una zona altamente polar (hidrofílica, debido a la presencia de extremos terminales fosfatados cargados), por lo que es relativamente miscible en agua. Esto es importante ya que ésta es la parte expuesta al medio acuoso que baña al exterior de la célula y también se encuentra en la parte interna que está en contacto con el citoplasma. Tiene además una porción hidrofóbica, esta parte es apolar, sin carga, la cual se encuentra en la parte media del interior de la membrana, que es muy escasa en agua y formada generalmente por ácidos grasos.

La doble capa de lípidos es poco permeable al agua y la permeabilidad a otras sustancias depende del tamaño, de la solubilidad en lípidos y de las cargas de las partículas; la membrana celular es prácticamente impermeable a las proteínas intracelulares y a otros aniones orgánicos, que constituyen la mayor parte de los aniones intracelulares (2).

La composición química y la organización molecular de la membrana celular determina la permeabilidad, que regula la entrada y salida de sustancias de la célula, por lo que la membrana plasmática es fundamental para el mantenimiento de las condiciones intracelulares adecuadas.

Entre otros constituyentes de la bicapa se encuentra el colesterol, el cual modifica la fluidez de la membrana. Además encontramos distintos tipos de proteínas, algunas como proteínas estructurales únicamente y otras además con función enzimática. Sobresalen aparentemente al azar, hacia el interior (intrínsecas) o exterior (extrínsecas) de las células y se denominan generalmente proteínas periféricas, o bien atraviezan a la membrana de lado a lado y reciben el nombre de proteínas integrales. Ambos tipos pueden tener sus extremos unidos a lípidos (lipoproteínas), o a carbohidratos (glucoproteínas)(1).

De acuerdo a su función se pueden encontrar diferentes tipos de proteínas: como las involucradas en el transporte activo (ATPasas), o bien conductos que pueden abrirse o cerrarse y permiten el paso de iones, que pueden inducen cambios fisiológicos dentro de la célula (3).

El transporte de muchas moléculas a través de la membrana es altamente específico, ya que depende directamente de la propia estructura molecular, así como de la actividad que la membrana plasmática tenga en ese momento.

Las sustancias pueden atravesar la membrana celular por difusión pasiva, facilitada o por alguno de los mecanismos de transporte activo.

La difusión pasiva se produce cuando existe un gradiente de concentración y ocurre desde el lugar de concentración mayor, hacia el de concentración menor, y está en función del volumen de la partícula, de la carga eléctrica y del grado de solubilidad que tenga en los lípidos que integran a la membrana.

La difusión de iones depende de su concentración y de la existencia de gradientes electroquímicos a través de la membrana, y de la presencia de estructuras especializadas que le permitan el paso como poros y compuertas.

Para el transporte activo de las moléculas se requiere energía metabólica (ATP), y estar acoplada a los mecanismos celulares que la producen (4). Esquema 1.

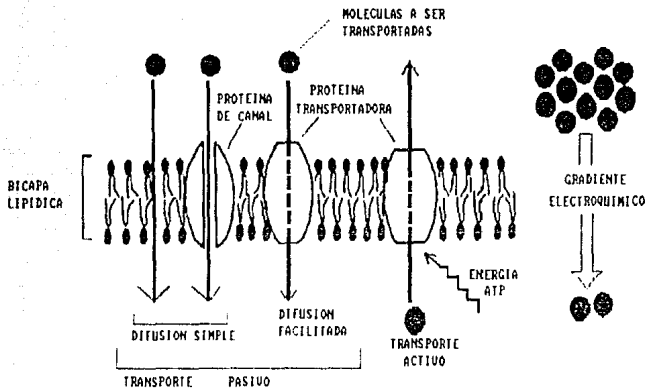
Hay proteínas que constituyen simplemente un conducto, este permite que los iones se difundan hacia el interior o exterior de la célula y se encuentran abiertos de manera continua; otro tipo de proteínas poseen dispositivos de compuerta que funcionan por alteración del potencial de membrana (compuertas de voltaje), otros se abren o cierran cuando se fija a ellos un ligando por ejemplo neurotransmisor u hormona (compuertas de ligando), otras proteínas de transporte son portadoras que fijan iones y otras moléculas, cambian su configuración, para mover a las moléculas captadas de un lado a otro de la membrana. Esquema 2.

Algunas moléculas de transporte son ATPasas, enzimas que catalizan la hidrólisis del ATP, la más conocida es la trifosfatasa de adenosina dependiente de magnesio activada por sodio y potasio, también llamada bomba de sodio y potasio (ATPasa de Na^+/K^+). Existen además ATPasas de hidrógeno, ATPasas de calcio, y ATPasas de potasio (5)

Otras proteínas de transporte se llaman uniportadoras porque transportan una sustancia en una sola dirección, otras se llaman simportadoras pues su transporte requiere de la fijación de más de una sustancia a ellas, otras se llaman antiportadoras porque intercambian una sustancia por otra (6). Esquema 3.

Fig 1.
Modelo teórico de la membrana celular con base en los datos tomados de 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

1. ESQUEMA DE TRANSPORTE PASIVO Y ACTIVO



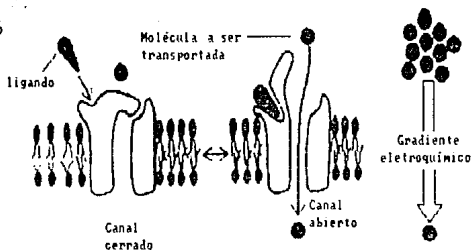
Fineman, J. B; Coleman, R; Michael, R.H. 1978
 Membranes and their Cellular Functions, 2nd.
 London: Blackwell, 42-67.

En la difusión simple la proteína transportadora presenta un canal que permite el paso libre de moléculas o iones. En la difusión facilitada se requiere de un transportador específico o permeasa y la energía utilizada es la propia energía cinética de las partículas al ser transportadas.

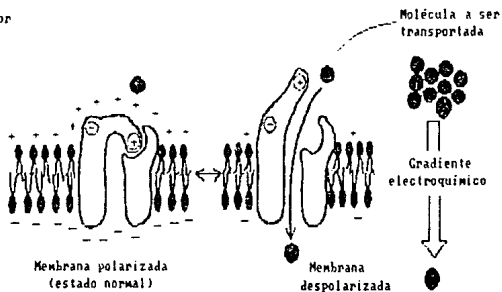
El transporte activo requiere de un acarreador específico, energía metabólica y puede realizarse en contra de gradiente electroquímico.

2. ESQUEMA DE DOS TIPOS DE CANALES IONICOS

A) Canal regulado por ligando



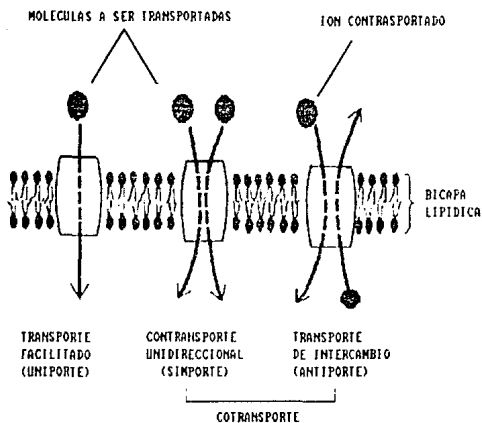
B) Canal regulado por voltaje



- A) Cuando el ligando se une a una proteína estructural, esa cambia parcialmente su configuración estereoquímica permitiendo la apertura del canal.
- B) Cuando se modifica el voltaje (movilización de iones) se induce un cambio en la conformación de la proteína que permite la formación de canales por donde viajan las partículas obedeciendo su gradiente.

Stevens, C. The Neuron.
1979. Sci. Am. 241:3-54-65.

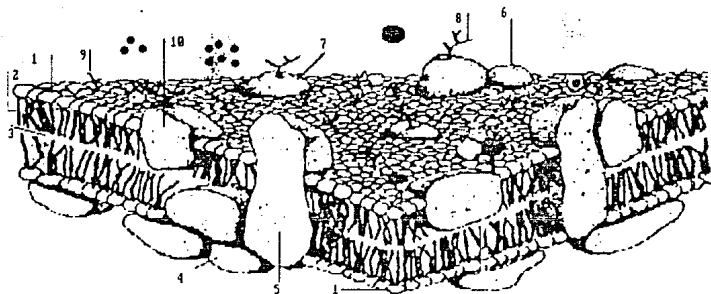
3. ESQUEMA DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE FACILITADO



Finean, J.B; Coleman, R; Michell, R.H. 1978.
Membranes and their Cellular functions, 2 nd.
London: Blackwell, 42-67.

Esquema de un corte transversal de membrana plasmática donde se muestra la presencia de proteínas acarreadoras que participan en el transporte de partículas siguiendo gradiente electroquímico.

FIGURA 1
 MODELO TEORICO DE LA MEMBRANA CELULAR CON BASE
 EN LOS DATOS TOMADOS DE 1, 2, 3, 4, 5 y 6



- 1 - FOSFOLÍPIDOS
- 2 - ÁCIDOS GRASOS
- 3 - COLESTEROL
- 4 - PROTEINA PERIFÉRICA INTRÍNSECA
- 5 - PROTEINA INTEGRAL
- 6 - LIPOPROTEÍNA
- 7 - GLUCOPROTEÍNA
- 8 - RECEPTOR
- 9 - CADENA DE CARBOHIDRATOS
- 10 - PROTEINA PERIFÉRICA EXTRÍNSECA

Debido al transporte activo de iones que se realiza en la membrana, así como al desplazamiento continuo de iones a través de ella, en todas las células existe una diferencia entre la concentración iónica intracelular y la del medio extracelular, por lo que se genera un potencial eléctrico conocido como potencial de membrana, o potencial de reposo (E_m); estas dos propiedades se encuentran íntimamente ligadas ya que el potencial eléctrico depende de la distribución desigual de iones en ambos lados de la membrana plasmática.

Son dos tipos de proteínas de transporte las encargadas de mantener el potencial de membrana en reposo, un conducto de fuga de K^+ , que permite que este ión se difunda al exterior de la célula, y la ATPasa de Na^+/K^+ dependiente de magnesio. El gradiente de concentración de K^+ facilita su difusión hacia el exterior pero el gradiente eléctrico está orientado en dirección opuesta por lo tanto se alcanza un estado en el que la tendencia del K^+ a salir de la célula se encuentra balanceada por su tendencia a moverse hacia el interior de la célula y además conserva baja la concentración intracelular de Na^+ al expulsarlo.

La bomba de Na^+/K^+ también es electrogénica porque impulsa Na^+ hacia el exterior de la célula por dos iones de K^+ que bombea hacia el interior, lo que da lugar al desplazamiento de otros iones que al estar cargados generan un potencial eléctrico (9 y 10). Durante más de medio siglo se ha ido comprobando que las membranas celulares se comportan como si fueran libremente permeables al K^+ , pero relativamente impermeables al Na^+ .

El desarrollo de la electrofisiología aparece íntimamente ligado al perfeccionamiento tecnológico, lo que ha permitido diseñar diferentes técnicas necesarias para determinar directamente valores de potencial de membrana celular.

El uso de electrodos intracelulares ha hecho posible determinar el potencial de membrana; las primeras técnicas fueron desarrolladas por Hodgking y Huxley (11), y Curtis y Cole (12), en el axón gigante de calamar por medio de un tubo capilar de 50 micrómetros de diámetro. Ellos reportaron que la magnitud del potencial de membrana en reposo depende de los gradientes de concentración y de la permeabilidad de la membrana a los iones, principalmente de K^+ y Na^+ .

Pocos años después Graham y Gerard (13), y Ling y Gerard (14) aplicaron la técnica de introducción de pipetas de diámetro muy pequeño con las que fué posible medir directamente el potencial de membrana de las células. Los potenciales de equilibrio que encontraron para cada uno de los iones fueron: $V_{K^+} = +89$ mV, $V_{Na^+} = -46$ mV, $V_{Cl^-} = +55$ mV observados in situ; los valores del potencial de membrana (E_m) para el axón gigante de calamar fueron de -50 a -75 mV.

A partir de estos estudios, la electrofisiología comenzó a ser más utilizada en la investigación; se experimentó con distintos tipos celulares y se demostró con esto que todas las células vivas presentan un potencial de reposo característico que se conserva dentro de ciertos límites como se muestra en la tabla A.

TABLA A
POTENCIALES DE MEMBRANA REPORTADOS PARA CELULAS
MUSCULARES Y NERVIOSAS

Tipo celular	Em(mV)	Año	Cita bibliográfica
Axón mielínico de rana	-71 ± 1.75	1951	Huxley y Stämflí 15
Fibra de Purkinje de perro	-90 ± 0.35	1951	Draper y Weidman 16
Aurícula de perro	-85	1952	Hoffman y Suckling 17
Fibra muscular esquelética de rata	-100 ± 0.2	1953	Bennett y Ware 18
Ventrículo de perro	-65 a -95	1953	Hoffman y Suckling 19
Célula de ganglio superior de conejo	-65 a -75	1953	Eccles 20
Soma de motoneurona espinal de gato	-70 ± 5.5	1955	Coomb, Eccles y Fatt 21
Célula piramidal de corteza de gato	-51 a -60	1955	Phillips 22
Fibra muscular lisa de intestino de conejo	+70	1958	Holman 23

En 1970 se hizo un resumen (tabla B) sobre los valores de potencial de membrana registrados en otros tipos de células y se observaron que los valores son menores que los obtenidos de células conocidas clásicamente como "excitables" citado en 24.

TABLA B

POTENCIALES DE MEMBRANA REPORTADOS EN CELULAS NO EXCITABLES

Tipo celular	Em(Mv)	Año	autores citados en 24
Células HeLa	-17.1	1968	Borley y Loveday
Fibroblastos	-70.0	1968	Swift y Todaro
Células L	-15.4	1971	Laneb y McKinnon
Células de neuroblastoma	-37.5	1971	Nelson y col

Las primeras investigaciones para saber si las concentraciones iónicas intracelulares y extracelulares variaban los potenciales de membrana fueron hechas por Cone (25,26, y 27), quien reporta que la variación en las concentraciones iónicas intracelulares correspondientes a los diferentes niveles de potencial de membrana, pueden jugar un papel importante en el control de la división celular, posiblemente a través de alteraciones específicas en los fenómenos metabólicos de la fase G1 del ciclo celular, con el consecuente bloqueo de la síntesis de ADN y la mitosis. Estas variaciones iónicas intracelulares siguen una secuencia acompañadas de diferentes niveles de potenciales que pueden ser un mecanismo del control de la mitosis. Cone observó que los intervalos de Em bajos (0 a -40 mV), no influyen en la actividad mitótica, los Em altos (-60 a -70 mV), dependen de las concentraciones iónicas del medio extracelular y son importantes para la división celular.

Al mismo tiempo se sabe que durante la división celular, en general existe un cambio en la conductancia para los diferentes iones, lo que modifica el potencial de membrana. Se desconoce a la fecha si estos dos procesos (el potencial de membrana o el flujo iónico) son causa o consecuencia de la proliferación celular.

A pesar de la diversa naturaleza de los factores inductores de la división celular por ejemplo: diferentes mitógenos, factores de crecimiento, flujos iónicos etc, las evidencias experimentales sugieren que el sitio de acción común es la membrana plasmática (28).

No se sabe si los factores que intervienen en la cascada de cambios iónicos y bioquímicos, cambios en la permeabilidad en la membrana plasmática, movilización iónica que modifica las concentraciones iónicas que influyen en el cambio de potencial de membrana, ó algunos segundos mensajeros que aumentan la transcripción, etc, puedan tomar parte en los diferentes eventos que inducen a la proliferación celular.

VALORES EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN LINFOCITOS NO ESTIMULADOS.

Se sabe que las concentraciones iónicas intracelulares y extracelulares están involucradas en una gran variedad de funciones, que pueden activar diferentes tipos de canales u otros sistemas de transporte, que pueden tener alguna relación con la activación de los linfocitos. Al investigar los procesos de activación de éstos, es como se ha estudiado el potencial de membrana.

Grinstein y Dixon (29), concluyen que hay diferencias en el valor del (E_m) de las células linfocíticas, al revisar los valores reportados cuando utilizan diversas técnicas.

El desarrollo del marcaje por radioisótopos y fluorescencia son las técnicas que más se han utilizado para obtener valores de potencial de membrana; se han empleado varios cationes lipofílicos como el trimetilmetilfosfonio (TPMP+), el tetrafenilfosfonio (TPP+); pruebas fluorescentes con oxonol (31), y cianina (30, 32, y 33). Se han encontrado valores de potencial de membrana de varios tipos de células sanguíneas como se muestra en la tabla C.

Se ha observado que el cambio en el potencial de membrana en estas células, se da básicamente por las concentraciones extracelulares de K^+ , pero también puede haber una conductancia al Na^+ , aunque algunas investigaciones han encontrado que hay una significativa dependencia del Cl^- extracelular (34).

TABLA C

ESTIMACIONES CUANTITATIVAS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN DISTINTOS TIPOS DE CELULAS LINFOCITICAS NO ESTIMULADAS.

Método	Fuente de obtención de las células	Em(mV)	Ión determinado	Cita
Cianina	Bazo de ratón	-60	K+ extracelular	30
MEIC*	**SPH	-12	No determinado	33
"	SPH	-8	K+ extracelular	35
H+-TPMP+/ H+-TPP+	SPH	-52	K+ extracelular	36
"	Varios	-56a-74	K+ extracelular	37
"	Nódulo linfático de cerdo	-56	K+ y Cl- extracelular y ATPasa Na+/K+	38
"	SPH	-53	K+ extracelular	39
"	Timo de ratón	-50	No determinado	40
Bis-oxonol	Bazo de ratón	-70	Na+ y K+ extracelulares	41
"	Célula B de amígdala humana	-44	No determinado	42

*MEIC= micro electrodos intracelulares ** SPH=sangre periférica de humano TPMP+=trimetilfosfonio TPP+= Tetrafenilfosfonio

En conclusión, en el caso de los linfocitos humanos no estimulados se ha determinado que tienen un potencial de membrana de -70 a -80 mV y que se debe primordialmente a la difusión de K+ y en una menor contribución al Na+ (30, 36, 38, 41, 43).

**CAMBIOS EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA ASOCIADOS CON LA ACTIVACION
EN LINFOCITOS**

En cuanto al cambio en el valor del potencial de membrana como consecuencia de la activación por mitógenos en linfocitos, no hay un acuerdo por las diferentes estimaciones cuantitativas.

En la tabla D se observan algunos tipos celulares en que se han utilizado los mitógenos para activarlos y el cambio en el potencial de membrana observado por diferentes métodos.

TABLA D

Tipo de linfocito	Factor Estimulante	Método	Cambio en el Em	Cita
Células T de ratón	Con A	H ⁺ -TPP ⁺	Despolarización tardía 3 horas	37
LSPH (mezcla)	"	"	No hay cambio después de 2.5 horas	38
Linfocitos de cardoalecía!	"	"	Despolarización temprana 2.5 minutos	44
Tinocitos de ratón	"	"	Hiperpolarización temprana 5 minutos	44
Tinocitos de ratón	"	Tinción oxonol	Hiperpolarización temprana 2 a 3 minutos	45
Linfocitos de ratón	"	"	"	46
LSPH (mezcla)	Con A PHA	Tinción cianina	Despolarización temprana 15 minutos	40
Células B de ratón	LPS	H ⁺ -TPP ⁺	Despolarización tardía 3 horas 47	
LSPH células T	ConA PHA	Tinción oxonol	Hiperpolarización temprana 1 a 2 minutos	31
Células B de ratón	Anti Ig LPS	Tinción cianina	Despolarización tardía 1 a 2 horas 48	
Células B humanas	Anti Ig	Tinción oxonol	Hiperpolarización temprana 1 a 2 minutos	42

ConA= Concanavalina A PHA=Fitohemaglutinina LPS=Lipopolisacáridos
LSPH=Linfocito de sangre periférica de humanos
TPP⁺= Tetrafenilfosfonio TPMP⁺=Trifenilmetilfosfonio

Como se observa en la tabla anterior y se verá más adelante hay evidencias en las cuales los investigadores han asociado la activación de los linfocitos con ciertos patrones de cambio del potencial de membrana .

CAMBIOS DEL pH EN LINFOCITOS

Se ha obtenido el pH intracelular (pHi) de diversos tipos de linfocitos mediante varios métodos para poder apreciar si hay relación con la proliferación celular, se han observado cambios de pHi después de la estimulación mitogénica en linfocitos en los primeros minutos posteriores a la adición de agentes promotores de la proliferación y en fases tardías del ciclo celular (49 a 65).

En estudios con Con A (49 y 50), IL-2 (51), anticuerpos agonistas del complejo receptor de células T3 (52), ionóforos de Ca^{++} (53 y 54), ésteres de forbol (55), se observó la alcalinización del citoplasma de 0.1 a 0.2 unidades de pH en células T.

De la misma manera los lipopolisacáridos, ésteres de forbol (56), IL-1 (57), elevan el pHi en células B alrededor de 0.2 unidades de pH.

Gerson y colaboradores (58 y 59), reportan cambios tardíos en el pHi en linfocitos en proliferación; observan dos fases de alcalinización: 1) un pico después de 6 a 8 horas de la adición del mitógeno y 2) otro pico después de dos días. Otros resultados obtenidos en células T y B de bazo de ratón estimuladas con LPS y Con A, también muestran cambios tardíos (60).

Los trabajos hechos por Gerson y Kiefer (61), reportan el valor de pHi más alto en linfocitos estimulados en fase S del ciclo celular que fue de 7.4 y en células en fase G₀, G₁ y G₂, en donde los valores fueron 7.1 y 7.2, sin embargo en células T estimuladas con IL-2 el pHi no excedió los niveles de 6.8 a 7.4 de pH que son los intervalos en que se encuentra el pHi de las células inactivadas, por lo que se sugiere que la alcalinización intracelular no es esencial para la multiplicación celular.

Rosoff y Cantley (62 y 63), reportan cambio de pHi intracelular hacia lo alcalino, también encontraron cambios de pH al utilizar ésteres de forbol. Stanton y col(64), reporta cambios de pH citoplasmático al utilizar IL-1, y todos ellos relacionan al antitransporte de Na^+/H^+ y el posible papel de la regulación de pH citoplasmático en la linfoproliferación y diferenciación celular.

Grinstein y col (65), indican que la relación de la entrada y salida de Na^+ e H^+ es 1 a 1 por lo que el cambio no es significativo para el potencial de membrana además de electroneutral, así, el cambio de iones se combina con el gradiente electroquímico de Na^+ y H^+ sin afectar el pH.

Las evidencias anteriores nos muestran que el cambio en el potencial de membrana pueden depender del antitransporte de Na^+/H^+ y el cambio en el pH y el potencial de membrana son eventos independientes, pero que de alguna manera intervienen en la linfoproliferación.

CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE SODIO DURANTE LA ACTIVACION

Cuando las células se encuentran activadas, el Na^+ es el catión más ampliamente distribuido en el citoplasma, tiene un rápido equilibrio a través de la membrana plasmática de las células linfoides (66 y 67), esto indica la presencia de mecanismos de transporte que son efectivos como la bomba de Na^+/K^+ , transporte de Na^+ , cambios de Na^+/Na^+ , Na^+/H^+ etc.

CONDUCTANCIA AL Na^+

A pesar de la gran permeabilidad de la membrana del linfocito al Na^+ la conductancia de este ión es baja.

La conductividad al Na^+ se ha detectado con técnicas de "patch-clamp" o de fijación de voltaje, y se encontraron pequeñas corrientes de voltaje, que fueron similares en células T de ratón y en varias líneas de células T de humanos (68). Al utilizarse tetradotoxina, estas corrientes se bloquearon por lo que se confirma la presencia de canales de Na^+ sensibles al voltaje; también se encontraron canales de Na^+ en alta densidad en líneas de células citotóxicas (69 y 70), aunque no parecen tener un papel en su función citotóxica.

BOMBA DE Na^+/K^+

La importancia de la bomba de Na^+/K^+ para la fisiología de la célula ha sido motivo de varios estudios.

Se ha cuantificado el número de bombas de Na^+/K^+ en linfocitos tratados con 3H-ouabaina, y se calcula que son alrededor de 32,400 a 40,000 sitios por célula (71 y 72), y en células B y T de humanos con leucemia linfocítica crónica (LLC), observaron que el número de bombas disminuye (71).

Se sabe que las concentraciones de Na intracelular aumentan después de la adición de lectinas en células T (73,74,75 y 76), y es suficiente para activar la bomba de Na^+/K^+ , esto también sucede en células B tratadas con una gama amplia de estimulantes de agonistas de Ig (77 y 78), y en líneas de células T tratadas con IL-2 (79), esto se sabe por los reportes de incremento de la bomba de Na^+/K^+ determinado con ouabaina y PHA (80 y 81); se sabe que la contribución electrogénica de la ATPasa de Na^+/K^+ , al (Em) es de más o menos -7mV para restituir el potencial de membrana (38).

CAMBIOS DE Na⁺/H⁺

El cambio de Na⁺/H⁺ en diferentes tipos de células linfoides se ha demostrado utilizando varias técnicas. La actividad del antitransporte de Na⁺/H⁺, se ha detectado en linfocitos de ratón (82, 83 y 84), en linfocitos humanos, y en líneas de células T de ratón y humano (85 y 86), y en células B (56, 57, 85 y 87). En estos estudios se demuestra que el antitransporte de Na⁺/H⁺ tiene un papel importante en la linfoproliferación celular y la diferenciación.

La importancia del Na intracelular se asocia con un incremento en el flujo de Na⁺ tanto afuera como hacia adentro; esta activación es imprescindible para que se active el principal mecanismo, la ATPasa de Na⁺/K⁺ que involucrará a los diferentes mecanismos en los cuales interviene el Na⁺, K⁺ y otros iones que contribuyen a los cambios del potencial de membrana.

CAMBIOS DE CONCENTRACION DE POTASIO DURANTE LA ACTIVACION

La primera conclusión de la existencia de canales de K⁺ activados por calcio en los linfocitos, fue propuesta por Rink y Deutsch (30), los que utilizaron quinina y 3,3'dipropiltiadicarboxiamina yodada (diSC3(5)), que bloquea los canales de K⁺ activados por Ca⁺⁺, y causan despolarización en linfocitos de bazo de ratón, la despolarización en linfocitos volvió a ser reportada en células de timo de ratón (38 y 88), y en linfocitos de bazo (30).

CANALES DE K⁺ DEPENDIENTES DE VOLTAJE

DeCoursey y col (89), y Matteson y Deutsch (90), encontraron corrientes que abrian canales y despolarizaban a la célula; estos canales de K⁺ dependientes de voltaje se encontraron en células citotóxicas (68 y 91), timocitos de ratón (66), y en células B de humano (70 y 92).

Fukushima y Hagiwara (93), encontraron dos tipos de canales de K⁺, dependientes de voltaje en células T de humanos, uno de 9 picosegundos(ps) y otro de 16 ps, la conductancia era de 4.2 nanosegundos (ns), estimando una densidad de 400 canales por célula (93, 94, y 95), estos autores concluyen que los procesos de activación o inactivación están mediados por uno o dos tipos de canales para restituir el potencial de membrana.

Cuando los canales de K⁺ activados por Ca⁺⁺ son estimulados se produce una hiperpolarización; Gelfand y col (43), reportan que al adicionar fitohemaglutinina (PHA) en células T de sangre de humano hay una hiperpolarización que cambia el potencial de reposo entre -10 a -15 mV; Deutsch y col(96), Schlichter y col (97), detectan cambios en los canales de K⁺ dependientes de voltaje en células T de humanos activados por PHA, ésteres de forbol.

Las evidencias indirectas implican a los canales de K⁺ sensitivos al voltaje en la secuencia de iniciación de la proliferación, estos canales al ser bloqueados inhiben la síntesis de ADN (70, 89 y 98) en células de ratón; se ha propuesto que estos canales de K⁺ están involucrados en los eventos citotóxicos (91 y 99).

CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE CALCIO DURANTE LA ACTIVACION

El calcio es conocido como uno de los segundos mensajeros, interviene en una gran variedad de procesos celulares por ejemplo: transporte de iones, secreción, proliferación, etc. Los sistemas que intervienen en su translocación son ATPasa de Ca^{++} y canales de calcio principalmente.

Las evidencias que se han encontrado para relacionar los cambios de calcio extracelular y calcio intracelular, con la activación de los linfocitos, son muy variadas por lo que los resultados aún no son precisos. Por ejemplo, se sabía que los iones de calcio se requerían para continuar la proliferación y este requerimiento era diferente si se trataba de células normales o transformadas; sugerían que los cationes divalentes calcio y magnesio regulan mutuamente el crecimiento y que el efecto del calcio sobre la proliferación celular puede reflejar una interacción entre el calcio y los sitios de encadenamiento del magnesio; estas observaciones revelaron que los cationes divalentes tienen un papel primordial en la regulación del crecimiento porque al estimularse las células se observa inicialmente la movilización del calcio extracelular; estas movilizaciones afectan los polisacáridos a los cuales se encuentran encadenados y son ellos los que sufren los cambios en la función en la regulación (100), en experimentos realizados por Fredman y Raff (101), en células T de ratón encontraron que al estimularse con ConA hay un incremento en la concentración de calcio extracelular.

Las técnicas fluorescentes han revelado que en células T hay un incremento en la concentración de calcio intracelular al ser estimuladas con ConA y PHA (32, 102, y 103), y antígenos específicos (104), y concluyen que esta elevación en la concentración de calcio intracelular es sostenida por una concentración de calcio extracelular que induce a la proliferación

En células B los cambios de concentración de calcio intracelular también se han asociado con la activación; Fredman y Raff (101), observaron que en células B estimuladas con mitógenos, el flujo de calcio es en los dos sentidos. Braun y col (105), y Pozzan y col (106), al estimular linfocitos B con anti Ig observaron que hay un incremento en el flujo de Ca^{++} intracelular, con esto propusieron que las anti Ig inducen la liberación de Ca^{++} de los calcisomas con la consecuente señal de la linfoproliferación.

Se ha observado la actividad de la ATPasa de Ca^{++} en linfocitos T al ser estimulados por lectinas (107); Lichtman y col (108), reportan que al inducir a linfocitos T con ConA o PHA, la ATPasa de Ca^{++} se estimula.

También se han encontrado en células T canales de calcio activados por ligando, estas investigaciones hechas por Gelfand y col (102), reportan que hay una despolarización y un incremento de concentración de calcio intracelular.

Fukushima y Hagiwara (93, 109, y 110), han encontrado canales de Ca^{++} activados por voltaje en líneas de células B neoplásicas de ratón, estos canales pierden selectividad y permiten el pasaje de cationes monovalentes los que cambian el potencial de membrana.

Los estudios hechos por Gelfand y col (111), demuestran que para la inducción a la proliferación se requieren concentraciones altas de calcio extracelular durante las dos primeras horas de estimulación con lectinas y esto es importante para la mitogénesis.

Las evidencias que se presentan pueden estar asociadas con los cambios en la concentración de calcio intracelular y la activación del linfocito.

Así la importancia del potencial de membrana relacionado con la linfoproliferación, aún es controversial, ya que son muchos los fenómenos implicados. Sabemos que al ser estimulados los linfocitos se produce una rápida alteración en la membrana celular, lo que da una gran permeabilidad al K^+ , Na^+ y Ca^{++} principalmente, esto desencadena un aumento en la ingestión de hexosas, amino ácidos, nucleósidos y Ca^{++} los cuales son esenciales en la mitogénesis del linfocito.

La figura 2 muestra un diagrama representativo de los diferentes fenómenos que suceden durante la activación de los linfocitos.

FIGURA 2

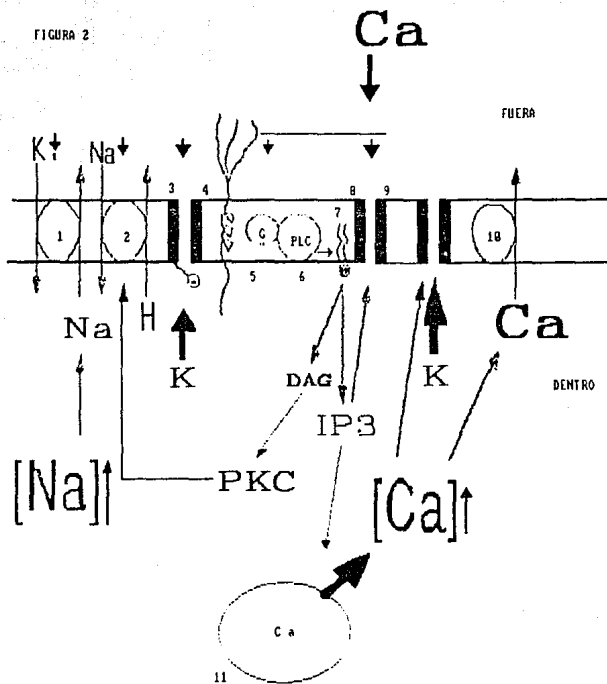


DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LOS DIFERENTES FENOMENOS QUE SUCEDEN DURANTE LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS

- | | |
|---|--|
| 1- BOMBA DE Na^+/K^+ | 6- FOSFOLIPASA C (PLC) |
| 2- ANTI-TRANSPORTE Na^+/H^+ | 7- FOSFATIDILINOSITOL |
| 3- CANAL DE K^+ SENSITIVO AL VOLTAJE | 8- CANAL DE Ca^{++} |
| 4- RECEPTOR GENÉRICO | 9- CANAL DE K^+ ACTIVADO POR Ca^{++} |
| 5- PROTEINA ASOCIADA AL GTP (G) | 10- BOMBA DE Ca^{++} |
| | 11- CALCISOMA |

PHYSIOLOGICAL REVIEWS. 1989. 69:2-472.

Grinstein, S., Dixon, S. Ion transport membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation

No se sabe que es lo que da origen al cancer, si son cambios medioambientales, fisiológicos o genéticos. Se han sugerido algunos parámetros para diferenciar a las células cancerosas, pero por su heterogeneidad en las diferentes células y su variedad genética, bioquímica, enzimática, inmunológica y biológica etc, no se ha podido llegar a un acuerdo.

Aparentemente los genes que controlan el crecimiento y las interacciones de las células cancerosas con sanas, son anormales en su estructura y/o en su regulación.

Se sabe que hay eventos intracelulares y extracelulares que pueden alterar la estabilidad celular y los mecanismos que modifican la diversificación, estos eventos no tienen la misma importancia y solo algunos pueden ser relevantes para que se de la proliferación.

Probables eventos que modulan el fenotipo de la célula tumoral y los mecanismos de diversificación (112).

I.- Eventos Intracelulares

1.- Cambios Nucleares

A) Alteraciones Cromosómicas

- *Ruptura
- *Duplicación\pérdida
- *Matriz\ Interacciones en la membrana
- *Regiones con tinción homogénea
- *Complejos transcripcionales
- *Complejos de replicación

B) Alteraciones ADN

- *Mutaciones
- *Translocaciones
- *Elementos transponibles
- *Delecciones
- *Amplificaciones
- *Oncogenes\ Virus
- *Genes supresores
- *Errores en la replicación del ADN
- *Errores en la reparación del ADN

C) Cambios citoplasmáticos

- *Alteraciones citosólicas
- *Segundos mensajeros
- *Protein kinasas
- *Iones
- *Cofactores
- *Metabolitos

- D) Alteraciones Citoesqueleto
 - *Organización
 - *Interacción con la membrana
- E) Cambios en la síntesis de proteínas
 - *Postranscripcional
 - *Postraducciona

II.- Eventos Extracelulares

- A) Interacción entre célula y célula
 - *Fusión de células
 - *Contacto de células
 - *Unión de células
- B) Factores de Interacción en la célula
 - *Hormonas
 - *Factores de crecimiento
 - *Factores de diferenciación
 - *Factores de Tejido\Organo
- C) Interacciones en la matriz celular
 - *Receptores en la matriz
 - *Cambios en la forma de la célula
 - *Estroma
- D) Efectos Iatrogénicos
 - *Terapia de radiación
 - *Quimioterapia
 - *Terapia Biológica

Los microambientes son importantes en la determinación del fenotipo de las células tumorales, la diferencia en los microambientes que inducen eventos que encabezan formas tumorales, además de las interacciones celulares como nutrientes, factores de crecimiento, oxígeno, hormonas, enzimas, iones y otros posibles reguladores tumorales, juegan papeles importantes en la determinación de cambios genéticos.

El microambiente extracelular del tumor está determinado por lo sintetizado en la matriz de la célula alterada, estos componentes son secretados y se infiltran a otras células modificando sus microambientes, estos cambios pueden modular la expresión génica y propiedades fenotípicas de la célula (112).

En las leucemias se presentan múltiples alteraciones en las células dañada, lo más significativo es la pérdida en la regulación de la proliferación, lo que determina que se dividan continuamente y lleven a cabo sus funciones de acuerdo con el tipo de leucemias, son distintas poblaciones las que se ven afectadas.

La desregulación del control de la replicación celular parece ser el paso inicial del crecimiento neoplásico y, aunque no se conocen exactamente todos los mecanismos de control, hay evidencias que sugieren que la membrana plasmática desempeña actividades específicas en la proliferación celular, lo que se demuestra al aplicar agentes que afectan o alteran las propiedades de la membrana como: la permeabilidad, el potencial de membrana, etc., y éstos repercuten en la proliferación (113).

Se ha propuesto que las señales medioambientales causan diferenciación en las células linfocíticas (112).

Rogan y col al analizar las diferencias en las proteínas de membrana entre un grupo de líneas de células linfoides y células mieloides encontraron que hay una variación en los patrones de proteínas y este cambio continúa a lo largo de la diferenciación de la célula linfóide o mielóide transformada., concluyen que estos cambios pueden ser utilizados para la identificación de los diferentes tipos de leucemia, puesto que estas proteínas de membrana pueden ser tomadas como huellas digitales (114).

Se conoce que en diversos procesos patológicos relacionados con la transformación maligna, la característica básica de éstas células es que hay un decremento significativo en los niveles de potencial de membrana (citado en 27).

Las investigaciones del cambio en la concentración de iones durante la activación y su relación con el potencial de membrana, nos motivó para investigar si en una patología ya establecida como algún tipo de leucemia, hay cambios significativos en los niveles de potencial de membrana en relación con células normales.

H I P O T E S I S

Y

O B J E T I V O S

Si en general existe una correlación entre la proliferación y los cambios en el potencial de la membrana, las células que participan en la entidad patológica conocida como leucemia, no deben ser la excepción y en ellas deben existir cambios en el valor del potencial de membrana.

Para probar la hipótesis se plantearon como objetivos:

- a) Demostrar que el potencial de membrana de las células transformadas se encuentra modificado respecto al de las células normales.
- b) Observar si hay cambios en el potencial de membrana en los diferentes tipos de leucemia.

EQUIPOS Y METODOS

Se integraron 2 grupos de muestreo: el grupo I estuvo formado por sujetos clínicamente sanos y el grupo II por pacientes diagnosticados con leucemia.

Se tomó una muestra de sangre periférica de 30 donadores voluntarios, clínicamente sanos de 18 a 60 años de edad sin importar el sexo y 31 muestras de pacientes voluntarios con diagnóstico clínico de leucemia, del Instituto Nacional de Cancerología. Se tomaron de éstos 7 muestras que eran de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), de 17 a 26 años de edad, 10 muestras con leucemia linfocítica crónica (LLC), de 38 a 70 años de edad, 5 muestras con leucemia mieloblástica aguda (LMA), de 17 a 60 años de edad, y 9 muestras con leucemia granulocítica crónica (LGC), de 26 a 56 años de edad. Se elaboró a cada paciente su historia clínica.

Cabe mencionar que todos los pacientes se encontraban en diferentes fases de tratamiento con quimioterapia: esquema para lograr remisión, esquema de consolidación, esquema de sostén o de intensificación tardía.

La obtención de sangre venosa radial se realizó con ayuda de jeringas estériles de 10 ml (previamente heparinizadas 0.04 ml) o con equipo "vacutainer" en el caso de pacientes con leucemia, al cual se le añadía heparina (0.04ml) 1,000 UI/ml (Sigma).

En tubos de ensaye cada muestra se diluyó al 50% con solución salina balanceada (SSB), para separar los linfocitos por la técnica de gradiente (115); a otro tubo de ensaye de 15 ml se le agregaron 3 ml de Ficol Hypaque y 4 ml de la dilución de sangre, se centrifugaron a 400 G, por 15 minutos, al terminarse el centrifugado, se procedió a separar la zona que contenía los linfocitos que se depositan en otro tubo de ensaye, con ayuda de una pipeta Pasteur; el suero que quedó en la parte superior del tubo donde se centrifugó la muestra se separó también para tomar el pH, con un potenciómetro digital HI 1280 ATC Hanna, los linfocitos se lavaron dos veces con SSB, se suspendieron en 1 ml de medio nutritivo TC-199 ó mínimo esencial de Eagle, a temperatura de 37°C hasta realizarse el registro. La muestra se centrifugó para formar un botón compacto que permite hacer el registro y ésta se pasa a la cubeta térmica (construida para estabilizar la temperatura a 37°C). Fotografía 1.

Se calibró el Osciloscopio Digital Hitachi, modelo VC 6015, el microelectrodo (lleno con KCl 3 M), se conectó al portamicroelectrodo, y este al preamplificador-acoplador de alta impedancia WPI Modelo Electro 705, con el que a su vez se mide la resistencia del microelectrodo, las resistencias más apropiadas son de 20 a 30 megohms.

Todo este equipo se encuentra dentro de una cámara de Faraday (cuya función es absorber ondas eléctricas que alteran la señal o ruido) la cuál está conectada a tierra. Fotografía 2

La cubeta térmica que contenía medio nutritivo, se colocó bajo el microscopio estereoscópico (Zeiss), el electrodo indiferente (alambre de plata clorurada del número 17), se mantiene dentro del medio nutritivo, este dispositivo se encuentra dentro de una minicámara de Faraday para evitar alteraciones de la señal eléctrica. Fotografía 3

Se determinó la basal isoelectrica cuando al introducir el microelectrodo de registro en el medio nutritivo, (en este momento no existe diferencia de potencial porque los dos electrodos están en el mismo medio). Cuando el electrodo de registro se pone en contacto con la parte externa de la célula, se obtiene el potencial de acercamiento, que generalmente es del orden de 1 a 2 mV, se observa una señal que vibra en el osciloscopio. Se introduce el microelectrodo dentro de una célula de la muestra para determinar el potencial de membrana, (fotografía 4, 5 y 6) se repite el procedimiento un mínimo de 4 veces, un máximo de 10 veces por muestra.

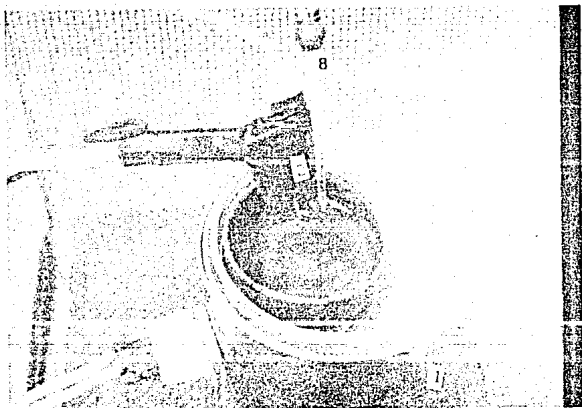
Se toma como potencial de membrana la media de los valores obtenidos en la muestra de células registradas al azar.

Cada muestra de donadores voluntarios sanos contenía aproximadamente 2.5 a 4.0×10^6 / milímetro cúbico, de células linfoides.

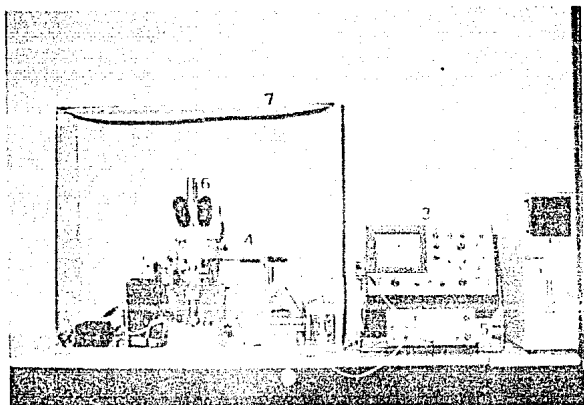
Las muestras de sujetos con diagnostico clinico de leucemia contenian:	LLA 600 a 700	células/ milímetro cúbico.
	LLC 1200 a 2000	células/ milímetro cúbico.
	LMA 900 a 1200	células/ milímetro cúbico.
	LGC 1000 a 2500	células/ milímetro cúbico.

FOTOGRAFIA 1

- 1 - CUBETA TERMICA
- 2 - TERMOMETRO DIGITAL
- 8 - MICROELECTRODO VIVO



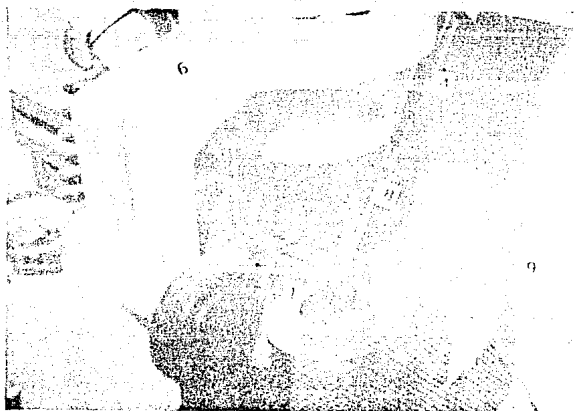
FOTOGRAFIA 2



3- OSCILOSCOPIO 4- PORTA MICROELECTRODO 5-PREAMPLIFICADOR
ACOPLADOR DE ALTA IMPEDANCIA 6- MICROSCOPIO ESTEREOSCOPICO
7-CAMARA DE FARADAY (absorción de ondas eléctricas que alteran
la señal o ruido) .

FOTOGRAFIA 3

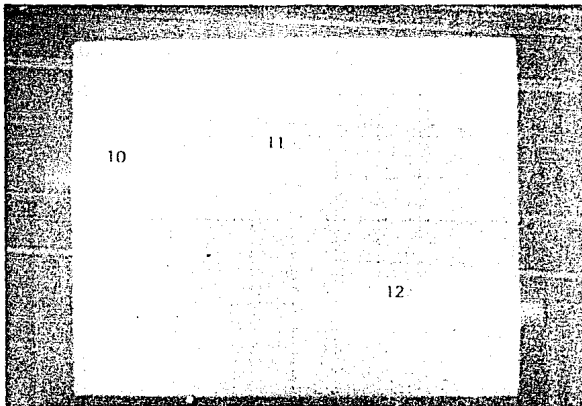
- 1- CUBETA TERMICA
- 4- PORTA MICROELECTRODO
- 6- MICROSCOPIO ESTEREOSCOPICO
- 8- MICROELECTRODO VIVO
- 9- MINICAMARA DE FARADAY



FOTOGRAFIA 4

- 10- BASAL ISOELECTRICA = 0 mV
- 11- POTENCIAL DE ACERCAMIENTO = 1 a 2 mV
- 12- POTENCIAL DE MEMBRANA REGISTRADO = -64 mV

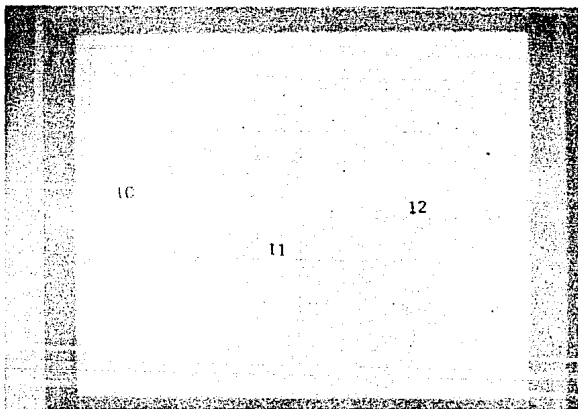
Calibración del osciloscopio 1 cm = 20 mV.



FOTOGRAFIA 5

- 10- BASAL ISOELECTRICA = 0 mV
- 11- POTENCIAL DE ACERCAMIENTO = 1 a 2 mV
- 12- POTENCIAL DE MEMBRANA REGISTRADO = +8 mV

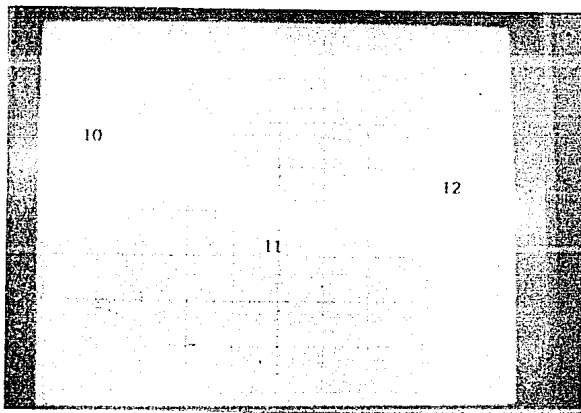
Calibración del osciloscopio 1 cm= 10 mV



FOTOGRAFIA 6

- 10- BASAL ISOELECTRICA = 0 mV
- 11- POTENCIAL DE ACERCAMIENTO = 1 a 2 mV
- 12- POTENCIAL DE MEMBRANA REGISTRADO = -6 mV

Calibración del osciloscopio 1 cm= 5 mV



R E S U L T A D O S

El valor del potencial de membrana de sujetos voluntarios clínicamente sanos en nuestro dispositivo experimental, oscila entre -60 a -70 mV, con un valor medio de -66.26 mV, sin importar la edad ni el sexo (Tabla 1, Gráfica 1).

El valor medio estadístico del pH en plasma encontrado es de 7.4 unidades, aunque éste varía en un intervalo de 7.2 a 7.4 unidades (Tabla 1, Gráfica 1).

El intervalo de magnitudes encontradas en los valores de potencial de membrana de los diferentes tipos de leucemia y por cada muestra de pacientes es muy amplio, ya que se encuentran valores desde -132 que marca una hiperpolarización muy considerable, hasta +46 mV que nos indica una despolarización (Tabla 2, 3, 4 y 5).

En relación a los valores de potencial de membrana con el mismo tipo de padecimiento (LLA, LLC, y LMA), se obtuvo un comportamiento bastante uniforme en cada una de ellas, como se observa en la media estadística obtenida, mostrada en las tablas (2, 3 y 4), en términos generales, aunque hay algunos casos que se salen completamente de los valores del comportamiento general.

Los valores del potencial de membrana son similares al relacionar los tipos de leucemia aguda, como se aprecia en los valores medios estadísticos de la LLA y LMA, ya que todos muestran depolarización de -13 a +35 mV (tabla 2 y 4).

En el caso de la LLA se observa que los sujetos oscilan en una edad promedio de 19.85 años, del sexo masculino, tienen valores de potencial de membrana que oscilan en un intervalo de +6 a +30 mV, sin que se vea una correlación con la edad, excluyendo la muestra 2, que se sale del intervalo mostrado por las demás muestras, probablemente se deba a la fase de tratamiento en que se encuentre el paciente (Tabla 2).

En general la población de linfocitos provenientes de pacientes con LLA tienen un comportamiento bastante uniforme, mostrando una marcada despolarización, con inversión del potencial (Gráfica 2).

En cuanto al valor de pH extracelular se tiene un valor medio estadístico de 7.5 pero este oscila en un intervalo de 7.3 a 7.7 lo que nos indica una tendencia a lo alcalino (Tabla 2 y Gráfica 2).

En la LLA la edad promedio es de 64 años, ésta varía de 38 a 70 años, el sexo más afectado por este tipo de leucemia es el masculino, como se observa en la Tabla 3; el valor promedio del potencial de membrana es de -27.20 mV, este también varía de $+8$ a -132 mV, incluso hay una inversión de la polaridad en las muestras de los pacientes 9 y 17; pero se puede decir que el comportamiento es uniforme. Esta despolarización que se observa se aleja del potencial de membrana encontrado en sujetos clínicamente sanos, (excluyendo a la muestra 10 en la que hay una hiperpolarización muy marcada, esto quizá se deba a la fase de quimioterapia en que se encuentre el paciente, ya que como se mencionó anteriormente, cada paciente estaba sometido a un esquema de quimioterapia específico de acuerdo a su evolución) (Tabla 3 y Gráfica 3), se ve además que a mayor edad se aleja más del valor del potencial de membrana encontrado en los sujetos clínicamente sanos. Se diferencia de la LLA, ya que los valores no son tan positivos; se aproximan a cero (muestra 9, 13, 15, 16 y 17), o se mantienen dentro de los intervalos negativos (muestra 8, 10, 11, 12 y 14) (Gráfica 3).

En cuanto al pH extracelular el valor medio obtenido es de 7.4 unidades, pero éste varía de acuerdo al número de muestra, y éste oscila de 7.0 a 7.6 unidades lo que nos indica que tiende a un pH alcalino (Tabla 3 y Gráfica 3).

Nuestro muestreo de la LMA se puede separar en 2 poblaciones 1) jóvenes masculinos y 2) adultos femeninos. Se observa que en el valor del potencial de membrana en adultos femeninos hay una despolarización, pero menor, respecto a los jóvenes masculinos (Tabla 4 y Gráfica 4), además a menor edad se alejan más del potencial de membrana encontrado por nosotros (Tabla 4, muestra 18, 19 y 20), aunque la edad promedio es de 32 años, se nota que el comportamiento del potencial de membrana es uniforme, puesto que en todos los casos hay inversión de la polaridad; observamos además que a mayor edad se acercan al valor que corresponde a la isoeléctrica, es decir la diferencia del potencial es muy baja (solo en mujeres), y mientras más se alejan de la isoeléctrica se alejan más del valor del potencial de membrana observándose una marcada despolarización (solo en hombres) (Tabla 4 y Gráfica 4).

El valor del pH extracelular promedio es de 7.6 unidades pero este oscila de 7.4 a 7.7 unidades dependiendo del número de muestra, lo que nos indica que hay una tendencia a un pH alcalino (Tabla 4 y Gráfica 4),, estos valores coinciden con los obtenidos en la LLA (Tabla 2 y Gráfica 2), en donde se observaba que las muestras tienden a la alcalinización, por lo tanto en los procesos agudos el pH tiende a alcalinizarse aún más que en los procesos crónicos.

En la leucemia granulocítica crónica (LGC) encontramos que la edad promedio es de 40.44 años, el sexo predominante es el femenino; el valor promedio del potencial de membrana es de $+3.66$ mV, pero se observan variaciones tanto en la edad de los pacientes como en los valores del potencial de membrana de los linfocitos y aunque la suma de los valores positivos es de $+24$ mV y de los negativos de -22.65 mV, nos muestran que la célula está despolarizada (Tabla 5 y Gráfica 5), cabe mencionar que en este

padecimiento la población afectada no es la linfocítica y apesar de ésto se encuentra modificado el valor del potencial de membrana.

El valor del pH extracelular promedio es de 7.6 unidades, pero éste varia, según el número de muestras, de 7.4 a 7.6 unidades, se observa también que en este padecimiento hay una tendencia a la alcalinización (Tabla 5 y Gráfica 5).

En la Gráfica 6 se ven los promedios de pH en plasma del control y cada uno de los diferentes tipos de leucemia, observándose que los diferentes tipos de leucemia tienden a la alcalinización y que en los procesos agudos es más notorio el cambio.

En la mayoría de las muestras no existen formas blásticas (75 a 80 % de los pacientes), por lo que se puede concluir que el potencial de membrana promedio que aquí se reporta se debe a que las células están alteradas y no a que se encuentren en división como hipotéticamente se pudiera suponer; además en los pocos pacientes en los que abundaban las formas blásticas, con lo que aumenta la probabilidad de que el registro corresponda a dichas células, el valor del potencial de membrana es parecido al de las células alteradas.

La correlación de cada uno de los diferenciales (conteo celular) de cada una de las muestras con los diferentes tipos de leucemia, no dan datos suficientes que nos indiquen una relación con los valores encontrados para el potencial de membrana de cada una.

En la Tabla 6 y Gráfica A, se observa el promedio y desviación de los grupos en estudio.

Para comprobar si había diferencias significativas entre los valores de potencial de membrana de las células linfocíticas control y las células linfocíticas de los diferentes tipos de leucemia, se aplicó la prueba estadística de ANOVA, se encontró una $F(4,56) = 43.936$ (Tabla 7), obteniéndose como resultado que existen diferencias estadísticamente significativas con una probabilidad de error de 0.05.

Además se aplicó la prueba de Tukey para observar en que grupos de leucemias se presentaban diferencias respecto al control.

Como se muestra en la (Tabla 8), se encontraron diferencias del grupo control con todos los tipos de leucemia, la LLC con todas las demás y la LLA, LMA y LGC no tienen diferencias entre ellas.

CONTROL

Tabla 1

No. muestra	Edad (años)	Sexo	Em (mV)	pH
1	52	M	-66	7.2
2	52	M	-70	7.4
3	52	M	-66	7.4
4	52	M	-66	7.4
5	30	M	-68	7.4
6	30	M	-68	7.4
7	25	M	-66	7.4
8	25	M	-66	7.3
9	25	F	-62	7.4
10	52	F	-60	7.4
11	40	M	-66	7.3
12	64	F	-62	7.2
13	23	M	-63	7.3
14	23	M	-65	7.4
15	15	M	-68	7.4
16	15	M	-68	7.4
17	40	F	-62	7.4
18	60	F	-60	7.3
19	27	F	-60	7.3
20	60	F	-60	7.4
21	64	F	-60	7.2
22	67	M	-68	7.3
23	23	F	-66	7.4
24	40	F	-64	7.4
25	67	F	-60	7.4
26	15	M	-68	7.3
27	64	F	-60	7.3
28	64	M	-66	7.4
29	64	F	-60	7.4
30	15	M	-68	7.4
31	15	M	-68	7.4
	$\bar{X}=40$		$\bar{X}=-66.26$	$\bar{X}=7.4$

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

Tabla 2

No. paciente	Edad (años)	Sexo	Em (mV)	pH
1	17	M	+25	7.7
2	20	M	-13	7.4
3	26	M	+23	7.6
4	26	M	+29	7.6
5	17	M	+30	7.7
6	16	M	+ 6	7.5
7	17	M	+ 8	7.3
	$\bar{X} = 19.8$		$\bar{X} = +15.43$	$\bar{X} = 7.5$

LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Tabla 3

No. paciente	Edad (años)	Sexo	Em (mV)	pH
8	70	M	- 36	7.6
9	70	M	+ 2	7.5
10	67	M	-132	7.0
11	38	F	- 52	7.4
12	70	F	- 30	7.4
13	67	M	- 6	7.1
14	58	M	- 14	7.3
15	70	F	- 6	7.4
16	70	M	- 6	7.5
17	60	M	+ 8	7.5

$\bar{X}=64$

$\bar{X}=-27.20$

$\bar{X}=7.4$

LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA

Tabla 4

No. paciente	Edad (años)	Sexo	Em (mV)	pH
18	17	M	+32	7.6
19	17	M	+27	7.4
20	17	M	+35	7.4
21	50	F	+ 4	7.5
22	60	F	+ 6	7.7
	$\bar{X}=32$		$\bar{X}=+20.80$	$\bar{X}=7.6$

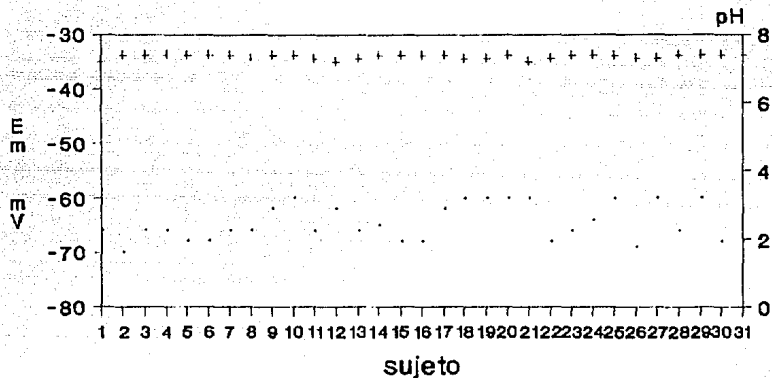
LEUCEMIA GRANULOCITICA CR.

Tabla 5

No. paciente	Edad (años)	Sexo	Em (mV)	pH.
23	46	F	+44	7.6
24	28	M	- 8	7.5
25	41	F	-52	7.4
26	56	F	+46	7.6
27	41	F	+10	7.5
28	46	F	- 8	7.5
29	20	F	+32	7.6
30	56	F	+ 5	7.6
31	30	F	+ 9	7.6
	$\bar{X}=40.44$		$\bar{X}=+8.66$	$\bar{X}=7.6$

CONTROL

Gráfica 1

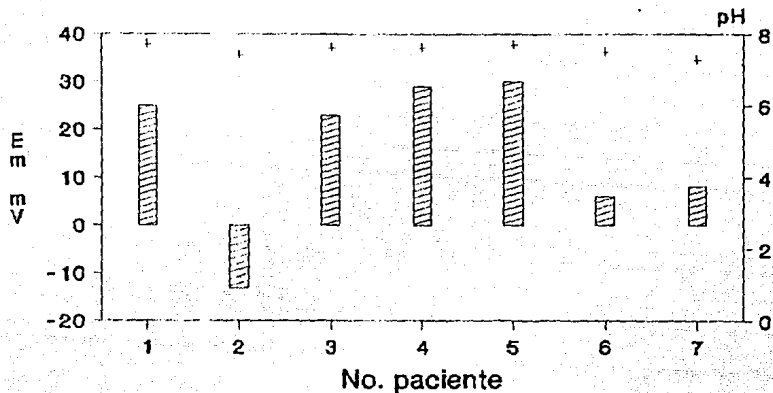


· Em + pH

Valor promedio de 4-10 lecturas/muestra.
Valor del pH serico

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

Grafica 2

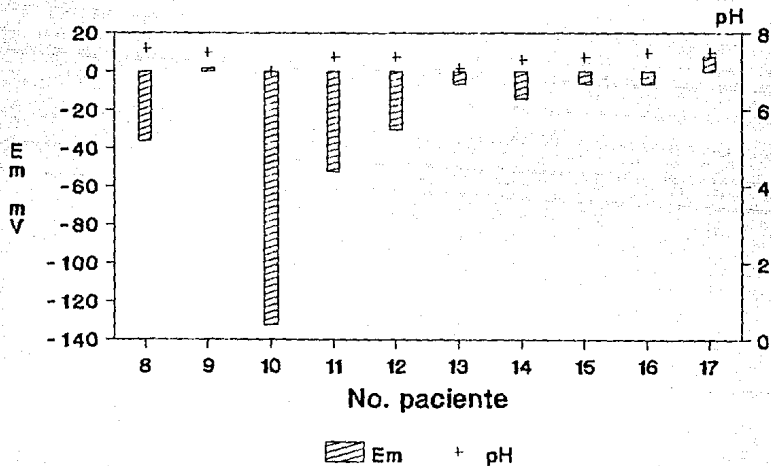


Em mV + pH

Valor promedio de 4-10 lecturas/muestra.
Valor de pH serico

LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Grafica 3

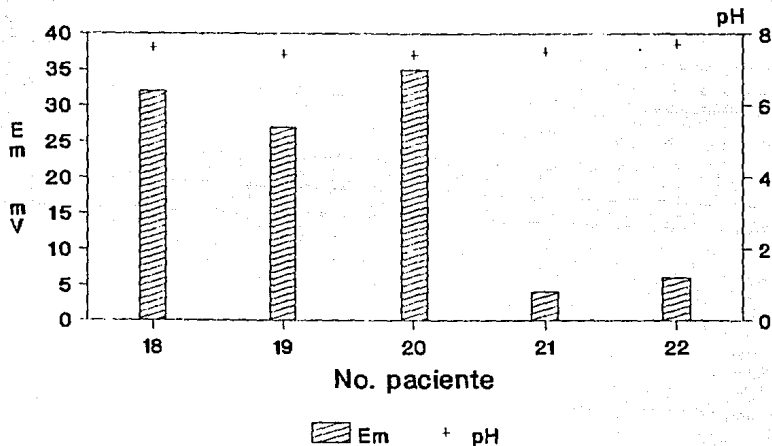


Valor promedio de 4-10 lecturas/muestra.

Valor de pH serico.

LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA

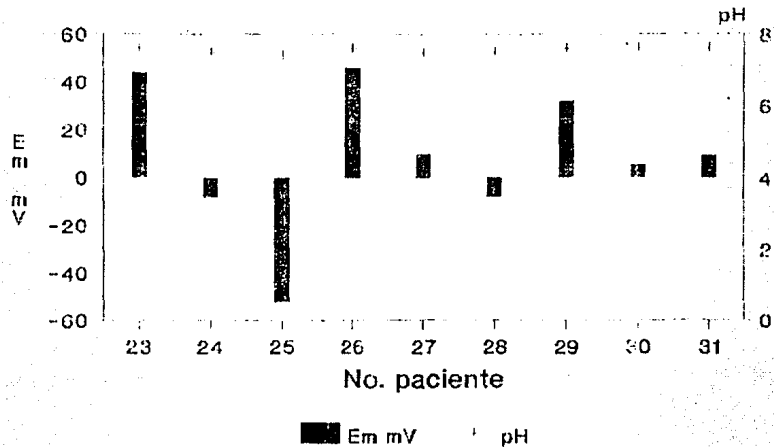
Grafica 4



Valor promedio de 4-10 lecturas/muestra
Valor de pH serico.

LEUCEMIA GRANULOCITICA CRONICA

Gráfica 5



Valor promedio de 4-10 lecturas/muestra.
Valor de pH serico

PROMEDIOS DE pH EN PLASMA.

Grafica 6

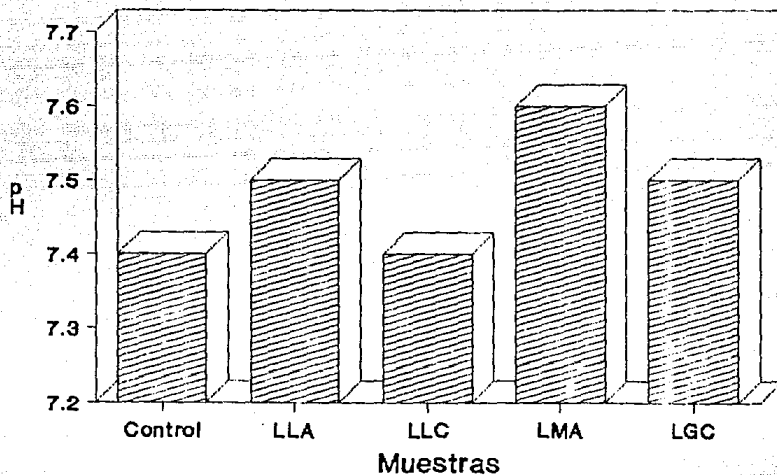


TABLA 6

Promedio y desviación de los grupos en estudio	
	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$
1. Control	-66.26 \pm 7.0
2. LLA	15.42 \pm 16.0
3. LLC	-27.20 \pm 13.0
4. LMA	20.80 \pm 18.0
5. LGC	8.66 \pm 11.0

GRAFICA A

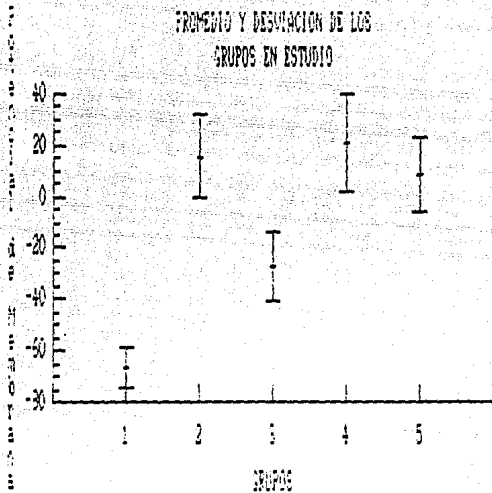


Tabla 7. Análisis de Varianza.

Fuente	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F
Modelo	4	80020.708	20005.177	43.936
Error	56	25497.981	455.321	
Total corregido	60	105518.690		

Tabla 8. Análisis de Tukey para rangos multiples

Bloque	Frecuencia	Promedio	Homogeneidad entre los grupos
Control	30	-60.2666	*
LLC	10	-27.2000	*
LGC	9	8.6666	*
LLA	7	15.4285	*
LMA	5	20.8000	*

Los resultados mostrados en las tablas 6, 7 y 8 se obtuvieron mediante el uso del programa de estadístico de computación statgraphics el cual se corrió en una computadora IBM XT.

DISCUSION

Los valores de potencial de membrana de los linfocitos de sangre periférica obtenidos en humanos clínicamente sanos, se encuentran entre los intervalos de -60 a -70 mV, lo que coincide con lo reportado en la literatura (30, 36, 38 y 41). La membrana celular se mantiene en un estado estable, dado que no hay activación celular; representa el estado de alerta en espera de la señal de inicio de la respuesta inmune y está dado por la actividad de los diferentes mecanismos de la membrana para mantener el potencial en condiciones normales.

Aún no se sabe exactamente como se encuentra modificada fisiológicamente y morfológicamente la membrana plasmática en ciertos padecimientos como en el caso de la leucemia.

Existen escasos artículos que hablan al respecto, en los que se ha mapeado la estructura de la membrana de líneas de células leucémicas (116); de acuerdo con esto parece haber una disminución en elementos de la membrana, fosfolípidos y proteínas membranales en un 35%, lo que probablemente represente a su vez una disminución de los segundos mensajeros.

También se sabe que hay diferencias en el tipo de proteínas membranales encontradas en los diferentes tipos de leucemia; lo cual ha permitido tener un patrón que sirve como huella digital (114), por lo que al estar cambiadas las proteínas membranales es lógico suponer que estas proteínas membranales al no ser funcionales o estar ausentes (ATPasa que conforman canales), generan diferentes concentraciones iónicas intracelulares y extracelulares con el consecuente cambio de potencial de membrana.

En cuanto a la electrofisiología existen pocos reportes especializados y hay algunos que se relacionan con el tema de potencial de membrana en una forma indirecta: se ha señalado disminución de las proteínas con función de ATPasa de Na⁺/K⁺ en células T y B de humano con leucemia linfocítica crónica (71); se han encontrado que los canales de Ca⁺⁺ activados por voltaje, en líneas de células B neoplásicas de ratón, pierden su selectividad y permiten el pasaje de cationes monovalentes lo que cambian el potencial de membrana (93), los flujos de Ca⁺⁺ se asocian con la actividad de cambios de Na⁺, H⁺ y pH intracelular, acompañados de incrementos de segundos mensajeros con los que se activan líneas de células T de humano con leucemia linfocítica crónica (52).

Un dato más que apoyaría los resultados es lo encontrado por Cameron y col (117), estos investigadores observan que las concentraciones intracelulares de sodio son mayores en las células transformadas que en las normales y también es diferente la concentración si es una célula que se divide lentamente.

El cloro presenta el mismo patrón de distribución que el sodio en relación a su concentración, tanto en el núcleo como en el citoplasma, por lo tanto, altas concentraciones de sodio y cloro se asocian con la mitogénesis y a mayor concentración con la oncogénesis.

Con base en estas modificaciones estructurales y funcionales de la membrana de las células leucémicas, respecto a la membrana de la célula control, es lógico comprender el cambio en el potencial de membrana que encontramos en las células alteradas patológicamente, como se muestra en los resultados de las tablas 2, 3, 4 y 5. Se encuentra en ellos un intervalo amplio de magnitudes de potencial de membrana en los diferentes tipos de leucemia.

Dado que el potencial de membrana de las células de los pacientes con el mismo tipo de padecimiento caen dentro del mismo intervalo, con muy pocas excepciones (muestra 2 de LLA, 9, 10 y 17 de LLC). Es probable que las alteraciones estructurales y funcionales sean comunes en el mismo tipo de padecimiento (114), aunado a que la alteración de estos padecimientos es genético (118), lo que repercute en la activación celular, que de acuerdo a lo señalado en los antecedentes implica movilizaciones iónicas y por ende un cambio en el potencial de membrana.

Con lo anterior se aclara la incógnita planteada anteriormente, respecto a que el cambio en el potencial de membrana sea causa o efecto de la activación celular, de acuerdo a la secuencia mencionada en la introducción, los eventos indispensables para la activación de los linfocitos, y la expresión de los genes correspondientes a la síntesis de proteínas que forman parte de la membrana, pueden ser regulados por la actividad de los diferentes componentes membranales, lo que da lugar a que la célula se mantenga en proliferación continua al no poder regular el control de la división celular.

Como se puede observar en las tablas y gráficas 2 y 4, en los linfocitos provenientes de pacientes con padecimientos agudos, la polaridad de su membrana cambia muy notablemente despolarizándose hasta invertir el signo, en tanto que los linfocitos de pacientes con padecimientos crónicos (tablas 3 y 5) presentan una despolarización menos marcada. Lo anterior se manifiesta clínicamente, dado que los pacientes con padecimientos agudos tienen mal pronóstico, en tanto que los crónicos tienen mejor pronóstico.

A nivel celular se puede interpretar como un mayor grado de alteración en la membrana plasmática de las células linfocíticas de pacientes con procesos agudos, por lo que las células afectadas no desarrollan las funciones que les corresponden y dada la condición tan alterada de la célula, el daño o el proceso es irreversible, lo que da lugar a la muerte del paciente. En los pacientes de leucemia crónica el potencial de membrana de los linfocitos no se encuentra tan alterado en relación a lo encontrado en nuestro dispositivo experimental control, incluso algunos valores se aproximan a los valores control, lo que nos habla de que la alteración en la membrana plasmática no es tan severa, por lo que las células pueden desempeñar parcialmente sus

funciones y los pacientes pueden sobrevivir a su padecimiento.

Como se observa en los resultados de los diferentes tipos de leucemia, aunque hay una tendencia a seguir un comportamiento homogéneo, los valores del potencial en el mismo tipo de padecimiento, muestran valores dentro de un mismo intervalo de acuerdo con el padecimiento. Existen también excepciones que se manifiestan en valores que salen de los intervalos característicos para cada padecimiento, esto probablemente se deba a la fase de tratamiento farmacológico en que se encuentren los pacientes, ya que aunque éstos son manejados bajo un mismo esquema de tratamiento, éste se va modificando de acuerdo a la evolución de cada paciente y debe recordarse que cada caso es único, porque si bien el padecimiento se agrupa dentro de una denominación por ciertas características comunes, el origen puede ser muy diferente, así como el establecimiento y la evolución, ya que dependen de las condiciones genéticas, sociales, nutricionales, educacionales, ambientales etc, de cada paciente.

En relación a la leucemia mieloide y granulocítica ha sido sorprendente observar que el potencial de membrana de los linfocitos, sin ser la población directamente afectada, también está modificado respecto al control, ya que se encuentran valores de inversión del potencial muy pronunciados, lo que se interpreta como una respuesta general de todas las células ya que al no ser la población afectada de alguna manera repercute en el cambio de potencial de membrana, pues al encontrarse en un mismo tejido hay una interacción de estas células con los productos que sintetizan los granulocitos normalmente y que en los padecimientos señalados se encuentran alterados, como se describió en la introducción.

En cuanto al valor de pH extracelular encontrado, éste oscila de 7.0 a 7.7 unidades de pH en los diferentes tipos de leucemia, pero tienen una tendencia a lo alcalino, por lo que se encuentra modificado respecto a lo reportado para células en reposo (6.8 a 7.4 unidades), y aunque el papel de pH intracelular es muy discutido autores como Gerson y Kiefer (61), y Greinstein y col (65), sugieren que la alcalinización no es esencial para la multiplicación celular, otros autores como Roseff y Cantley (62 y 63), Stanton (64), relacionan al antitransporte de Na^+/H^+ y el posible papel del pH intracelular en la regulación de la linfoproliferación y diferenciación celular. Como se indica en la introducción, al ser estimuladas las células se observan cambios en el pH intracelular en células T y B alrededor de 0.1 a 0.2 unidades (49,50,51,52, 53, 54, 55, 56 y 57), y como se tiene a unidades logarítmicas el cambio en una décima de unidad de pH es muy significativo en cuanto a la concentración de iones en el medio extracelular, ya que puede jugar un papel muy importante en la regulación de los sistemas en general por ejemplo.

Consideramos importante señalar que el pH ligeramente alcalino encontrado extracelularmente en los pacientes con leucemia, influye de alguna manera en la linfoproliferación o pudiera ser probablemente resultado del padecimiento mismo, por lo que es importante que éste sea estable para el funcionamiento apropiado de las células.

Aunado a que el microambiente puede contribuir a un cambio de concentraciones iónicas y este mismo microambiente puede alterar la función de la célula vecina cambiando su microambiente y por lo tanto sus funciones (112) y como estamos en un medio en donde hay muchas células con diferente función (sangre), en el cual hay interacción constante, este cambio microambiental conlleva a un cambio más generalizado con el consecuente cambio de pH extracelular.

El potencial de membrana que aquí se reporta se debe a que las células están alteradas patológicamente y no a que se encuentren en división, el conteo diferencial de cada una de las muestras nos indica que no hay relación con los tipos de leucemia y los valores del potencial de membrana encontrados.

Los resultados del trabajo permiten proponer la caracterización de estos padecimientos por su electrofisiología. La dificultad de esto estriba en que cada paciente se encuentra en distinta fase de tratamiento, lo que de acuerdo a los resultados modifica el potencial de membrana, así que debe de considerarse este factor para evitar interpretaciones erróneas.

CONCLUSIONES

El potencial de membrana se encuentra modificado en los linfocitos alterados patológicamente por procesos leucémicos en relación con los linfocitos obtenidos de sujetos clínicamente sanos.

El potencial de membrana en los linfocitos provenientes de pacientes con leucemias agudas es de signo positivo, en tanto que en los linfocitos provenientes de pacientes con leucemias crónicas, la modificación del potencial de membrana no es tan marcada, ya que incluso algunos valores se aproximan más al valor del potencial de membrana de una célula inactivada.

Al establecer la relación de los datos electrofisiológicos con los datos clínicos se concluye que cuando el potencial de membrana está invertido hay un mal pronóstico, en tanto que un potencial hiperpolarizado, despolarizado o próximo a cero se relaciona con un buen pronóstico en la evolución del paciente.

El pH extracelular se encuentra ligeramente virado hasta 0.03 unidades tendiendo a lo alcalino en los pacientes con leucemia.

B I B L I O G R A F I A

- 1- Singer, S.J., Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-726.
- 2- Fettiplace, R., Haydon, D.A. 1980. Water permeability of lipid membranes. *Physiol Rev.* 60:510-514.
- 3- Stein, W.D. 1986. Transport and diffusion across cell membranes. Academic Press. N.Y. 40-45.
- 4- Wright, E.M., Diamond, J.M. 1977. Anion selectivity in biological systems. *Physiol Res.* 57:109-113.
- 5- Wallick, E.T. 1979. Biochemical mechanisms of the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 42:643-648.
- 6- Stevens, C.F. 1980. Biophysical analysis of the function of receptors. *Ann. Rev. Physiol.* 42:643-648.
- 7- Finean, J. B., Coleman, R., Michell, R. H. 1978. Membranes and their cellular functions. 2nd. London: Blackwell. 42-67.
- 8- Stevens, C. 1979. The neuron. *Sci. Am.* 241:3-54-65.
- 9- Andreoli, T.E. 1980. Membrane Physiology. Ed. Plenum. Press. N.Y.:74-80
- 10- Ganong, W.F. 1988. Fisiología Médica. Ed. El Manual Moderno. México. D.F.:22-27.
- 11- Hodgking, A.J., Huxley, A.F. 1942. Membrane resting and action potential from the squid giant axon. *J. Cell. Comp. Physiol* 19:135-138.
- 12- Curtis, H.J., Cole, K.S. 1938. Transverse electric independence of the squid giant axon. *Gen. Physiol.* 21:751-756.
- 13- Graham, J., Gerard, R.W. 1946. Membrane potentials and excitation of impaled single muscle fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.* 28:99-101.
- 14- Ling, G., Gerard, R.W. 1946. The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.* 34:382-384.
- 15- Huxley, A.F., Stämpfli, R. 1951. Direct determination of membrane resting potential and action potential in single myelinated nerve fibers. *J. Physiol.* 112:476-480.
- 16- Draper, M.H., Weidman. 1951. Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol.* 115:74-76.
- 17- Hoffman, B.F., Suckling, P.R. 1952. Cellular potential of intact mammalian hearts. *Am. J. Physiol.* 170:357-360.
- 18- Bennett, A.L., Ware, F. 1953. The normal membrane resting potential of mammalian skeletal muscle measured in vivo. *J. Cell. Comp. Physiol.* 42:342-346.
- 19- Hoffman, B.F., Suckling, P.R. 1953. Cardiac cellular effects of vagal stimulation and acetylcholine. *Am. J. Physiol.* 130:291-296.
- 20- Eccles, R.M. 1955. Intracellular potentials recorded from a mammalian sympathetic ganglion. *J. Physiol.* 130:572-576.

- 21- Coombs, J.S., Eccles, R.M., Fatt, P. 1955. The electrical properties of the motoneurone membrane. *J. Physiol.* 130:291-296.
- 22- Phyllips, C.G. 1955. The dimension of a cortical motor point. *J. Physiol.* 129:20-25.
- 23- Holman, M.E. 1958. Membrane potential recorded with high-resistance microelectrodes, and the effect of changes in ionic environment on the electrical and mechanical activity of the smooth muscle of the guinea pig. *J. Physiol.* 141:464-467.
- 24- Sachs, H.G., McDonald, T.F. 1972. Membranes potentials of BHK cell line ionic and metabolic determinants. *J. Cell Physiol.* 80:347-470.
- 25- Cone, C.D. Jr. 1969. Electrosomotic interactions accompanying mitosis initiation in sarcoma cell in vitro. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 31:404-427.
- 26- Cone, C.D. Jr. 1970. Variation of the transmembrane potential level as a basic mechanism of mitotic control. *Oncology* 24:438-470.
- 27- Cone, C.D. Jr. 1971. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control oncogenesis. *J. Theor. Biol.* 30:151-181.
- 28- Soltoff, P.S., Cantley, C.L. 1988. Mitogens and ion fluxes. *Ann. Rev. Physiol.* 50:207-223.
- 29- Grinstein, S., Dixon, S. 1989. Ion transport membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol. Rev.* 69:417-474.
- 30- Sims, P.J., Waggoner, S., Wang, C.H. 1974. Studies on the mechanism by cyanine dyes measure membrane potential in red blood cell and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry.* 13:3315-3330.
- 31- Rink, T.J., Deutsch, C. 1980. Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochem. Biophys. Acta.* 595:15-30.
- 32- Sidell, N.L., Schlichter, C., Wright, S. 1986. Potassium channels in human NK cell are involved in discrete stage of the killing process. *J. Immunol.* 137:1560-1658.
- 33- Wilson, A.H., Chused, T.M. 1985. Voltage-sensitive cyanine dye fluorescence signals in lymphocytes: plasma membrane and mitochondrial components. *J. Cell. Physiol.* 125:61-71
- 34- Grinstein, S., Clarke, C.A. 1983. Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. *J. Gen. Physiol.* 82:619-625.
- 35- Kowal, E. 1975. Messungen elektrischer membran potentiale von lymphozyten. *Acta. Biol. Med Ger.* 34:1007-1011.
- 36- Deutsch, C.J., Holian, A., Holian, S.K. 1979. Transmembrane electrical and pH gradients across human erythrocytes and human peripheral lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 125:61-71.
- 37- Kiefer, H., Blume, A.J. 1980. Membrane potential changes during mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:2200-2204.
- 38- Felber, S.M., Brand, M.D. 1982. Factors determining the plasma-membrane potential of lymphocytes. *Biochem. J.* 204:577-585.

- 39- Grinstein, S., Clarke, C.A., Dupre, A. 1982. Volumen-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 80:801-823.
- 40- Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J. 1982. T cell mitogen cause early changes in cytoplasmic-free Ca^{++} and membrane potential in lymphocytes. *Nature.* 295:68-71.
- 41- Wilson, A.H., Chused, T.M. 1985. Lymphocyte membrane potential and Ca^{++} sensitive K^{+} channels described by oxonol dye fluorescence measurements. *J. Cell. Physiol.* 125:72-81.
- 42- MacDougall, S.L., Grinstein, S., Gelfand, E.W. 1988. Activation of Ca^{++} dependent K^{+} channels in human B lymphocytes by anti-immunoglobulin. *J. Clin. Invest.* 81:449-454.
- 43- Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Mills, G.B., Grinstein, S. 1987. Role of membrane potential in the reponse of human T lymphocytes to phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 138:527-531.
- 44- Felber, S.M., Brand, M.D. 1983. Early plasma-membrane-potential changes during stimulation of lymphocytes by Con A. *Biochem. J.* 83:885-891
- 45- Cheung, R.K., Grinstein, S., Gelfand, E.W. 1982. Volumen regulation by human lymphocytes. Identification of differences between the two major lymphocytes subpopulation. *J. Clin. Invest.* 70:632-638.
- 46- Thatham, P.E., Delves, P.J. 1984. Flow cytometric detection of membrane potential changes in murine lymphocytes induced by Con A. *Biochem. J.* 221:137-146.
- 47- Thatham, P.E., O'Flynn, Linch, D.C. 1986. The relationship between mitogen induced membrane potential changes and intracellular free Ca^{++} in human T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 856:202-211.
- 48- Monroe, J., Cambier, J.C. 1983. B cell activation I. Anti-Ig induced receptors cross-linking result in a decrease in the plasma membrane potential of murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 157:2073-2086.
- 49- Deutsch, C., Price, M. 1982. Role of extracellular Na^{+} and K^{+} in lymphocyte activation. *J. Cell. Physiol.* 113:73-79.
- 50- Grinstein, S., Smith, J.D., Rowatt, C. 1988. Mechanism of activation of lymphocyte Na^{+}/H^{+} exchange by Con A. *J. Biol. Chem.* 262:15277-15284.
- 51- Mills, G.B., Cragoe, E.J., Grinstein, S., Gelfand, E.W. 1985. Interleukin-2 induced a rapid increase in intracellular pH through activation of Na^{+}/H^{+} antiport, cytoplasmic alkalization is not required for lymphocytes proliferation. *J. Biol. Chem.* 260:12500-12507.
- 52- Rosoff, P.M., Cantley, L.C. 1985. Stimulation of T3-T cell receptor-associated Ca^{++} influx enhances the activity of Na^{+}/H^{+} exchanger in a leukemic human T cell line. *J. Biol. Chem.* 260:14053-14059.
- 53- Hesketh, T.R., Moore, J.P., Morris, D.H. 1985. A common sequence of Ca^{++} and pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cell. *Nature.* 313:481-484.

- 54- Grinstein, S., Cohen, S. 1987. Cytoplasmic $[Ca^{++}]$ and intracellular pH in lymphocytes. Role of membrane potential and volumen-activated Na^{+}/H^{+} exchange. *J. Gen. Physiol.* 89:185-213.
- 55- Grinstein, S., Cohen, S., Goetz, J.D., Gelfand, E.W. 1985. Characterization of the activation of a Na^{+}/H^{+} exchange in lymphocytes by phorbol esters: changes in cytoplasmic pH dependence of the antiport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 1429-1433.
- 56- Rosoff, P.M., Stein, L.F., Cantley, L.C. 1984. Phorbol esters induced differentiation in a pre B lymphocytes cell line by enhancing Na^{+}/H^{+} exchange. *J. Biol. Chem.* 259:7056-7060.
- 57- Calalb, M.B., Stanton, T.H., Smith, L. 1987. Recombinant human interleukin-1 stimulated Na^{+}/H^{+} exchange is not required for differentiation in pre B lymphocytes cell line, 70Z/3. *J. Biol. Chem.* 262:3680-3684.
- 58- Gerson, D.F., Kiefer, H. 1982. High intracellular pH accompanies mitotic activity in murine lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 112:1-4.
- 59- Gerson, D.F., Kiefer, H., Eufe, W. 1982. Intracellular pH of mitogen-stimulated lymphocytes. *Science* 216:1009-1010.
- 60- Gelfand, E. W. Mill, G.B., Cheung, R.K., Lee, J.W. 1987. Transmembrane ion fluxes during activation of human T lymphocytes: role of Ca^{++} , Na^{+}/H^{+} exchange and phospholipid turnover. *Immunol. Rev.* 95:59-87.
- 61- Gerson, D.F., Kiefer, H. 1983. Intracellular pH and the cell cycle of mitogen stimulated murine lymphocytes. *J. Cell. Physiol.* 114:132-136.
- 62- Rosoff, P.M., Cantley, L.C. 1983. Increasing the intracellular Na^{+} concentration induced differentiation in a pre B lymphocyte cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7447-7550.
- 63- Rosoff, P.M., Cantley, L.C. 1984. Phorbol esters induce differentiation in a pre B lymphocyte cell line by enhancing Na^{+}/H^{+} exchange. *J. Biol. Chem.* 259:7056-7060.
- 64- Stanton, T.H., Mayhard, M., Bomszyk, K. 1986. Effect of interleukin-1 on intracellular concentration of Na^{+} , Ca^{++} , and K^{+} in 70Z/3 cell. *J. Biol. Chem.* 261:5699-5701.
- 65- Grinstein, S., Cohen, S., Rothstein, A. 1984. Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride sensitive Na^{+}/H^{+} antiport. *J. Gen Physiol.* 83:341-369.
- 66- Grinstein, S., Goetz, D., Rothstein, A. 1984. Na^{+} fluxes in thymic lymphocytes I. Na^{+}/Na^{+} and Na^{+}/H^{+} exchange through an amiloride-sensitive pathway. *J. Gen Physiol.* 84:565-584.
- 67- Litchman, M.A., Jackson, H.A., Peck, W.A. 1972. Lymphocyte monovalent cation metabolism: cell volumen, cation content and cation transport. *J. Cell. Physiol.* 80:383-396.
- 68- DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S. 1985. Voltage-dependent ion channels in lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 10:71-95
- 69- Chandy, K.G., DeCoursey, T.E., Cahalan, M.D., Gupta, S. 1985. Ion Channels in lymphocytes. *J. Clin. Immunol.* 5:1-6.
- 70- Chandy, K.G., DeCoursey, T.E., Cahalan, M.D., Gupta, S. 1985. Electroimmunology: the physiologic role ion channels in the immune system. *J. Immunol.* 135:787-791.

- 71- Wiley, J.S., Kraft, N., Cooper, I.A. 1979. The binding of ouabaina to normal and chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* 54:994-1000.
- 72- Pedersen, K.E., Klichtgaard, N.K. 1983. The characteristics of (H3)-ouabain binding to human lymphocytes. *BR.J.Clin. Pharmacol.* 15:657-665.
- 73- Deutsch, C., Price, M.A., Johansson, C. 1981. A sodium requirement for mitogen induced proliferation in human peripheral blood lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* 136:359-3369.
- 74- Deutsch, C., Taylor, J.S., Price, M.A. 1984. pH homeostasis in human lymphocytes modulation by ions and mitogens. *J.Cell. Biol.* 98:885-894.
- 75- Prasad, K.V., Severin, A., Kaplan, J.G. 1987. Sodium ion influx in proliferating lymphocytes and early components of the mitogenic signal. *Arch. Biochem. Biophys.* 252:515-525.
- 76- Segel, G.B., Simon, W., Litchman, M.A., 1979. Regulation of sodium and potassium transport in phytohemagglutinin stimulated human blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 64:834-841.
- 77- Heikilan, R., Inversen, J.G. 1983. Early anti immunoglobulin induced events prior to Na⁺/K⁺ pump activation: an analysis in a monoclonal human B-lymphoma cell population. *J. Cell. Physiol.* 117:1-8.
- 78- Heikilan, R., Iversen, J.G. 1983. Amiloride inhibits anti-Ig induction of proliferation in a human B-lymphoma cell population. *Exp. Cell. Res.* 149:299-302.
- 79- Redondo, J.M., Rivas, A.L., Fresno, M. 1986. Activation of the Na⁺/K⁺ ATPase by interleukin-2. *FEBS Lett.* 206:199-202.
- 80- Quastel, M.R., Kaplan, J.G. 1970. Early stimulation of potassium uptake in lymphocytes treated with PHA. *Exp. Cell. Res.* 63:230-233.
- 81- Averdunk, R., Lauf, P.K. 1975. Effects of mitogen on sodium-potassium transport H3-ouabain binding, and adenosine triphosphatase activity in lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* 93:331-342.
- 82- Grinstein, S., Cohen, S., Rosthein. 1984. Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport. *J. Gen. Physiol.* 83:341-369.
- 83- Grinstein, S., Goetz, J.D., Rosthein, A. 1984. Na⁺ fluxes in thymic lymphocytes. I. Na⁺/Na⁺ and Na⁺/H⁺ exchange through an amiloride-sensitive pathway. *J. Gen Physiol.* 84:565-584.
- 84- Baliga, B.S., Sindel, L.J., Jenkins, L.D. 1987. Inhibition of T lymphocyte activation by amiloride. *J. Cell. Biochem.* 33:151-160.
- 85- Grinstein, S., Goetz, J.D., Furuya, W., Rosthein, A., Gelfand, E.W. 1984. Amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in platelets and leukocytes: detection by electronic cell sizer. *Cell. Physiol.* 16:293-298.
- 86- Mills, G.B., Cheung, R.K., Cragoe, E.J., Grinstein, S., Gelfand, E.W. 1986. Activation of the Na⁺/H⁺ antiport is not required for lectin induced proliferation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 136:1150-1154.

- 87- Rosoff, P.M., Cantley, L.C. 1983. Increasing the intracellular Na⁺ concentration induces differentiation in a pre-B lymphocytes cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:7547-7550.
- 88- Bramhall, J.S., Morgan, J.I. 1976. The use of fluorescent probe to monitor alteration in trans-membrane potential in single cell suspension. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72:654-662.
- 89- DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S., Cahalan, M.D. 1984. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: role in mitogenesis?. Nature 307:465-471.
- 90- Matteson, D.R., Deutsch, C. 1984. K⁺ channels in lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. Nature. 300:468-471.
- 91- Schlichter, L., Sidell, N. 1986. K⁺ channels mediated killing by human natural killer cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:451-455.
- 92- Brent, L., Bubien, J., Woods, W.T. 1986. The role of ion channels in B cell activation. J. Cell. Biol. 103:221-225.
- 93- Fukushima, Y., Hagiwara, S. 1983. Voltage-gated Ca⁺⁺ channels in mouse myeloma cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:2240-2242.
- 94- DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S., Cahalan, M.D. 1987. Mitogen induction of ion channels in murine T lymphocytes. J. Gen Physiol. 89:405-420.
- 95- McKinnon, D., Cerending, R. 1986. Changes in the expression of K⁺ channels during mouse T cell development. J. Exp. Med. 164:1846-1861.
- 96- Deutsch, C., Lee, S.C., Kause, D. 1986. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. J. Physiol. 372:405-423.
- 97- Schlichter, L., Sidell, N., Hagiwara, S. 1986. K⁺ channels are expressed early in human T cell development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:5625-5629.
- 98- Chandy, K.G., DeCoursey, T.E., Cahalan, M.D., Gupta, S. 1984. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. J. Exp. Med. 160:369-385.
- 99- Russel, J.H., Dobos, C.B. 1983. Accelerated Rb⁺ [K⁺] release from the cytotoxic T lymphocyte is a physiology event associated with delivery of the lethal hit. J. Immunol. 131:1138-1141.
- 100- Tupper, J.T., Zorogniotti, L.J. 1977. Calcium content and distribution as a function of growth and transformation in the mouse 3T3 cell. J. Cell. Biol. 75: 12-22.
- 101- Fredman, M., Raff, C.M. 1975. Induction of increase Ca⁺⁺ uptake in mouse T lymphocyte by Con A and its modulation by cyclic nucleotides. Nature. 255:378-382.
- 102- Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Grinstein, S. 1984. Role of membrane potential in the regulation of lectin induced calcium uptake. J. Cell. Physiol. 121:533-539.
- 103- Hesketh, T.R., Smith, G.A., Moore, J.P., Taylor, M.V. 1983. Free cytoplasmic calcium concentration and the mitogenic stimulation of lymphocytes. J. Biol. Chem. 258:4876-4882.
- 104- Nisbeth-Brown, E., Cheung, R.K., Lee, J.W., Gelfand, E.W. 1985. Antigen-dependent increase in cytosolic free calcium in specific human T lymphocyte clones. Nature. 316:545-547.

- 105- Braun, J., Unanue, E.R., Sha'afi, I. 1979. Crosslinking by ligands to surface immunoglobulin triggers mobilization of intracellular Ca^{++} in B lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 82:755-766.
- 106- Pozzan, T., Arslan, P., Tsien, R.Y. 1982. Anti-Ig, cytoplasmic free Ca^{++} , and capping in B lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 94:335-340.
- 107- Averdunk, R., Günther, T.H. 1980. Effect of Con A on Ca^{++} binding, Ca^{++} uptake and the Ca^{++} ATPase of lymphocytes plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97:1146-1153.
- 108- Litchman, A.H., Segel, G.B., Litchman, M.A. 1982. Effects of trifluoperazine and mitogenic lectins on Ca^{++} ATPase activity and calcium transport by human lymphocyte plasma membrane vesicles. *J. Cell. Physiol.* 111:213-217.
- 109- Fukushima, Y., Hagiwara, S. 1985. Currents carried by monovalent cations through calcium channels in mouse neoplastic B lymphocytes. *J. Physiol. Lond.* 358:225-228.
- 110- Fukushima, Y., Hagiwara, S., Saxton, R.E. 1984. Variation of Ca^{++} current during the cell growth cycle in mouse hybridoma lines secreting during the cell immunoglobulins. *Physiol. Lond.* 355:313-321.
- 111- Gelfand, E.W., Cheung, R. K., Mills, G.B., Grinstein, S. 1985. Mitogens trigger a Ca^{++} independent signal for proliferation in phorbol ester-treated lymphocytes. *Nature.* 315:419-420.
- 112- Nicolson, L.G. 1987. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from to oncofetal expression. *Cancer Research.* 47:1473-1487.
- 113- Sivak, A. 1972. Induction of cell division: Role of cell membrane sites. *J. Cell Physiol.* 80:167-174.
- 114- Rogan, K.M. et al, 1987. Heterogeneity in the membrane proteins of human lymphoid cell lines as seen in sodium dodecyl sulfate-polycrylamide electrophoresis slab gels. *Cancer Research.* 38:3604-3610.
- 115- Boyum, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (supp 97):7.
- 116- Parandoosh, Z., Boanerges, R., Steven, S., Matsumoto, W.B. 1990. Changes in diacylglycerol and cyclic GMP during the differentiation of human myeloid leukemia K562 cell. *Life Science.* 46: 315-320.
- 117- Cameron, I.L., Smith, N.K.R., Pool, T.B., Sparks, R.L. 1974. Intracellular sodium concentration as related to mitogenesis in oncogenesis. *J. Cell. Biol.* 83:201-206.
- 118- Boehm, T., Rabbitts, T. 1989. A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man. *Eur. J. Biochem.* 185:1-17.