



00381
4

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES DE K^+ EN LA MEMBRANA
PLASMÁTICA DE LINFOCITOS PROVENIENTES DE RATAS
WISTAR JOVENES, MADURAS Y SENILES".**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. En C. MARIA TERESA BENITEZ RODRIGUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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

Presentación, agradecimientos y dedicatoria.....	i
Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Marco de Referencia.....	5
Introducción.....	8
Planteamiento del problema.....	35
Hipótesis y objetivos.....	38
Metodología.....	39
Resultados.....	43
Discusión.....	61
Conclusiones.....	71
Bibliografía.....	72

AGRADECIMIENTOS

A dos grandes Instituciones, a las que debo mucho más que mi formación académica.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

Manifiesto mi más sincero agradecimiento a cada uno de los miembros del Jurado por su valiosa aportación crítica en cada una de sus respectivas especialidades, lo que avaló el trabajo para presentarse como Tesis Doctoral:

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

*Departamento de Microbiología y Parasitología,
Facultad de Medicina, UNAM.*

DRA. BERTA PRIETO GÓMEZ

*Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, UNAM.*

DR. CRUZ REYES VÁZQUEZ

*Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, UNAM.*

DR. EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO

*Departamento de Fisiología,
Instituto Nacional de Cardiología*

DRA. MARGARITA V. GARCÍA GARDUÑO

*Departamento de Fisiología,
Instituto de Física, UNAM.*

DRA. PAZ MARÍA S. SALAZAR SCHETTINO

*Departamento de Inmunología,
Facultad de Medicina, UNAM.*

DR. STEFAN L. MIHAILESCU

*Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, UNAM.*

*Por el tema de investigación realizado fue de gran relevancia el apoyo otorgado por el personal de quienes dependía la vida de los especímenes empleados: las ratas jóvenes, adultas y principalmente las seniles. Es por ello que agradezco infinitamente la **amabilísima** colaboración que recibí de:*

*DR. ENRIQUE PINZÓN ESTRADA
Jefe de la Unidad de Bioterio
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México*

Así como de sus espléndidos colaboradores:

*Dr. Ismael Torres Saldaña
Dr. Victor Manuel Salgado Alfaro.*

.....

*M. en C. Ivonne Heuze Icaza
Responsable del Bioterio
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco*

Y a sus siempre amables y eficientes colaboradores:

*M.V.Z. Alfonso Malagón Mendiola
M.V.Z. Heriberto Quintana Flores.*

.....

Por el trabajo realizado en las microfotografías y por el procesamiento del mismo material para su presentación en la Tesis, le doy mi más sincero agradecimiento a:

*T. A. Tomás Cruz Méndez
Biol. Francisco G. Pasos Nájera*

responsables del Laboratorio de Fotografía de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

.....

*A la M. en C. Ana María Vázquez Álvarez, por su incondicional, desinteresada e importantísima colaboración para conmigo. **Muchas gracias Anita.***

*A la Dra. Elia Naranjo Rodríguez, por su entusiasta apoyo en múltiples ocasiones, actividades e infraestructura. **Muchas gracias Helia.***

DEDICATORIA

Por el gran significado que tiene para mí este trabajo, siento la necesidad de dedicarlo a quienes han sido motivo de estímulo, aliciente e inspiración para llevarlo a cabo, que me han dado la fortaleza para seguir adelante a pesar de tantos inconvenientes y porque de una u otra forma este trabajo también ha sido fincado en esfuerzos y sacrificios de cada uno de ustedes

A MI ESPOSO, porque gracias a tu amor, apoyo y paciencia he podido llegar a esta meta. Siento haber disminuido el tiempo compartido contigo por dedicarlo a estas actividades. Espero que Dios me permita compensarlo. **Te quiero.**

A MI PADRE (q e p d) Gracias por tu ejemplo de responsabilidad, disciplina y amor al trabajo, pero sobre todo por los grandes sacrificios que tuviste que hacer para que yo tuviera una carrera

A MI MADRE, como una pequeñísima muestra de agradecimiento por darme la oportunidad de disfrutar esta maravillosa vida y por tantas y tantas cosas que me has dado todos estos años, sobre todo tu amor, el que me has ofrecido de forma incondicional a través de tu apoyo, solidaridad, fortaleza y confianza

A MIS HERMANAS, Tina, Malena y Mari, por lo que cada una de ustedes ha significado en cada etapa de mi vida. Gracias por sus muestras de cariño y por el respaldo en todos los sentidos que me han dado siempre.

A MIS ADORADAS HIJAS, Rosa Luz y Tere, por todo lo que me han enseñado, por lo que me han hecho vivir, por permitirme ser participe de sus alegrías, sus tristezas y sus logros. Gracias

A MIS NIETOS, Ana Jéssica y José Daniel, con quienes he aprendido que el amor es una fuente inagotable. **Los adoro.**

A JACOBO, mi hijo político. Porque me ha demostrado que no deben existir los prejuicios. Gracias por permitirme disfrutar a mi hija y a mis nietos.

“Ofrezco un tributo de respetuoso agradecimiento a la vida de los animales que sacrifiqué en aras de la investigación científica, deseando sinceramente que sea una aportación al conocimiento en beneficio de los seres vivos, lo que de aquí resulte”.

María Teresa Benítez Rodríguez.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

ADN.- ácido desoxirribonucleico
4-AP.- 4-aminopiridina
ATPasa Na^+/K^+ .- bomba sodio/potasio dependiente de magnesio
 Ba^{++} .- iones de bario
 Ca^{++} .- iones de calcio
 Cd^{++} .- iones de cadmio
 $(\text{Ca}^{++})_i$.- concentración de calcio intracelular
C57BL/6.- cepa de ratones viejos
CD.- marcadores de superficie celular
 CD_8 , CD_8^+ , Tc .- Linfocitos citotóxicos
 CD_4 , CD_4^+ , TH , Th , TH1 , Th1 .- Linfocitos colaboradores
Clampex.- programa de aplicación de protocolo
Clampfit.- programa de análisis de datos
Con-A.- concanavalina A
 Cs^+ .- iones de cesio
CTX.- caribdotoxina
DG.- diacilglicerol
 G_0 , G_1 , S , G_2 .- Fases del ciclo celular o mitosis.
H.- humano
IL.- Interleucina
 IP_3 .- inositol trifosfato
 $\text{K}^+(\text{Ca}^{++})$.- canales de potasio dependientes de calcio
KIR.- canales de rectificación entrantes
KTX.- kaliumtoxina
 K^+V .- canales de potasio dependientes de voltaje
 La^{+++} .- iones de lantano
M.- murinos
MAPKs.- protein cinasas activadas por mitógenos
mM.- milimolas
mOsm.- miliosmolas
ms.- milisegundos
MTX.- margatoxina
mV.- milivoltios
n.- número de muestra
 Na^+ .- iones de sodio

Na⁺/H⁺ - mecanismo de antiporte de protones
Ni⁺⁺ - iones de níquel
NK - linfocitos citotóxicos, asesinos naturales
nM - nanomolas
NTX - noxiustoxina
Null - población de linfocitos no T, no B
pA - picoamperios
pclamp - programa de aplicación de protocolo
patch-clamp - técnica de fijación de parche de membrana
PGE - prostaglandinas
PHA - fitohemaglutinina
PM - potencial de membrana o de reposo
pM - picomolas
pS - picosiemens
S₁ a S₆ - segmentos de las subunidades formadoras de los K⁺(V)
SSB - solución salina balanceada
TEA - tetraetilamonio
τ - Constante de tiempo
μm - micras
V_{1/2} de activación - voltaje medio de activación

RESUMEN

Durante el envejecimiento existe una reducción en la actividad del sistema inmune, proceso descrito como inmunosenectud. Tal disminución incrementa la vulnerabilidad de los sujetos a procesos infecciosos y degenerativos, por lo que la morbilidad y mortalidad es mayor en esta etapa de la vida. Aunque la inmunosenectud es consecuencia de múltiples factores, su presencia en los individuos viejos no necesariamente constituye un signo característico del proceso fisiológico del envejecimiento, por lo que actualmente se realizan múltiples estudios que intentan impedir o revertir tales procesos. La inmunidad activa o adquirida, compete de forma muy importante a los linfocitos T, por lo que esta célula ha sido el objeto de múltiples estudios que lo postulan como el factor propiciante de la inmunosenectud. A pesar de ello, no existen estudios que analicen la respuesta electrofisiológica de la membrana de estas células ante los estímulos que inducen la respuesta inmunológica durante esta etapa. El inicio de la respuesta inmune depende del potencial de membrana del linfocito, y a su vez, éste depende de la actividad de los canales de potasio dependientes de voltaje ó $K^+(V)$. En este estudio se realizó un análisis comparativo de la cinética de los canales $K^+(V)$ en linfocitos provenientes de ratas jóvenes (2 a 3 meses), maduras (10 a 12 meses) y viejas (más de 24 meses de edad). Empleando la técnica de patch clamp se midió el potencial de membrana, la capacitancia, las corrientes salientes de potasio, en las cuales se analizaron las principales constantes de tiempo así como su cinética de la activación, inactivación y deactivación. Los resultados mostraron que existe una relación inversa entre el potencial de membrana y la edad de los individuos, y una directa entre la capacitancia y la edad; las corrientes fueron de mayor amplitud en los sujetos jóvenes. Por otro lado, los linfocitos de ratas viejas mostraron parametros de activación menores y más lentos, así como cambios significativos en su inactivación, ya que ésta siempre fue más lenta. Aunque cualitativamente se mostraron cambios en la deactivación, éstos no son estadísticamente significativos. Estos resultados sugieren que la reducción en la activación inmunológica que se presenta con la edad, puede tener como sustento cambios en la cinética de los canales de potasio dependientes de voltaje, como los descritos en este trabajo.

ABSTRACT

The deterioration of the immune system during ageing, a process named immunosenescence, is thought to contribute to increased morbidity and mortality from infections, and possibly autoimmune disease and cancer in the elderly. Immunosenescence seems to be a consequence of multiple factors, however, dysregulation of T cell function has been implicated as the critical factor in these phenomenon. Then, there are many investigations related to these cells to avoid or reduce the deteriorating effects induced by such immune condition. Several studies had shown that the principal element contributing to T cell immunosenescence may be the presence of disrupted activation pathways in these immune cells during acquired or active response. In fact, several authors had described changes starting at the very first steps in antigens recognition. However, there are not data related with the electrophysiology mechanism of T lymphocytes and the immunosenescence. The relevance of such mechanisms was evident when a relationship between the value of the membrane potential and T lymphocyte activation has been described. Immune activation starts when a hyperpolarization of lymphocytes takes place as a consequence of mitogen or antigen binding, such hyperpolarization gives an ionic environment necessary to activate intracellular pathways leading to genomic stimulation. Since resting membrane potential is near from potassium equilibrium potential, then its stability results from the activity of potassium channels. In lymphocytes voltage dependent potassium channels $K^+(V)$, are pivotal in membrane potential homeostasis. The present study intends describe the kinetic parameters of such channels in lymphocytes from rats: young (2-3 months old), mature (10-12 months old) and old (24 or more months old) in order to find out if deteriorated lymphocyte activation could be related with potassium channel dysfunction. Using patch-clamp methods, the resting membrane potential, cell capacitance, outward potassium currents, activation, inactivation and deactivation constants, as well as time constants were recorded from lymphocytes obtained from young, mature and old rats. The results show that total current was lower, capacitance was higher, both activation and inactivation were slower in older animals; whilst deactivation showed no statistical differences. These data suggest that immunosenescence could be a consequence of lymphocyte membrane dysfunction as a result of changes in the kinetics of ion transmembrane fluxes such as the ones described in the present study.



MARCO DE REFERENCIA

Los individuos sanos se protegen de la invasión de microorganismos empleando diversos mecanismos barreras físicas, células fagocíticas y anticuerpos, además de células linfocíticas. Estas últimas se activan en presencia de un inductor desencadenando una serie de procesos que en su conjunto conforman la "respuesta inmune específica". Tal respuesta inmune activa se puede presentar en dos formas como inmunidad humoral o como inmunidad celular según el tipo de elementos que participen en ella. En el caso de la inmunidad celular, su activación resulta de la aplicación de un estímulo específico a una población particular de células, los linfocitos T los cuales responden en tres etapas básicas, de reconocimiento de activación y efectora.

La fase de reconocimiento se inicia con la unión del antígeno a receptores localizados en la membrana de linfocitos diferenciados. Estos receptores superficiales son los únicos que tienen la capacidad de reconocer y responder a antígenos peptídicos presentes en la superficie celular de otras células. Posteriormente durante la activación se presenta una serie de eventos los cuales inducen tanto la proliferación linfocitaria, lo que conlleva a la expansión de los clones de linfocitos que responden específicamente al antígeno y participan en la amplificación de la respuesta protectora, como a la diferenciación de las células cuya función inicial fue el reconocimiento del antígeno. Finalmente, durante la fase efectora los linfocitos realizan funciones encaminadas a la eliminación del antígeno; en esta fase pueden participar otros mecanismos de defensa y otras células además de los linfocitos, por ejemplo, el sistema del complemento, citocinas, fagocitos y células inflamatorias. Esta respuesta inmune específica, amplifica e incrementa la inmunidad natural, particularmente después de

exposiciones repetidas al mismo antígeno, por lo que muestra especificidad para los distintos antígenos, diversidad en su capacidad de reconocimiento antigénico, memoria para reconocer antígenos previamente analizados, autoregulación o autolimitación y capacidad de discriminación entre lo propio y no propio

El envejecimiento constituye un proceso biológico que se caracteriza por un incremento en la morbilidad y mortalidad por padecimientos que conllevan un fondo inmunológico característico, lo que sugiere una reducción en la función de este sistema como consecuencia del paso del tiempo. Este concepto denominado inmunosenectud, se muestra en múltiples funciones coordinadas y desplegadas por el sistema inmune. Sin embargo, ni los mecanismos sistémicos, ni los procesos moleculares involucrados han sido hasta la actualidad definidos.

Los procesos de activación linfocitaria también muestran un efecto deletéreo con el envejecimiento. Aparentemente la mayor parte de los procesos involucrados en la activación de estas células muestran una reducción importante, aunque se desconoce con certeza el tipo de alteración que muestran los fenómenos tempranos de la activación y qué ocurre a nivel de la membrana celular. Particularmente, aunque se ha descrito el papel tan importante que los fenómenos electrofisiológicos de los linfocitos poseen en la activación, los cambios y alteraciones que presentan durante el envejecimiento son aún desconocidos. Dentro de los procesos electrofisiológicos que ocurren en los linfocitos T, resulta de primordial importancia el nivel de polaridad que muestra la membrana celular debido a la presencia de canales iónicos dependientes del voltaje, y es gracias a estos canales que la polaridad de la célula se mantiene. En este sentido, son los canales de potasio los responsables principales de determinar el potencial de membrana en reposo.

A pesar de que la importancia de los canales de potasio en la

fisiología del linfocito T y otras células del sistema inmunitario es puesta en evidencia por múltiples estudios que muestran que el empleo de bloqueadores o activadores de los mismos modifica sustancialmente la función de los mismos. su papel dentro de los procesos del envejecimiento de estas células es casi completamente desconocido.

Este trabajo pretende aportar información sobre la forma en que estos canales se comportan durante del envejecimiento

INTRODUCCION

La especificidad inmunológica es consecuencia de la actividad linfocitaria, ya que éstas, son las únicas células capaces de reconocer específicamente a diversos antígenos en función de sus determinantes antigénicas superficiales, situación que se manifiesta tanto *in vitro* como *in vivo* (Abbas et al, 1994).

Los linfocitos maduros inactivados se originan a partir de células totipotenciales presentes en la médula ósea, se trata de células circulantes de 8 a 10 micras de diámetro, con un núcleo grande con heterocromatina abundante y un reducido halo citoplasmático con pocos organelos como mitocondrias, ribosomas y lisosomas (Fig 1) Durante su fase inicial de desarrollo, los linfocitos no presentan receptores para antígenos y por lo mismo, no responden a ellos. Conforme avanza la diferenciación, aparecen los receptores antigénicos, por lo que responden a diferentes antígenos y conforman diferentes clases funcionales, es decir, se producen varios subtipos que son diferentes en sus funciones y en sus productos protéicos, aunque morfológicamente son similares (Sadehi, 1999)

Los linfocitos B deben su nombre a que en las aves maduran en un órgano llamado Bolsa de Fabricius, y en los mamíferos su maduración ocurre en la médula ósea (B de bone marrow). Estos linfocitos tienen la capacidad de transformarse en células plasmáticas sintetizadoras de anticuerpos. Sus receptores son en sí formas de anticuerpos (inmunoglobulinas superficiales ó IgS). Cuando los antígenos interactúan con estos receptores se inicia la activación, la cual culmina con el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos (Ikuta et al, 1992)

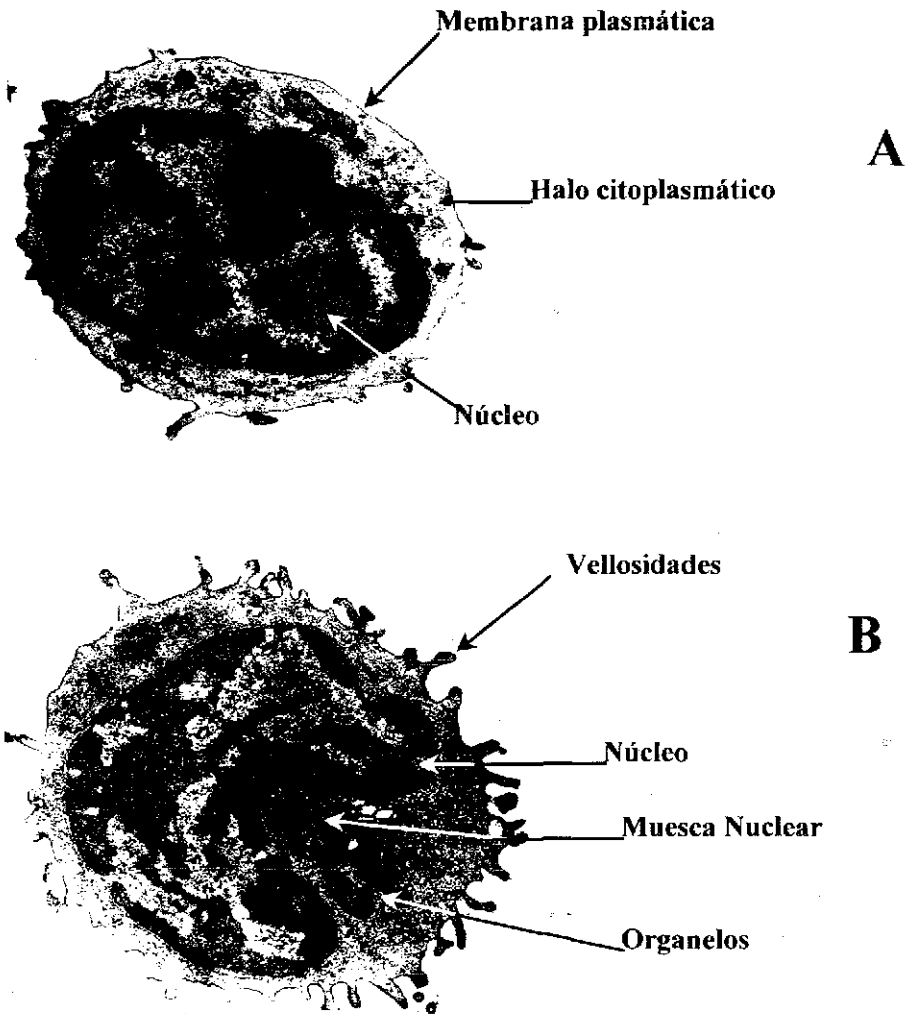


Fig. 1.- Durante la activación linfocitaria, se presenta una serie de cambios estructurales que se manifiestan en prácticamente cada uno de los organelos y componentes celulares. Por ejemplo la membrana celular muestra múltiples vellosidades. En los núcleos se observan muescas prominentes donde se alojan los organelos, los cuales se ven más desarrollados que en los linfocitos en reposo. En estas microfotografías se aprecian estos cambios comparativamente entre un linfocito en reposo (A) y uno sometido a un proceso de activación (B).

Por su parte, los linfocitos T, se originan en la médula ósea y maduran en el timo, a lo cual deben su nombre (Yu, 1997). Por sus funciones se subdividen en linfocitos T_H (helper) o colaboradores o CD4 y T_C o citotóxicos o CD8, que no producen anticuerpos. Sus receptores antigénicos están relacionados estructuralmente con las IgS de los linfocitos B aunque con características propias (Burton y Woolf, 1992). Este tipo de linfocitos reconocen únicamente los antígenos unidos a proteínas codificadas por el complejo de histocompatibilidad mayor y expresadas en la superficie de otras células. Como resultado, estas células reconocen y responden a antígenos asociados a superficies celulares, así como a antígenos solubles. La respuesta de los CD4 consiste en secretar citocinas, las cuales promoverán la proliferación y diferenciación tanto de linfocitos T como B y de los macrófagos, con lo cual asocian a la inmunidad celular con la humoral. Adicionalmente, los linfocitos CD8 inducen la lisis de células infectadas con virus, bacterias y otros microorganismos intracelulares (Allen, 1987) Las relaciones funcionales entre los linfocitos T y los macrófagos son importantes en el establecimiento de las interacciones entre la inmunidad celular y humoral. Los macrófagos, células de mayor tamaño que los linfocitos (Fig. 2) poseen una acción fundamental en la inmunidad celular.

Las poblaciones de linfocitos se reconocen por los marcadores superficiales que poseen; así los linfocitos T_H expresan principalmente el marcador CD₄ mientras que los T_C expresan el CD₈. Existe una población que no expresa algún marcador por lo que se les clasificó como "null"; sin embargo, se mostró que constituyen una población de linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos que lisan células tumorales e infectadas por virus sin mediar una estimulación antigénica previa. Por esta razón se les denomina linfocitos granulares grandes o natural killer (NK) según su morfología o su fisiología (Miceli

and Parnes, 1993).

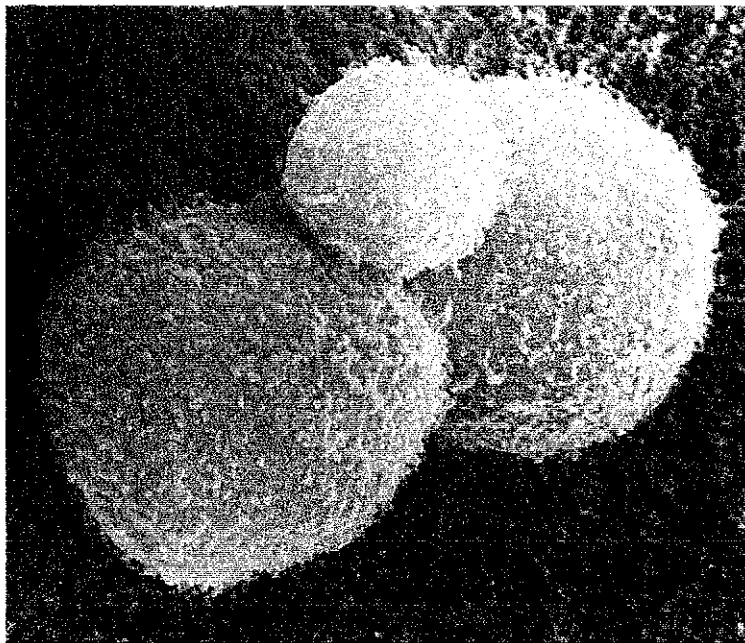


Fig. 2 Microfotografía tomada con microscopio electrónico de barrido, que muestra las diferencias morfológicas entre un linfocito T y un par de macrófagos. En ésta se observa la relación estrecha resultado de la activación inmunológica entre estos dos tipos celulares.

En ausencia de estimulación inmunológica, los linfocitos se encuentran en fase de reposo o fase G_0 del ciclo celular, y mueren en pocos días o semanas. Al ser estimulados pasan a la fase G_1 , aumentan su tamaño y se denominan linfoblastos; llegan a medir hasta 12 micras, aumentan tanto su citoplasma como el número de organelos, para posteriormente entrar en la fase de mitosis.

Una de las peculiaridades que se presentan en relación al sistema inmune es una reducción en sus funciones conforme avanza la edad (Banerjee, 2000). Este deterioro del sistema inmune que se observa

durante el envejecimiento, proceso denominado inmunosenectud, contribuye al incremento en la morbilidad y mortandad por infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer que se observa en esta edad (Pawelec et al, 1997). La asociación entre una inmunidad reducida y el envejecimiento se pone de manifiesto en las alteraciones que se observan principalmente en las poblaciones de linfocitos T. Estas alteraciones son pivotaes en el decremento de la respuesta inmune en general, ya que la mayoría de las funciones inmunes son guiadas a través de estas células. Los linfocitos T deben someterse a una proliferación clonal extensa al entrar en contacto con los antígenos, como ocurre en las respuestas primarias; además debe someterse a una expansión clonal repetida para respuestas de memoria. Por esta razón, es evidente entonces que la actividad replicativa debe ser particularmente importante para los linfocitos T (Effros y Pawalec, 1997). Múltiples reportes muestran que la función de las células T está deprimida en los sujetos viejos (Thoman y Weigle, 1989), incluyendo aquellas reacciones inmunológicas muy potentes como el rechazo de trasplantes alogénicos de piel (Tielen et al, 1993). Además, estudios prospectivos de decenas de años han establecido una asociación positiva entre una buena función de células T *in vitro* y la longevidad de los individuos (Roberts-Thomson et al, 1974; Murasko et al, 1988; Wayne et al, 1990; Rink et al, 1997, Rink et al, 1998).

Entre los cambios más frecuentes inducidos por el envejecimiento en las células T, se observa el reemplazamiento progresivo de las células vírgenes por células de memoria, con la consiguiente disminución de las primeras (Globerson y Effros, 2000); la acumulación de células con defectos en los sistemas de transducción de la señalización, y cambios en el perfil de producción y liberación de citocinas del tipo Th1 al Th2 (Globerson, 1995). Además de estos cambios en las células T, también las células B muestran defectos intrínsecos importantes (Weksler, 2000).

y las células asesinas reducen significativamente su actividad (Franceschi, 1995; Doria y Frasca, 1997). Adicionalmente, el patrón de funciones de los NK varía en términos de citotoxicidad, producción de citocinas y respuesta a las citocinas, aunque la capacidad funcional básica por célula se conserva (Solana y Mariani, 2000). La médula ósea de murinos envejecidos, contiene proporciones aumentadas de células T y B maduras, lo cual sugiere que hay un mecanismo compensador a las funciones reducidas de los tejidos linfoides periféricos (Ginaldi, 1999). Así, en contraste con la idea de una declinación sistemática con la edad de todas las funciones del sistema inmune, los datos sugieren que sus componentes sufren cambios graduales en relación a la edad en perfiles de población celular y sus compartimentos (Sharp, 1990)

Aunque el timo no deja de funcionar con la edad, sí se observa una disminución en el número de células, lo que probablemente sea debido a cambios constitutivos del estroma. Por lo tanto se muestra una reducción en la capacidad proliferativa de las células progenitoras y una menor interacción de los timocitos en desarrollo con el estroma tímico.

Contrariamente, en la edad avanzada hay exceso de células T en la médula ósea, como un mecanismo para compensar la baja actividad del timo, habiéndose demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, que en la médula se pueden diferenciar y madurar las células B (Morrison, 1996). Las células totipotenciales que las forman, normalmente son quiescentes pero en los murinos viejos entran más frecuentemente en ciclo proliferativo. Este mecanismo compensador, puede ser peligroso porque aumenta el riesgo de mutaciones, particularmente en relación con la escasa capacidad de reparación del ADN que hay en el envejecimiento (Morrison, 1996).

En términos generales el cuadro 1 (basado en Globerson, 1995), muestra los cambios más prominentes descritos que ocurren durante el envejecimiento.

CUADRO I
CAMBIOS EN EL SISTEMA INMUNE DURANTE EL ENVEJECIMIENTO:

Tipo de células:	Cambios:	Modelo:
Linfocitos T		
	a) Fenotipo de nativo a de memoria.	H y M
	b) Expresión de las moléculas de adhesión celular.	M
	c) Producción de citocinas Th ₁ a Th ₂	H y M
	d) Incremento de citocinas proinflamatorias	M
	e) Incremento de los niveles de células T en médula ósea	M
	f) Proporción de CD4 ⁺ /CD8 ⁺ en pulmón.	M
	g) Incremento en CD4 ⁺ en tejidos periféricos	H y M
	h) Disminución en la respuesta a estimulantes	H y M
	i) En los sistemas de transducción de señales	H y M
Linfocitos B		
	a) Aumentan sus niveles en médula ósea.	M
	b) Disminuyen los niveles en sangre	H
	c) En la especificidad de los anticuerpos.	M
	d) En el repertorio de anticuerpos.	M
	e) Expansión clonal de las CD5 ⁺ .	M
Natural killer (NK)		
	a) Aumentan sus niveles	H
	b) Aumento de la proporción de células T con marcadores NK.	H
	c) Disminución de su actividad citotóxica	H y M
	d) En el patrón de respuesta	M
Monocitos		
	a) Fenotipo de nativo a activado.	H
	b) El patrón de secreción de monocinas	M
Células Dendríticas		
	a) Son las únicas que no sufren cambios	H
Macrófagos		
	a) Aumenta la producción de citocinas (IL-1, PGE ₂).	H y M
Granulocitos		
	a) Disminuye la actividad fagocítica	H
	b) Disminuye el estallido respiratorio.	H
Eritrocitos		
	a) Proporción de poblaciones celulares	H

H: humano; M: murino.

Son varios factores los que definen la inmunosenectud en la población de linfocitos T, dentro de éstos se encuentran:

- 1.-Defectos en las células totipotenciales medulares.
- 2.-Involución tímica.
- 3.-Defectos en las células presentadoras de antígenos.
- 4.-Alteraciones morfofuncionales de las células en reposo.
- 5.-Alteración en las vías de activación en las células y
- 6.-Cambios en las células clonales replicativas

Entre estos factores, el que ha mostrado inducir los efectos más pronunciados y extensivos a la mayoría de casos, es aquel que se relaciona con los procesos de activación y señalización en linfocitos T. Cuando se analizan células T provenientes de sujetos viejos, se observan alteraciones desde los eventos más tempranos de la activación linfocitaria (Lio et al, 1996); es decir, desde la misma asociación entre el antígeno y su receptor. Por ejemplo, la aplicación de CD69 y CD71 a linfocitos T provenientes de ratas de más de 22 meses de edad, no induce el fenómeno de "regulación ascendente" de sus receptores, por lo que la respuesta a estos compuestos tiende a disminuir paulatinamente. Esta misma aplicación en células jóvenes, determina que la respuesta a estas mismas sustancias se incremente progresivamente (Lio et al, 1996). Esta alteración se muestra en el caso de otros agentes inmunoestimulantes como factores de crecimiento, mitógenos y demás (Borst y Cope, 1999).

Otra lesión que se observa en linfocitos T viejos y que puede comprometer la activación linfocitaria, son las alteraciones del citoesqueleto, el cual tiene funciones relacionadas con la fijación, expresión de la estructura tridimensional, movilización y recambio de prácticamente todos los receptores de la membrana celular (Caplan et al, 1995), por lo que una alteración del mismo debe tener efectos profundos sobre la transducción de señales. En estos linfocitos también está

comprometida la formación de segundos mensajeros tal como el trifosfato de inositol (IP₃) y el diacilglicerol (DG), mientras que la actividad, pero no la concentración de la proteína cinasa C (PKC), la cual es responsable de la generación de IP₃ y DG, parece conservarse (Utsuyama et al, 1993)

Adicionalmente, las vías de señalización que son mediadas por la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son consideradas como esenciales para una función y un crecimiento celular adecuado. En un estudio realizado en linfocitos tipo T estimulados con antígenos para CD3 provenientes de humanos, más del 50% de éstos mostraron una reducción en la activación de MAPKs. La estimulación de estos linfocitos con ésteres del forbol en combinación con un ionóforo de calcio, resultó en una mayor activación de células viejas, pero aún así no alcanzaron los niveles observados en células jóvenes (Whisler et al, 1996). La reducción en la activación de las MAPKs, se asocia invariablemente con un incremento en la actividad de proteínas fosfatasa inducidas por mitógenos (MAP), lo cual, al desfosforilar proteínas reduce aún más la activación linfocitaria (Liu et al, 1996)

El análisis del ciclo celular en células de donadores viejos estimuladas con fitohemaglutinina, muestra que hay un decremento en el número de células que entran a la fase S o proliferativa; esta alteración relacionada con la edad, se asocia con un decremento en la expresión de genes de activación temprana como *c-jun*, *c-myc*, *c-myb* y los que codifican a IL-2 y CD25 (Gamble et al, 1990; Song et al, 1992; Pieri et al, 1992) En función de la expresión de estos genes de activación temprana, varios autores han sido capaces de describir un estado senil y un estado presenil de los linfocitos T (Perillo et al, 1993).

La mayoría de las alteraciones observadas en linfocitos T provenientes de ratas viejas se asocian directamente o indirectamente con los mecanismos de control de la concentración intracelular de calcio

[Ca⁺⁺]_i; a su vez, este parámetro celular resulta indispensable y el principal inductor de la activación linfocitaria. Además, la reducción en el desarrollo de señales dependientes de la [Ca⁺⁺]_i representa principalmente diferencias entre los linfocitos vírgenes y los de memoria, ya que estos últimos son resistentes a los incrementos en la concentración de calcio y son más comunes en los animales viejos. El envejecimiento lleva a reducciones en la fosforilación de un amplio rango de sustratos en células T estimuladas ya sea con antígenos o con sustancias que actúan en sitios intracelulares (Miller et al, 1997)

El papel que juega la [Ca⁺⁺]_i en el proceso de activación linfocitaria es fundamental. La mayor parte de alteraciones descritas en los animales viejos, son provocadas por deficiencias en los mecanismos de transporte o modulación del Ca⁺⁺ en alguno de los microdominios intracelulares de este ión (Verheugen et al, 1995a). Esta alteración modificaría desde la respuesta membranal y la activación enzimática, hasta las actividades genómicas de los linfocitos T, con la consecuente modificación funcional

La [Ca⁺⁺]_i resulta de un balance entre la entrada del ión a través de la membrana celular y los mecanismos intracelulares que fijan y almacenan al ión. Cuando este balance se pierde la concentración se modifica y con ello una gran cantidad de mecanismos de señalización intracelular se alteran, provocando funciones celulares aberrantes. La entrada del ión calcio al interior de la célula ocurre gracias a la presencia de canales selectivos, cuyo compuerteo depende del voltaje (Verheugen et al, 1995b). En otras palabras el valor del voltaje de la membrana celular determinará su estado conductor, por lo que las despolarizaciones e hiperpolarizaciones de esta membrana repercutirán sobre el flujo transmembranal de calcio, la [Ca⁺⁺]_i y por ende en todos los mecanismos cuya activación dependen de este ión.

Desde esta perspectiva, aquellos mecanismos que controlan el

voltaje de la membrana tendrán también entonces, la capacidad de modular todas estas funciones celulares. De particular importancia resultan los canales de K^+ membranales, puesto que de acuerdo a las variables cinéticas de estos canales, a las diferencias entre las concentraciones intra y extracelulares del ión y debido al potencial electroquímico de este ión, el K^+ se encargará de mantener el potencial de membrana en el valor requerido. A pesar de que se han descrito cambios en el potencial de membrana que acompañan a la activación linfocitaria (Grinstein y Dixon, 1989), y se ha hecho énfasis en la participación de los canales de potasio en el funcionamiento normal y patológico de los linfocitos (Chandy et al, 1986), prácticamente no hay estudios que relacionen a estos canales con la inmunosenectud, ni que determinen su funcionalidad en la etapas de la vejez.

Durante la activación de los linfocitos se presentan flujos iónicos, los cuales resultan directamente de la actividad de canales iónicos selectivos. Así, desde la década de los 70s se mostró que la activación linfocitaria se inicia con una entrada masiva de sodio (Kaplan, 1978). Posteriormente, al analizar detalladamente los cambios iónicos en linfocitos estimulados con lectinas, se muestra la presencia tanto de fenómenos depolarizantes como hiperpolarizantes en una secuencia bien definida, que resultan de cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana linfocitaria a los diferentes iones, por la presencia de diferentes canales en esta membrana (Lewis y Cahalan, 1995) (Cuadro 2).

Dentro de las diversas familias de canales iónicos presentes en la membrana celular de los linfocitos, los canales de potasio constituyen el grupo más importante en determinar el valor del potencial de membrana en reposo, básicamente debido a que el valor del potencial de equilibrio del potasio está muy cercano al valor del potencial de membrana de la célula en reposo.

Dentro de estos canales se encuentran los canales de potasio dependientes de voltaje ($K^+(V)$), los cuales son semejantes estructural y funcionalmente a los canales de potasio de rectificación tardía que se han reportado para la membrana plasmática de las células excitables. Estos canales linfocitarios fueron descritos simultáneamente por DeCoursey et al y Matteson y Deutsch en 1984 en células T adherentes de humanos utilizando la técnica de patch-clamp. Ambos grupos observaron que estas células mostraban una corriente positiva o saliente en respuesta a una despolarización. El potencial de reversión para esta corriente coincidía con el potencial de equilibrio del potasio (E_K), además de que se modificaba al cambiar la concentración de potasio extracelular (K^+_o), lo cual indica la participación de este ión en la génesis de esta corriente. Debido a que el potencial de membrana de los linfocitos oscila entre -50 y -80 mV es posible que sólo unos cuantos de estos canales se encuentren activados en estas condiciones. Estos canales están presentes en todas las líneas de células linfoides estudiadas hasta la fecha, incluyendo a las maduras que se encuentran en la circulación, las asesinas naturales (Schilchter et al, 1986), las $CD4^+$ o colaboradoras, las $CD8^+$ o citotóxicas, las T citotóxicas aloreactivas en el humano (DeCoursey et al, 1985), así como los tímocitos (McKinonn y Ceredig 1986), líneas T citotóxicas (Fukushima et al, 1984) y los clones T colaboradores murinos (Lee et al, 1992); además de una amplia variedad de líneas linfoides (DeCoursey et al, 1987) y de células de la línea B (Chandy et al, 1985b; Brent et al, 1986).

En general estos canales muestran conductancias (inversa de la resistencia) al flujo de iones máximas de entre 2 y 12 nS las cuales varían con el tamaño de la célula y con la densidad de canales por célula. Con estos valores de conductancia, Grinstein y Dixon (1989) estimaron una densidad de 400 canales por célula con un promedio de 3 canales por micra cuadrada de superficie de membrana. De acuerdo con

la dependencia de voltaje de los procesos de activación e inactivación del canal, en promedio, uno o dos de estos canales deben estar abiertos al valor de su potencial de reposo. En células de murinos el número de canales parece ser muy reducido, del orden de 10 canales por célula (DeCoursey et al, 1985, McKinnon y Ceredig, 1986). Sin embargo, la densidad de canales por célula varía dentro de la misma especie dependiendo de la fuente tisular y del estado de desarrollo y activación de los linfocitos (Lee et al, 1986; McKinnon y Ceredig, 1986; De Coursey et al, 1987b).

Los canales $K^+(V)$ linfocitarios muestran propiedades farmacológicas características; por ejemplo, la inhibición máxima promedio de esta corriente se obtiene con 8 – 14 mM de tetraetilamonio (TEA), 15 a 30 mM de quinina o quinidina y 300 a 400 mM de 4-aminopiridina (4-AP), los cuales también son inhibidores de $K^+(V)$ en otras células. Estos canales también se inhiben con los bloqueadores orgánicos de los canales de Ca^{++} como el verapamil y el diltiazem, en concentraciones de 6 a 7 y 60 mM, respectivamente (Chandy et al, 1984; Schlichter et al, 1986). También se inhiben con bloqueadores inorgánicos del tipo del La^{3+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} (Chandy et al, 1984; Fukushima et al, 1984; Matteson y Deutsch, 1984; Schlichter et al, 1986). Además, agentes como el ácido retinoico, el cual es una sustancia inmunomoduladora que interfiere con la actividad de la proteína cinasa C, es un potente bloqueador de los $K^+(V)$ en linfocitos T y asesinos naturales de humano (Sidell et al, 1986).

Cuadro 2

*TIPOS DE CANALES K⁺(V) EN CÉLULAS T DE HUMANO Y DE MURINO

	Tipo <i>n</i> (normal),	Tipo <i>n'</i> (similar a <i>n</i>),	Tipo <i>l</i> (grande)
Conductancia:	12 – 18 pS,	18 pS,	21 – 27 pS
Compuerto:			
V _{1/2} :	-30 a -40 mV,	- 10 mV,	0 mV
Inact. depend uso:	Sí,	No	No
Vel de cierre	Lenta,	Lenta	Rápida
τ a - 60 mV.:	30 ms,	30 ms,	1 ms
Farmacología:			
TEA	Aprox. 10 mM,	Aprox 100 mM	Aprox. 0.1 mM
CTX	300 pM	<< 5 nM	No se bloquean.
NTX	nM	No se bloquean	No se bloquean
MTX	nM	No se bloquean	No se bloquean
KTX			
Genes codif	Kv1 3	-----	Kv3.1
Niveles de expresión en reposo:	T humano: 100 – 500/ cel T y B murinos: 5-50/cel	T de Murinos Entre 100 y 500/cel.	-----
Niveles de expresión durante la proliferación:	T humano: >500/cel T y B murinos: >500/cel.,	-----	

Cuadro 2.- V_{1/2}: es el valor del potencial de membrana al que la mitad de los canales están activados. La inactivación dependiente de uso se refiere a la disminución progresiva en el pico de la amplitud de la corriente de K⁺ durante la aplicación de pulsos de 200 ms a +30 mV aplicando un pulso por segundo. La constante de tiempo de tasa de cierre se determinó desviando las curvas de un solo potencial a las corrientes de cola medidas más allá de la repolarización a -60 mV

siguiendo una breve despolarización para activar los canales. *Un estudio de canales unitarios de K^+ en parches de membrana de linfocitos de humanos, mostraron al menos dos tipos de canales con características diferentes a los n y a los l , uno de los cuales tiene propiedades que podrían explicar la actividad de regulación de la disminución del volumen insensible a CTX que se observa en timocitos de rata. Se ha propuesto como origen de estos canales adicionales: splicing alternativo, expresión de genes de canales adicionales como los IsK , formación heteromultimérica, modulación de las propiedades del canal por otra subunidad del canal, por agrupamiento de canales o por modificaciones post-traduccionales (Lewis y Cahalan, 1995)

Los linfocitos T de murinos en reposo expresan decenas de canales de K^+ , pero su número empieza a aumentar a partir de unas 12 horas postestimulación con mitógenos policlonales, alcanzando un máximo de cientos por célula a las 24 y 48 horas. En un periodo similar las células se hiperpolarizan en aproximadamente -10 mV en relación a su potencial de membrana en reposo, el cual es de aproximadamente -65 a -75 mV, por el aumento en la conductancia al K^+ . El importante incremento en el número de los $K^+(V)$ en respuesta a los mitógenos parece ser un prerrequisito para el compromiso ulterior en las funciones efectoras, ya que el bloqueo de estos canales suprime eventos inmunológicos como la proliferación, la activación, la secreción de interleucina-2 (IL-2) y la destrucción de células blanco por las células T citotóxicas (CD8) y NK (Chandy et al, 1985a; Solana y Mariani, 2000).

Como consecuencia de estos resultados, cada vez existen más evidencias de que la actividad linfocitaria se encuentra estrechamente relacionada con las movilizaciones iónicas a través de canales selectivos (Ricci y cols, 1996). En el caso de los linfocitos, se mostró la participación de los canales de potasio en la activación celular (Chandy et al, 1984), en la regulación del volumen celular (Deutsch y Chen, 1993) y en los mecanismos que tratan de corregir los efectos de un incremento del K^+ extracelular (Steinert y Grissmer, 1997). Adicionalmente, los canales $K^+(V)$ participan en los procesos de citotoxicidad y la modulación de la

apoptosis linfocitaria (Sidell y cols 1986) y en la apoptosis de las células blanco (Binah y col, 1997). La mayor parte de estas funciones, son resultado de procesos de señalización membranar e intracelular en las que participan además de los canales de K^+ , otros canales iónicos y todo un conjunto de moléculas intracelulares que constituyen las vías de activación intracelular

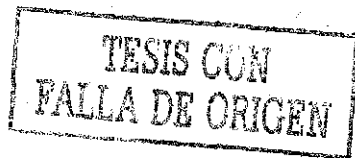
Una de las funciones mejor descritas de los canales $K^+(V)$, es su participación en la modulación del volumen celular (Cahalan y Lewis, 1987). Tal función se manifiesta cuando los linfocitos son sumergidos en un medio hipotónico. La respuesta inicial es un aumento en su volúmen, resultado de una mayor permeabilidad al agua que a los solutos, sin embargo después de unos minutos el volúmen celular regresa a sus dimensiones originales, independientemente de la osmolaridad externa. Esta regulación implica un incremento en el eflujo del K^+ de manera importante, aunque en forma transiente después del choque hipotónico y que disminuye gradualmente conforme se restaura el volumen celular normal. La tasa máxima del eflujo de K^+ en estas condiciones es de al menos 10 veces en relación al flujo que se presenta en soluciones isotónicas (Bui y Wiley, 1981; Cheung et al, 1982). Se mostró además que en esta regulación se incrementa la actividad de los intercambiadores iónicos del tipo de Na^+/H^+ (Grinstein y Rothstein, 1985; 1986). Sin embargo el papel de los $K^+(V)$ en esta regulación resulta imprescindible, ya que las células que carecen de ellos, como es el caso de los linfocitos B de las amígdalas, son incapaces de regular su volumen (Gelfand et al, 1984, 1987).

En lo que respecta a los mecanismos de proliferación linfocitaria, existen evidencias, tanto directas como indirectas, que muestran que los $K^+(V)$ participan en el inicio de la actividad proliferativa, ya que su bloqueo provoca la inhibición de los eventos que conducen a la división celular (De Coursey et al 1984; Lee et al 1986). Así, fármacos como el

TEA (Kavanaugh et al, 1991), la quinina, el cetiedil, el verapamil y el diltiazem que reducen la conductancia en los $K^+(V)$ bloquean la mitosis linfocítica inducida por lectinas, IL-2, Concanavalina A (ConA), o por la adición de antígenos (Drakopoulou et al, 1995). La inhibición es particularmente importante en la síntesis de IL-2 y de ADN (Deutch, et al., 1989). Además las anomalías linfoproliferativas observadas en la cepa MRL-1 de ratones, se asocian invariablemente con la presencia de tipos y números aberrantes de $K^+(V)$ (Chandy et al, 1986)

Cuando se añaden agentes mitogénicos a diferentes poblaciones de linfocitos, una de las primeras respuestas es un incremento en las movilizaciones del ion potasio (Segel et al, 1981, Inversen, 1976; Hamilton y Kaplan, 1977; Holian et al, 1979; Owens y Kaplan, 1982). Estos agentes tienen la propiedad de activar los sistemas de transporte transmembranal, incluidos canales iónicos, mediante la participación de los sistemas de señalización intracelulares, entre los que destacan la concentración intracelular del ion calcio. Por ejemplo, el incremento en la $[Ca^{++}]_i$ activaría a canales de potasio dependientes de calcio (K^+Ca^{++}), lo que provoca un incremento en la hiperpolarización. Tal efecto no se muestra cuando se agregan soluciones libres de calcio o se emplean agentes calcio-quelantes en el compartimento intracelular. En esta situación la hiperpolarización es sustituida por una despolarización como consecuencia de la entrada de Na^+ (Tatham et al, 1986; MacDougall et al, 1988).

Estos resultados también son indicativos de que el papel de los canales de K^+ en la proliferación y activación de linfocitos humanos consiste en la inducción de un potencial de membrana hiperpolarizante necesario para la iniciación y propagación de la señal mitogénica. Tal participación es fundamental, pues el empleo de bloqueadores de canales de K^+ , los cuales depolarizan a las células T (Leonard et al, 1992) inhibe el mecanismo de señalamiento intracelular, lo que se



traduce como una inhibición de la proliferación y de la activación linfocitaria (Oettgen et al, 1985) Tales datos sugieren una interacción funcional muy importante entre estos canales y los mecanismos de transporte y manejo del calcio intracelular (Cahalan et al, 1985).

En este sentido, algunos estudios han mostrado que la expresión de los canales de K^+ es dependiente del tipo de factor mitogénico que se utilice. Entonces, la estimulación de los receptores de antígenos incrementa la expresión de canales $K^+(V)$ y de canales de K^+ dependientes de calcio, mientras que con el empleo de lipopolisacáridos (mitógenos bacterianos) sólo se incrementa la expresión de los canales $K^+(V)$ (Pariseti et al, 1993)

La hiperpolarización que se observa al inicio de la activación linfocitaria es consecuencia de cambios en la cinética de los canales $K^+(V)$, así, De Coursey y cols (1987b) mostraron que la adición de fitohemaglutinina (PHA, un inductor de la activación linfocitaria) a linfocitos T aislados de sangre periférica de humanos, modifica significativamente la relación corriente-voltaje de estos canales. Esta relación se desplaza hacia valores más negativos de -10 a -15 mV, de esta manera, un mayor número de canales abren al valor del potencial de reposo y se incrementa el flujo saliente de K^+ (Chandy et al, 1985a y 1985b). Las corrientes de K^+ detectadas por diversos autores son de tipo lento y se presentaron varias horas después de la adición de lectinas, ésteres de forbol o IL-2 (Matteson y Deutsch, 1984; Deutsch et al, 1989, Lee et al, 1986). Además de este cambio cinético la corriente de potasio se incrementa como consecuencia de un aumento en el número de $K^+(V)$ sintetizados *de novo* (Matteson y Deutsch, 1984).

De igual manera, los canales $K^+(V)$, participan en el establecimiento de la citotoxicidad que desarrollan algunas poblaciones de linfocitos como los CD8 y los NK. Entonces durante la inducción, establecimiento y desarrollo de la citotoxicidad se muestra un incremento en la

permeabilidad al K^+ y un mayor número de canales cuando estas células se asocian a la célula blanco y durante la actividad lítica (Russell y Dobos, 1983). Al igual que con la activación linfocitaria, esta acción citotóxica es también sensible a la presencia de bloqueadores específicos de los $K^+(V)$ (Sidell et al, 1986)

Adicionalmente, cuando se mantiene la estabilidad del potencial de membrana, mediante la actividad de los $K^+(V)$, se propicia la supervivencia celular; mientras que las alteraciones prolongadas en este parámetro celular propician la muerte celular programada o apoptosis. Algunas proteínas que bloquean los mecanismos apoptóticos, como las expresadas por el gen *mcl-1*, son activadas cuando el potencial de membrana se mantiene hiperpolarizado por la acción de los canales $K^+(V)$. Esto indica que durante la hiperpolarización inducida por una corriente saliente de potasio, no se activa la ruta apoptótica (Wang et al, 1999).

Desde esta perspectiva, la serie de fenómenos electrofisiológicos y bioquímicos que culminan con la activación linfocitaria, aunque aún controversial en algunos aspectos, ha sido definida en términos generales. Estos se inician con la unión del ligando (antígenos, mitógenos, citocinas, fitohemaglutinina, etc) a su receptor en la membrana celular linfocitaria. Esta unión provoca una activación inicialmente de canales de Na^+ , lo cual provoca una ligera despolarización de muy corta duración. Esta despolarización, induce una activación de los canales de Ca^{++} y de potasio dependientes de voltaje. La activación de los primeros provoca un consecuente aumento en la concentración intracelular de calcio $[Ca^{++}]_i$. Mientras que la activación de los segundos, primero reduce la despolarización y posteriormente provoca una hiperpolarización, la cual se ve incrementada por la activación de los $K^+(Ca^{++})$, resultado del incremento en la concentración intracelular de calcio.

El mantenimiento de la hiperpolarización celular trae como consecuencia la activación de proteínas G, lo cual consiste en la disociación de las subunidades $\beta\gamma$ de la α . esta última se fijará y activará a la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima actuando sobre algunos fosfolípidos formará dos mensajeros intracelulares el fosfatidil inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DG) El IP_3 constituye un ligando para receptores específicos en el retículo endoplasmático rugoso, los cuales al activarse promueven la salida de iones calcio de las cisternas endoplasmáticas (calciosomas), hacia el citoplasma con lo cual se incrementa aún más la concentración intracelular del calcio.

Por otra parte, la presencia del DG, a su vez trae como consecuencia la activación de una PKC, la cual transporta el mensaje hacia el núcleo donde se encuentra la maquinaria que modificará la expresión génica del linfocito.

Cuando el estímulo inmunológico ha cesado, se presenta la activación de bombas Na^+/K^+ dependientes de Mg^{++} , la activación del sistema secuencial de transporte de protones Na^+/H^+ , la activación de la bomba de Ca^{++} y otras bombas electrogénicas, cuya actividad traerá como consecuencia el restablecimiento de las concentraciones intracelulares de iones con lo cual la membrana del linfocito se repolariza (Bason y Zamoyska, 2000)

De acuerdo con esta secuencia, el evento que asocia los cambios electrofisiológicos que ocurren en la membrana celular con aquellos que suceden a nivel de la expresión genética, es el incremento en la concentración intracelular de calcio. Esto ocurre como consecuencia de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje y como resultado de la activación de receptores a IP_3 localizados en el retículo endoplasmático de esta células Este incremento, para lograr el objetivo, debe ser secuencial y ocurrir en sólo algunos de los microdominios intracelulares, ya que el incremento del calcio en secuencias diferentes o

en porciones intracelulares diferentes, no provoca el proceso de activación linfocitaria (Ricci, et. al., 1996). En este sentido la participación de los canales iónicos de la membrana celular consiste en mantener un ambiente electrogénico adecuado para asegurar el flujo transmembranal de calcio con la cinética y características necesarias, para lo cual resulta indispensable la participación de los canales iónicos de K^+V (Vergehugen, 1998)

Los canales de potasio activados por voltaje pertenecen a un grupo de proteínas integrales transmembranales que poseen un papel muy importante en la determinación de las propiedades eléctricas de la membrana celular. Estas proteínas transmembranales sufren cambios conformacionales que permiten que los iones difundan a través de la estructura formadora de un poro. Los canales K^+V están conformados por 4 subunidades idénticas. Cada una de ellas está organizada de tal forma que las 4 conforman un poro central. Cada subunidad está integrada por aproximadamente 600 aminoácidos, acomodados en seis alfa-hélices empotradas en la porción lipídica de la membrana (Fig. 3).

Cada una de las subunidades del canal de potasio tetramérico está formada por seis segmentos denominados de S_1 a S_6 ; uno de estos segmentos, el S_4 , está constituido principalmente por aminoácidos cargados positivamente, se considera a esta región como el sensor de voltaje. Ninguna de las hélices forma parte del poro propiamente dicho. Un segmento de cada subunidad, formado por 20 aminoácidos, adquiere una configuración beta-laminar antiparalela respecto a la línea del poro al cual se le atribuye la permeabilidad al potasio. Cada canal tiene por lo tanto dos elementos funcionales: un sensor de voltaje, a través del cual se detectan cambios en el potencial de membrana, y un poro, a través del cual permean selectivamente los iones de potasio (Doyle, et al., 1998; Cha et al., 1999; Wang et al., 2000).

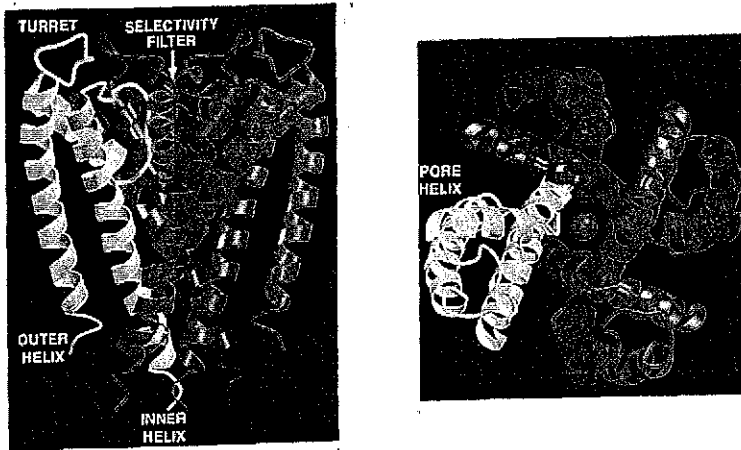


Fig. 3.- Modelo representativo de un canal de potasio dependiente de voltaje mostrando como se dispone en la membrana celular. Se presentan las subunidades conformando el canal. En el diagrama se puede observar el filtro de selectividad, la cavidad o poro del canal y la compuerta de activación con el sensor de voltaje así como los compartimentos intracelular y extracelular.

Aunque estos canales son dependientes de voltaje, su funcionamiento está sujeto a una modulación aguda y a una de largo plazo. La modulación aguda en los linfocitos es consecuencia de estímulos específicos como citocinas, antígenos, lectinas, mitógenos, hormonas y neurotransmisores (Bacon y cols, 1995; Bretschneider y cols, 1995; Verheugen y Vijverberg, 1995a; Nagy y cols, 1995) y algunos factores poco conocidos como el ATP₄, forma ácida libre del ATP (Markwardt y cols, 1997), mientras que su modulación a largo plazo depende de procesos de fosforilación-desfosforilación que ocurren en la proteína formadora del canal, gracias a la acción de enzimas del grupo de

fosfatasas y cinasas endógenas las que a su vez se activan cuando se unen los mensajeros a los receptores de la membrana (Holmes y cols, 1996). Esta modulación se ejerce a través de modificar algunos de los parámetros cinéticos de estos canales iónicos, es decir modificaciones en su selectividad, compuerteo o "gating" (serie de mecanismos que participan en la apertura y cierre de un canal), conductancia (facilidad con la cual los iones fluyen a través de un canal), activación (tasa y voltaje a la cual el canal se abre) e inactivación (tasa y voltaje a la cual el canal reduce su conductancia). Cada uno de estos parámetros tiene sus propias características y son debidos a procesos que pueden ser independientes o interdependientes (Doyle et al, 1998)

Además de los $K^+(V)$, en la membrana de los linfocitos existen otros tipos de canales de K^+ ; entre ellos están los rectificadores entrantes (KIR, Fig 4), los cuales muestran una alta conductancia a las corrientes entrantes y muy pobre a la saliente con activación de la corriente a valores hiperpolarizantes (Lewis y Cahalan, 1988). En las diferentes células excitables estos canales son muy importantes en el mantenimiento del potencial de reposo y en el control de la excitabilidad, sin embargo, su reducido número en los linfocitos les resta importancia en esta función. Durante las despolarizaciones estos canales muestran una mínima corriente saliente lo que permite que se prolongue la despolarización por la entrada continua de Na^+ y Ca^{++} , mientras que durante la hiperpolarización, debido a su alta conductancia, evita una excesiva carga negativa lo que ayuda precisamente a conservar el valor del potencial de membrana de la célula en valores próximos al potencial de equilibrio del potasio. La rectificación entrante, que caracteriza a estos canales, se debe principalmente al bloqueo de la corriente saliente por iones Mg^{++} localizados en el interior del canal, ya que en ausencia de este ion los KIR muestran una relación $I - V$ lineal (Kubo et al, 1993). Algunos cationes extracelulares como el Ba^{++} y el Cs^+ bloquean

el canal en una forma dependiente del voltaje y del tiempo transcurrido después de su activación lo que sugiere que los iones bloqueantes entran al canal abierto y así detectan la caída del voltaje en la membrana. La fuerte dependencia del bloqueo en relación al voltaje indica que hay múltiples sitios de unión para el Cs⁺ en el canal (Kubo et al, 1993).

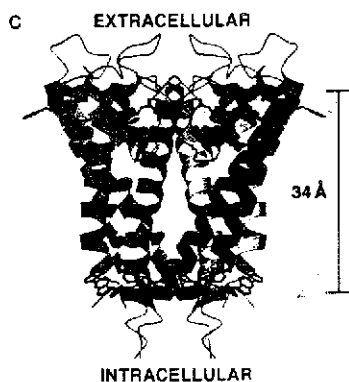


Fig. 4 Desde un punto de vista estructural los canales de potasio rectificadores entrantes muestran una estructura muy compleja. Se trata de 4 subunidades con 6 dominios transmembranales cada uno. En este esquema se muestra la probable disposición de dos subunidades en relación al resto de los componentes. Usualmente las asas tanto intra como extracelulares son muy largas.

El otro tipo de canal muy importante en la activación linfocitaria, lo constituyen los canales de calcio. La presencia de estos canales de calcio en linfocitos ha sido ampliamente documentada y permiten explicar las

modificaciones intracelulares en la concentración de calcio las cuales son pivotales dentro de la fisiología de estas células. Con el uso del colorante indo-1 que reacciona al calcio, se ha observado una respuesta bifásica a la activación linfocitaria, que se inicia con un pico en la $[Ca^{++}]_i$ que dura entre 1 y 2 minutos el cual se atenúa para posteriormente presentar una meseta de menor intensidad y más sostenida (Gelfand et al, 1987b). Como se ha mencionado, la respuesta inicial más intensa se origina por el transporte transmembranal del calcio extracelular, mientras que la meseta se relaciona con la liberación del Ca^{++} de los almacenes intracelulares. El patrón de incremento del calcio intracelular, depende también de la forma como se active al linfocito. Así, la estimulación con fitohemaglutinina (PHA) aumenta la corriente entrante de Ca^{++} principalmente por un aumento en la probabilidad de apertura del canal sin afectar la conductancia unitaria ni el tiempo promedio de apertura. La adición de PHA lleva a la producción de una corriente unitaria que oscila entre 1 a 10 pA después de 100 a 300 segundos de añadido el fármaco (Lewis y Cahalan, 1989).

Los canales de calcio en el retículo endoplásmico de los linfocitos muestran una conductancia de aproximadamente 7 pS y una corriente de aproximadamente 30 pA a un voltaje de membrana de -60 mV, éstos no son sensible al voltaje y dependen del IP_3 (Lewis y Cahalan, 1989).

Algunos estudios muestran que tanto la estructura como la fisiología de prácticamente todas las membranas celulares se modifican durante el envejecimiento; esto incluye el flujo de iones de potasio en la membrana de linfocitos de humanos (Panyi et al, 1994). Por ejemplo, se ha mostrado una disminución en el número y actividad de las ATPasas Na^+/K^+ de tejido cerebral de la rata (Kennedy y cols, 1985) y en las células del cristalino de conejo (Delamere y Dean, 1993). Además y en relación con el sistema inmune, los linfocitos T de ratones viejos de la cepa C57BL/6, mostraron una reducción en la amplitud de la corriente

de K^+ dependiente de Ca^{++} . Este efecto de acuerdo a los autores, es la causa de una decreciente respuesta proliferativa que muestran los linfocitos provenientes de animales viejos cuando se estimulan con ésteres de forbol o con ionomicina. En estos animales también se observó un mayor influjo de calcio, por lo que es posible que se genere una alteración en la vía de transducción de señales, la cual altera la intensidad de la corriente de K^+ , y desacopla los mecanismos que conducen a la proliferación (Zeng y cols, 1996)

También la cinética del calcio se altera en los linfocitos de la misma forma que ocurre en los linfocitos de pacientes que desarrollan la enfermedad de Alzheimer, pero a diferencia de éstos, no hay cambios en la concentración de calcio citosólico (Ibarreta y cols, 1997). Las alteraciones que se producen en las ATPasas por el envejecimiento, repercuten en las concentraciones iónicas, básicamente porque se trata de bombas electrogénicas, por ello se modifica el potencial de reposo con una tendencia hacia la despolarización lo que disminuye la sensibilidad inmunológica (Deutsch y Price 1982). También fenómenos como la blastogénesis, que conduce a la diferenciación y la proliferación, la cual para su ejecución requiere de desplazamientos iónicos a ambos lados de la membrana plasmática se modifica en forma significativa, por la menor actividad de las ATPasas (Tanner y cols, 1993) Desde un punto de vista electrogénico se reportó que en la activación de células T de ratón y de humanos, se presenta una corriente de K^+ como el evento electrofisiológico más temprano (Strauss y col, 1998)

A pesar de la importancia de las corrientes iónicas transmembranales en la activación linfocitaria, aún se desconoce si como consecuencia del envejecimiento se presentan cambios en estas corrientes. Existen algunos reportes que describen una disminución en la conductancia de los canales de potasio de linfocitos provenientes de sangre venosa de humanos (Panyi et al, 1994) pero no se ha descrito la conducta de las

corrientes de K^+ salientes en las diferentes edades en linfocitos de murinos. ni la existencia de algún cambio en los parámetros cinéticos del canal que expliquen un posible cambio en la actividad de éste. Por tal razón, nos hemos planteado realizar un estudio dirigido al análisis de las corrientes de K^+ generadas por canales $K^+(V)$ en linfocitos aislados de sangre venosa de ratas de la cepa Wistar jóvenes, adultas y seniles.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desacoplamiento e incordinación de la respuesta inmune que se presenta en sujetos envejecidos es un fenómeno ampliamente descrito. Esta alteración es consecuencia de una disminución de la respuesta de los linfocitos T y B ante estímulos con mitógenos, antígenos, citocinas y otros inductores de la activación linfocitaria (Whisler et al, 1996; Pieri et al, 1992). Los defectos funcionales en estos linfocitos de sujetos viejos se presentan en todas las etapas de la activación linfocitaria, desde el enlace del ligando a su receptor, pasando por la transducción de señales y la formación de segundos mensajeros, hasta los procesos genómicos de síntesis y expresión de proteínas (Whisler et al, 1996), lo que provoca cambios en el patrón de poblaciones de linfocitos (Varga et al, 1990).

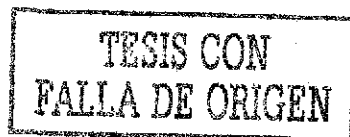
Algunos autores han mostrado que el valor del potencial de membrana se correlaciona con el grado de activación linfocitaria y/o con la disponibilidad de la célula para someterse a la activación (Gelfand et al, 1987a). El potencial de membrana (PM) de linfocitos aislados de sangre venosa de personas adultas normales y de murinos, no estimulados, tiene un valor promedio que oscila entre -70 y -80 mV (Deutsch y Price, 1982, Cahalan et al, 1989), mientras que los estimulados muestran un valor promedio de -59 mV (Verheugen y cols, 1995). Este valor disminuye paulatinamente aún más conforme se incrementa la edad del individuo, observándose valores hasta de -42 mV en edades mayores a los 90 años, lo mismo se observó en linfocitos de murinos (Witkowski y Micklem, 1985).

Como consecuencia de estos datos, se ha sugerido una relación entre sensibilidad inmunológica y el valor del potencial de membrana, esto es, mientras más depolarizado se encuentre el linfocito, menor es su

sensibilidad a todos los inductores de la activación, lo contrario también resulta cierto. De hecho, valores extremos de despolarización traen como consecuencia una pérdida de la irritabilidad celular (Lichtstein, 1995). Los cambios y modificaciones en el valor del potencial de membrana sólo pueden ser consecuencia de tres tipos de alteraciones: cambios en la actividad de la enzima ATPasa Na^+/K^+ (Redmann y Walliser, 1981), cambios en las concentraciones iónicas en ambos lados de la membrana, lo cual modifica todos los potenciales de equilibrio de los iones y cambios en las conductancias de los canales iónicos transmembranales (Webb y cols, 1995) o a una combinación de estos factores, lo cual se manifiesta en diversas patologías (Hirsch y Parks, 1983; Cheng y cols, 1984, Vincenzi y cols, 1986, Luppá y Muller, 1986; El-Mallakh y Li, 1993; Buss y col, 1996)

En términos generales, la estabilidad del potencial de membrana de los linfocitos, es función de factores tanto intra como extracelulares, por ejemplo, el transporte activo, la presencia de sales aniónicas o proteinatos dentro de la célula, el canal de fuga del potasio y el estado fisiológico por el que cursa la célula, son los factores intracelulares fundamentales (Sjodin, 1984, Kabakov, 1994) Los extracelulares son múltiples y muy diversos, sin embargo, se considera que los más relevantes son: la concentración sanguínea de hormonas, de neurotransmisores y de factores de crecimiento, la presencia de patologías que involucran directa o indirectamente a poblaciones linfoides como los diferentes tipos de leucemia, los padecimientos gripales agudos y crónicos, el efecto de la polifarmacia y la edad del donador (Dasmahapatra y cols, 1985)

Como consecuencia del gran número de factores que participan en la homeostasis del potencial de membrana, resulta difícil definir un mecanismo de acción común para todos ellos, o bien la participación de cada uno de ellos en los cambios del potencial de membrana observados



Sin embargo, se sugiere que la mayor parte de estos cambios pueden obedecer a un proceso común que reside en la estructura de la membrana celular. Durante el envejecimiento se modifica la estructura de la membrana plasmática lo que provoca un cambio en cuanto al tipo y número de receptores superficiales; además la relación fosfolípidos/colesterol se modifica sustancialmente, cambiando con ello la fluidez de la membrana celular y por ende, la actividad de las enzimas ATPasa Na^+/K^+ dependiente de Mg^{++} , la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C, entre otras (Cahalan et al 1989). Seguramente que este cambio de fluidez deberá reflejarse también en la actividad de los canales iónicos, cuyo análisis implica el registro de sus propiedades cinéticas a través de las génesis de sus corrientes. La descripción de los procesos inducidos por el envejecimiento a nivel de la membrana celular de los linfocitos, nos permitiría inicialmente comprender la dinámica de los cambios que resultan de la inmunosenectud y posteriormente, diseñar estrategias que amortiguen y/o reduzcan los cambios inmunológicos deletéreos que produce el envejecimiento. Con este objetivo, resulta de mucho interés el analizar la electrofisiología de la membrana del linfocito en general y algunos canales de potasio en particular, como el rectificador saliente dependiente de voltaje ó $\text{K}^+(\text{V})$, cuya actividad está íntimamente correlacionada con la fisiología de los linfocitos, ya que se encarga de mantener la estabilidad del potencial de membrana. Tal análisis se pretende realizar en linfocitos obtenidos de sangre venosa de ratas jóvenes (2 a 3 meses), adultas (10 a 12 meses) y viejas (>24 meses de edad), ya que éstos constituyen un modelo de estudio muy accesible, confiable y reproducible para el análisis de estos parámetros.

HIPOTESIS

Si el envejecimiento se acompaña de una reducción en la activación linfocitaria y ésta es consecuencia de un potencial de membrana estable, entonces en los animales viejos, los mecanismos que mantienen y regulan el valor del potencial de membrana, fundamentalmente los canales de potasio, mostrarán parámetros y actividades diferentes a los observados en linfocitos de animales jóvenes.

OBJETIVOS

- 1 - Describir algunas propiedades electrofisiológicas, como potencial de membrana, resistencia de entrada y capacitancia que muestran los linfocitos provenientes de sangre venosa de ratas de jóvenes (2 a 3 meses), adultas (10 a 12 meses) y seniles (más de 24 meses de edad).
- 2 - Determinar las propiedades cinéticas de la corriente de canales de potasio dependientes de voltaje tal como conductancia, activación, inactivación, dependencia de voltaje, τ de activación e inactivación en linfocitos provenientes de ratas albinas de las tres diferentes edades antes referidas
- 3 - Comparar los valores de los parámetros obtenidos en linfocitos de ratas jóvenes, adultas y seniles

METODOLOGÍA.-

Para realizar este protocolo de investigación se emplearon linfocitos de sangre periférica de ratas macho de la cepa Wistar de tres diferentes edades. El grupo de ratas jóvenes estuvo conformado por 12 ratas cuya edad osciló entre 2 a 3 meses, para ese momento su peso corporal fue en promedio de 203 ± 4.8 g. El grupo de ratas maduras ($n=12$) tenían una edad de 10 a 12 meses con un peso promedio de 617 ± 16.9 g. Finalmente el grupo de ratas viejas estaba constituido por 16 ratas con una edad que osciló entre 24 y 34 meses de edad y tenían un peso corporal de 659 ± 23 g en promedio.

Estos animales fueron mantenidos en condiciones de laboratorio con temperatura controlada, y con ciclos de luz-oscuridad de 14-10 hrs, respectivamente. Todos los animales se mantenían en jaulas individuales con acceso libre al agua y alimento (Purina Rat Chow) y fueron tratados con todos los procedimientos requeridos para evitar molestias o dolor innecesario.

En el día de registro se tomaba una muestra de 2 ml de sangre periférica por punción de la vena caudal ventral o dorsal con una jeringa estéril desechable previamente heparinizada. Para ello se fijaba al animal en un sujetador especial, desde 15 minutos antes para reducir al máximo el estrés. El estudio fue prospectivo y longitudinal, por lo que se tomaron muestras a las mismas ratas con periodos de recuperación de un mes entre cada toma. La muestra de sangre se diluyó con solución salina balanceada (SSB) a partes iguales y se sometió a la técnica de sedimentación por gradiente (Boyum, 1968).

De acuerdo a esta técnica en un tubo de centrífuga se colocan 3 ml de Phycoll-Hypaque (Pharmacia) y sobre este polímero se deposita

cuidadosamente la suspensión que contiene la sangre ya diluída. Se centrifuga la muestra a 500 rpm durante 30 minutos, lo que provoca que se precipiten los leucocitos polimorfonucleados, eritrocitos y plaquetas, quedando separados los linfocitos junto con los monocitos. Posteriormente se toma la suspensión de células mononucleares con una pipeta Pasteur y se transfieren a un tubo de centrífuga limpio. A la suspensión de mononucleados se agregan 3 ml de SSB, la mezcla se resuspende con una pipeta Pasteur y se centrifuga nuevamente a 1000 rpm durante 5 minutos. Pasados éstos se retira el sobrenadante y se hace un segundo lavado con SSB, para volver a centrifugar nuevamente, para finalmente retirar la SSB.

El material celular obtenido se diluyó en 1 ml de solución estabilizadora (en mM NaCl 150, KCl 3.3, Na_2HPO_4 8.6 y KH_2PO_4 1.69, con un pH ajustado a 7.4) y se mantuvo a una temperatura ambiente por una hora para equilibrar eléctrica y osmóticamente a las células. Al término de éste tiempo se colocaron las células en cajas Falcon de plástico estériles, en las que previamente se habían colocado 3 ml de solución extracelular (en mM NaCl 160, KCl 4.5, CaCl_2 2, MgCl_2 1 y HEPES 5, con pH de 7.4 y una osmolaridad de 290 – 310 mOsm). Se procuró la adherencia de los linfocitos al fondo de la caja Falcon (ya que también sirvió como cámara de registro) para lo cual se dejó inmóvil la caja durante 10 a 15 minutos. Posteriormente la cámara de registro se colocó sobre la platina de un microscopio invertido (Olympus CK2) y con la ayuda de micromanipuladores e iluminadores de fibra óptica se procedió a realizar un sello de alta resistencia entre la punta del microelectrodo de registro y la membrana de los linfocitos.

Se seleccionaron los linfocitos en función de su apariencia y tamaño, usualmente se eligieron células que eran translúcidas y birrefringentes que mostraban un núcleo íntegro y bien delimitado, con un tamaño cercano a las 8 micras de diámetro. Una vez localizada la

célula y colocada en el centro del campo visual, se introducía un microelectrodo de vidrio, sellado herméticamente y con una pequeña presión positiva, con una punta entre 1 y 2 micras, lo cual corresponde a una resistencia óhmica de entre 2 y 5 Megahoms. Una vez en el baño y gracias a la aplicación de un pulso de voltaje de aproximadamente 5 mV, administrado a través del electrodo, se determinaba la resistencia y capacitancia del electrodo y solución, por lo que se procedía a la cancelación visual de las corrientes transientes capacitivas y al balance de cualquier potencial de unión. Realizada tal compensación se procedía a poner la punta del microelectrodo en las inmediaciones de la célula. En estas condiciones se liberaba la presión positiva del electrodo y se aplicaba una pequeña presión negativa que atraía la célula e inducía la formación del sello de alta impedancia.

Posteriormente con una presión negativa adicional se rompía la membrana celular que se encontraba dentro de los bordes del sello, con lo cual se obtenía la configuración de célula-integra. Inmediatamente se aplicaba un voltaje de fijación de -60 mV y se mantenía en esta situación alrededor de 7 minutos, antes de iniciar cualquier protocolo de estimulación. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente. La primera determinación que se realizó fue la medición del potencial de membrana. Para ello se cambiaba, durante dos minutos, el amplificador de fijación de voltaje al de fijación de corriente con $I=0$. Posteriormente se aplicaron los protocolos para determinar las corrientes salientes de potasio, así como los correspondientes que nos permitieron registrar la activación e inactivación con sus respectivas constantes de tiempo (τ). El protocolo consistió en la aplicación de pulsos despolarizantes a partir de -60 mV hasta +60 mV en etapas de 10 mV entre cada uno de ellos y con una duración de 1500 mseg.

Las corrientes iónicas intrínsecas producidas por los canales rectificadores entrantes de K^+ de la membrana de los linfocitos se

registraron en configuración de célula íntegra con amplificadores Axopatch 2B en conjunto con una interfase convertidora analógica-digital, Digidata 1200 (Axon Instruments, CA, USA); las corrientes fueron filtradas a 1 kHz y digitalizadas a 5 kHz. Se emplearon filtros de low-pass aplicados a la mitad de la frecuencia de la captura de datos.

Los electrodos de Patch fueron elaborados con capilares de vidrio de borosilicato (WPI, 150F) en un estirador de micropipetas de dos etapas (Narishige PP-83) y se pulía la punta con alta temperatura en una microforga (Narishige MF-123) hasta obtener una punta con un diámetro de entre 1 a 2 micras. Estos electrodos mostraban una impedancia óhmica in situ, medida en 4.5 mM de K^+ , de 3-4 MOhms. Los electrodos se estiraban inmediatamente antes de su uso y se llenaban con una solución intracelular que contenía en mM: KCl 140; $CaCl_2$ 1; $MgCl_2$ 2; ATP 1.2; Gluconato de sodio 10; EGTA 11 y HEPES 10, ajustándose el pH en 7.3 y la osmolaridad a 300 – 320 mOsm con KOH.

La aplicación de los diferentes protocolos de estimulación, el proceso de digitación, la captura y almacenaje de los datos, así como su análisis fue realizado gracias al software de Axon Instruments, instalado en una computadora PC. El programa de captura fue el pclamp 6.0, mientras que el de análisis fue el clampfit 4.0. Se realizaron las curvas I-V correspondientes. La mayor parte de las corrientes fueron normalizadas de acuerdo a la corriente pico o máxima; se valoraron además las densidades de corrientes, calculándose el mejor ajuste posible de los datos. Se realizaron gráficas comparativas entre los sujetos de diferentes edades y se calcularon las diferencias estadísticas con la prueba de t de Student. Solo si la comparación arrojaba una diferencia con una $p < 0.05$ se consideraba como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se registraron linfocitos de sangre venosa provenientes de 12 animales jóvenes (2 a 3 meses de edad, 203 ± 4.8 g de peso corporal) 12 maduros (10 a 12 meses de edad y 617 ± 16.9 g) y 16 viejos (20 a 34 meses, 659 ± 23 g) De cada uno de estos grupos se obtuvieron 30 células que fueron registradas, en promedio de 3 a 4 linfocitos por sesión para animales jóvenes y maduros y de 2 a 3 para los animales viejos

Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio y al momento de la punción, mostraban una aparente condición general óptima, sin mostrar signos o síntomas de enfermedad alguna. Ninguno de los sujetos empleados recibió pretratamiento alguno y siempre fueron mantenidos con acceso libre al alimento y agua en jaulas individuales. Los animales viejos, fueron vigilados constantemente en sus condiciones generales, si algún animal mostraba algún signo o síntoma de algún proceso infeccioso o degenerativo, éste era eliminado de la muestra. Por esta circunstancia se eliminaron del experimento 8 animales.

Una vez dentro de la cámara de registro, se identificaban los linfocitos en función de tamaño y morfología con respecto al resto de células presentes y se procedía a realizar el sello de alta resistencia. Desde un punto de vista cualitativo, la formación de sellos fue relativamente más fácil en animales jóvenes donde la resistencia de los mismos osciló entre 28 y 89 GigaOhms con un promedio y desviación estándar de 69.8 ± 22.87 Gohms, en estas mismas células la resistencia de acceso fue en promedio de 36.8 ± 6.9 MegaOhms. Por otra parte, en el caso de los linfocitos provenientes de animales maduros los sellos mostraron resistencias que oscilaron en el rango de 20 y 97 GigaOhms con un promedio de 54.3 ± 26.8 GigaOhms, mientras que la resistencia de acceso fue en promedio de 45.32 ± 9.8 MegaOhms. Finalmente con los registros de animales viejos logramos sellos que oscilaron entre 6 y 46

GigaOhms con un promedio de 26.9 ± 16.9 GigaOhms y una resistencia de acceso de 65.89 ± 21.34 Megaohms. Sin embargo a pesar de estas variaciones, no encontramos diferencia estadística significativa alguna en estos datos

El primer parámetro electrofisiológico que se midió fue el potencial de membrana. Este fue determinado en todas las células aproximadamente 7 minutos después de alcanzar la configuración de célula íntegra. Para ello se utilizaba el mismo preamplificador pero ahora en configuración de current clamp con $I=0$, es decir no se aplicaba corriente alguna, por lo que tanto el voltaje como la corriente que se registraba, oscilaban libremente. En estas circunstancias observamos que el potencial de membrana mostraba oscilaciones espontáneas que usualmente tendían hacia la hiperpolarización, lo cual se asociaba temporalmente con una corriente saliente. Tales oscilaciones siempre se mantuvieron en un rango menor de -10 milivoltios. (Fig. 5)



Fig. 5 -La mayor parte de linfocitos mostró oscilaciones en el valor de su potencial de membrana con respecto al tiempo. Estas oscilaciones fueron casi siempre hacia el lado de la hiperpolarización, tal como se muestra en este registro proveniente de un linfocito de rata joven. Esta hiperpolarización se asocia temporalmente con una corriente saliente de entre 5 y 8 pA, como se observa en la parte inferior del registro

El potencial de membrana promedio encontrado en animales jóvenes fue de -72.7 ± 2.07 ($n = 20$); mientras que en el caso de los animales maduros éste mostró un valor promedio de -52.06 ± 2.08 ($n = 30$) y en los animales viejos fue de -47.6 ± 2.51 ($n = 34$). Como puede observarse el valor más negativo se observó en los sujetos jóvenes, mientras que el más positivo se registró en linfocitos provenientes de sujetos viejos. La gráfica de la figura 6, muestra una correlación positiva ($r = 0.94$) entre la edad de los individuos y el valor del potencial de membrana de sus linfocitos.

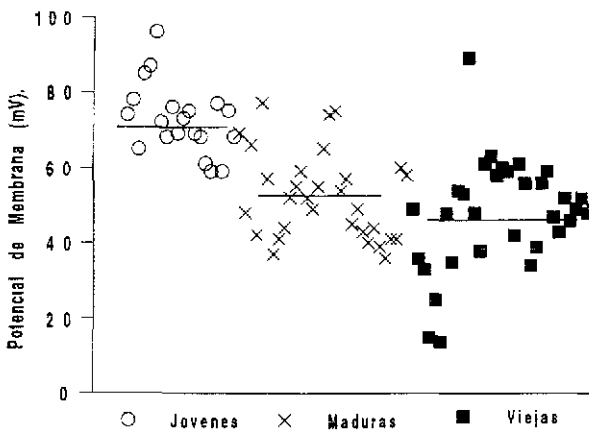


Fig. 6 - En la gráfica se aprecian los valores individuales del potencial de membrana de cada una de las células registradas. Los linfocitos provenientes de sujetos jóvenes ($n = 20$) mostraron los valores más negativos con un promedio de -72.2 ± 2.07 , en tanto que en los linfocitos de ratas maduras ($n = 30$) y viejas ($n = 34$) fue de -52.06 ± 2.08 y -47.6 ± 2.51 mV, respectivamente. Los valores promedio están representados por las líneas horizontales.

El siguiente parámetro celular que se estudió fue la capacitancia de la célula. El valor de esta constante se determinó desde que se realizaba la transición de la modalidad de patch-clamp de célula unida (cell-attached) a célula completa (whole-cell), debido al incremento repentino en los transientes de la corriente capacitiva, como resultado de acceder a la célula completa. Entonces la capacitancia de la célula fue medida por integrar la corriente durante un pulso de voltaje de 20 mV, substrayéndole el valor de una línea basal establecida durante 10 mseg antes de aplicar el pulso. En el caso de los sujetos jóvenes, sus linfocitos mostraron un valor promedio de 1.24 ± 0.12 pF (n=6), mientras que los linfocitos provenientes de sujetos maduros (n=6) mostraron un promedio de 1.35 ± 0.17 pF. Los linfocitos provenientes de sujetos viejos (n=6) mostraron el valor más alto, con un promedio de 1.54 ± 0.16 pF. El análisis estadístico con la prueba t de Student, mostró la existencia de una diferencia significativa, únicamente al comparar los valores de los linfocitos de sujetos jóvenes con aquellos de los individuos viejos. En términos generales el valor de la capacitancia se asocia con el área de la membrana celular de una manera directamente proporcional. Esto sugiere que en promedio los linfocitos provenientes de animales viejos, muestran una mayor área de membrana celular que los provenientes de individuos jóvenes.

En el registro de patch-clamp, el potencial de fijación se estableció en -60 mV. Aunque las soluciones tanto extra como intracelulares fueron diseñadas para el registro de las corrientes de potasio, en algunas células es posible observar corrientes de sodio y/o de calcio con estas mismas soluciones; sin embargo, en nuestros registros con la aplicación de pulsos de voltaje que llevaron el potencial de membrana desde -60 hasta +40 mV, no se detectaron corrientes entrantes de ninguna índole en la totalidad de células registradas (n=90). Por el contrario la aplicación de este protocolo depolarizante induce la

presencia de corrientes salientes que muestran una dinámica y cinética específicas. En este sentido la figura 7 muestra un registro representativo de las corrientes salientes de potasio registradas en sujetos jóvenes, las cuales fueron obtenidas con un protocolo que fijaba el voltaje en pulsos durante 1000 mseg y desde un valor de -60 hasta +40 mV en etapas de 10 mV

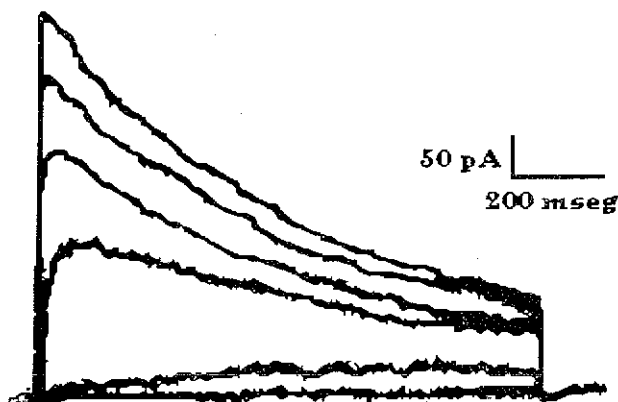


Fig. 7.- La aplicación de pulsos despolarizantes crecientes en voltaje desde un valor de -60 hasta +40 mV genera corrientes salientes que muestran una rápida activación y una inactivación más lenta. En este registro proveniente de un linfocitos de un animal joven se obtuvo una corriente máxima de aproximadamente 425 pA.

El registro que se muestra en la figura 7 proviene de un linfocito de una rata joven. En promedio este grupo ($n = 30$) mostró una corriente máxima a los +40 mV de 111 ± 25.5 pA con una τ de activación de 1.89 ± 0.07 mseg. En la misma figura 7 se observa que estas corrientes muestran una importante inactivación, en este mismo grupo de linfocitos la τ de inactivación mostró un valor de 375.15 ± 18.3 mseg, mientras que la corriente al final del pulso o la corriente no inactivante, también llamada del estado estacionario fue en promedio de 84 ± 7.7 pA.

Finalmente en esta figura se muestra la dependencia del voltaje tanto de las corrientes como de las constantes de activación e inactivación, lo cual es característico de los canales de potasio tipo $K^+(V)$

Correspondientemente, la figura 8 muestra la curva corriente-voltaje, de todos los linfocitos ($n = 30$) provenientes de animales jóvenes. En esta gráfica se muestra el promedio de la corriente pico instantánea la cual corresponde al máximo valor de corriente y el promedio de la corriente estacionaria la cual fue calculada en los últimos 5 msec antes de finalizar el pulso

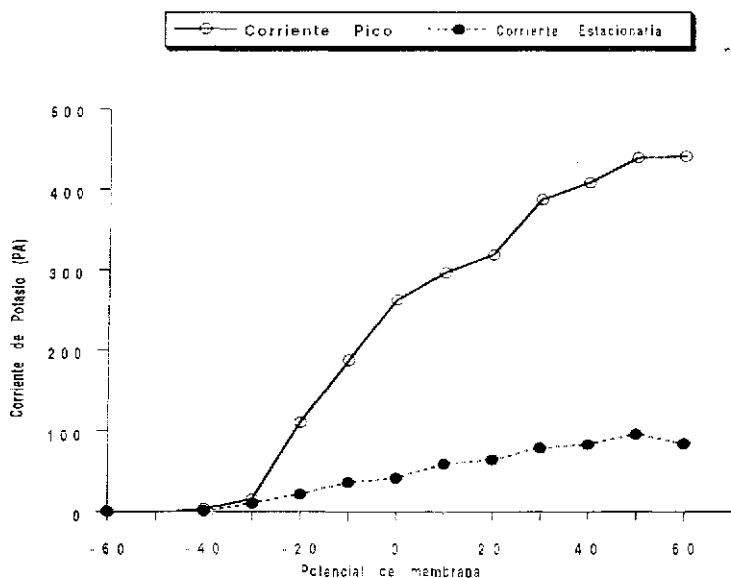


Fig. 8 Curva corriente-voltaje que relaciona la corriente pico y estacionaria con el valor del potencial de membrana del grupo de linfocitos ($n=30$) provenientes de ratas jóvenes. La corriente se inicia entre -50 y -40 mV y alcanza un valor máximo entre $+50$ y $+60$ mV. El área comprendida entre ambas curvas corresponde a la corriente que se inactiva. En esta gráfica se aprecia claramente la dependencia del voltaje de la corriente.

Se observa que esta corriente empieza a activarse a los -40 mV y la corriente pico rectifica a -30 mV lo que muestra su dependencia de voltaje. Mientras que la corriente en el estado estacionario muestra un incremento con un componente casi-lineal

Con el objetivo de realizar un estudio comparativo entre los linfocitos provenientes de las tres edades, aplicamos el mismo protocolo de estimulación a linfocitos provenientes de los otros grupos de animales. Los resultados de tal maniobra pueden observarse en la figura 9.

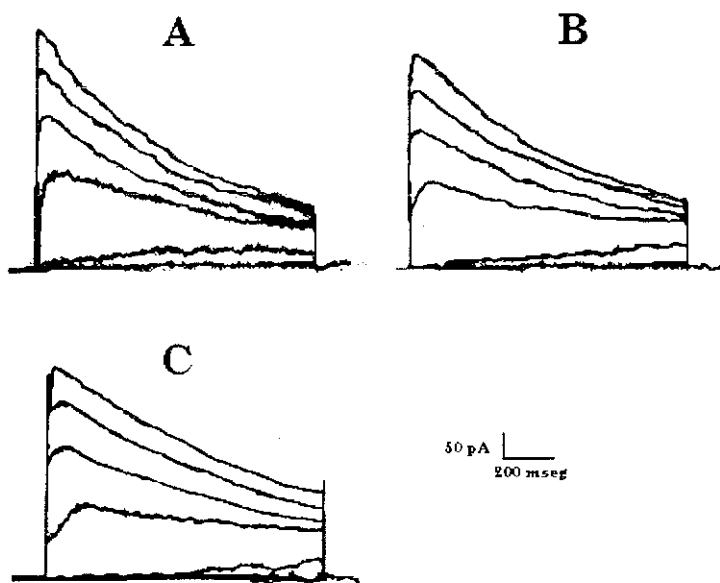


Fig.9 - Registros comparativos de corrientes salientes obtenidos en linfocitos provenientes de cada uno de los 3 grupos de animales. En A se observan los registros de linfocitos de un animal joven, en B se trata las respuestas de los linfocitos de una rata madura y en C los de una rata vieja. Se aprecia que los dos tipos de corriente (transiente y estacionaria) tienen un comportamiento diferente de acuerdo a la edad.

Los resultados de los análisis realizados en estas corrientes

mostraron la existencia de diferencias significativas en ellas. Así, por ejemplo la corriente pico o máxima fue diferente en los tres grupos, ésta fue de 441 ± 25.5 pA para el grupo de jóvenes, 412 ± 15.7 para el grupo de maduras y 378 ± 22.2 pA para las viejas. Además la τ de activación fue de 1.89 ± 0.07 , 2.43 ± 0.10 y 2.93 ± 0.09 mseg para los linfocitos provenientes de ratas jóvenes, maduras y viejas, respectivamente. En ese mismo orden los valores de las t de inactivación fueron de 375.15 ± 18.3 , 394.43 ± 23.6 y 421.29 ± 34.8 mseg. La figura 10 muestra las relaciones I-V de las corrientes pico de los 3 grupos de linfocitos

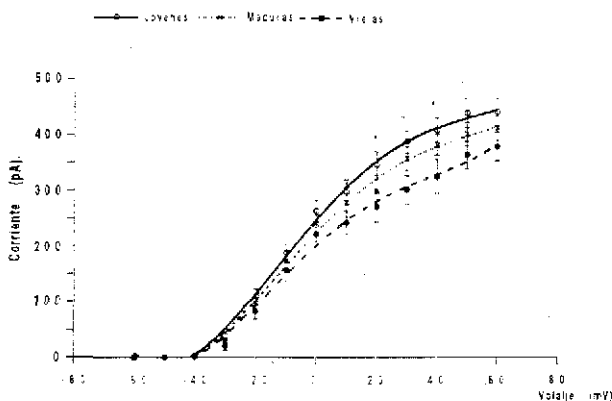


Fig. 10 -Gráfica del promedio ($n=16$) de la corriente instantánea o transiente en la cual se muestra que el valor de la corriente es inversamente proporcional a la edad sobre todo en voltajes mayores a 20 mV, donde se muestra una diferencia estadística ($p < 0.05$) sólo entre los grupos de linfocitos jóvenes y viejos

También se observaron diferencias significativas en la corriente estacionaria. En este caso los jóvenes mostraron valores promedio de 84 ± 7.7 , los maduros de 117 ± 8.2 y los viejos de 131.56 ± 7.4 mV. Como se observa en la figura 11, estas corrientes fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) en sujetos viejos en voltajes de 20 mV y mayores

al contrastarse con los valores de los linfocitos de ratas jóvenes. Estas corrientes se inician desde un voltaje de -50 mV y alcanzan un valor máximo a 60 mV y muestran un incremento de forma casi lineal. En voltajes hiperpolarizantes estos valores son muy similares, sin embargo, las diferencias se incrementan conforme el voltaje de la membrana se hace menos negativo y más positivo (fig 11)

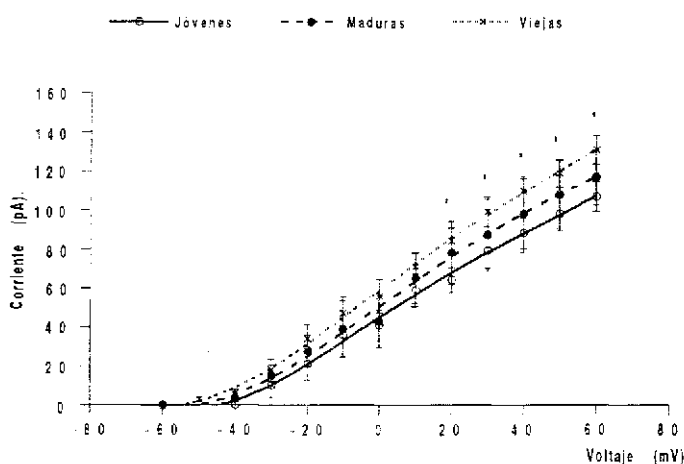


Fig 11 - Se muestra el promedio (n=16) de la corriente estacionaria, la cual también mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los grupos de linfocitos de ratas jóvenes y viejas, sólo que a diferencia de la corriente instantánea, la relación es directamente proporcional ($p < 0.05$)

Estos resultados muestran que las constantes cinéticas de los $K^+(V)$ son diferentes entre los linfocitos de las tres edades. En la figura 12, se muestran los resultados de los registros de las corrientes pico, obtenidos con un pulso que llevó el potencial de membrana hasta +40 mV, sobrepuestos donde se aprecian visualmente los cambios descritos en las correspondientes I-Vs. Estas diferencias, fueron mejor descritas

cuando calculamos la dependencia del voltaje para la activación e inactivación, así como para la deactivación de esta corriente.

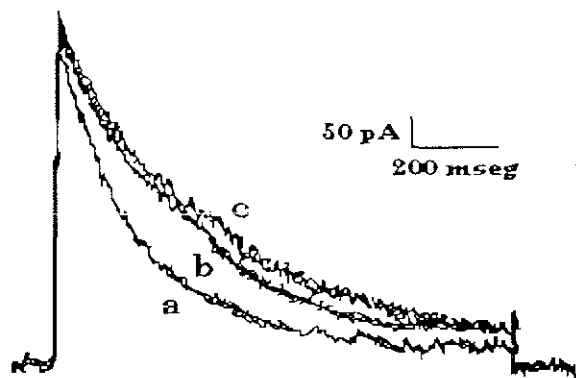


Fig 12.-La sobreposición de las corrientes máximas obtenidas en los 3 diferentes tipos de linfocitos muestra que las cinéticas de activación y principalmente de inactivación son diferentes. Además de que los valores de corriente tanto instantánea como estacionaria difieren entre sí, tal como se mostró en las curvas I-V ya descritas

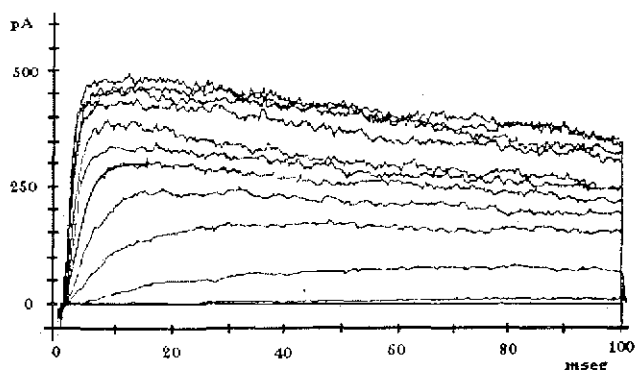


Fig 13 - Para estudiar la dependencia de voltaje de la activación y utilizando una velocidad de muestreo de 10 KHz y un filtro de captura de 5 KHz se aplicó el mismo protocolo durante 100 msec. Con estos datos elaboramos la curva de activación correspondiente

Para estudiar la activación, decidimos aplicar el mismo protocolo, pero ahora utilizamos una velocidad de captura de 10 KHz y abrimos el filtro de captura hasta 5 KHz. también modificamos la duración del pulso hasta sólo 100 msegundos

La aplicación de tal protocolo indujo corrientes como las que se observan en la figura 13. Se observa que la administración de pulsos más negativos induce una lenta activación con casi nula inactivación, mientras que la aplicación de los pulsos con mayor voltaje provoca la aparición de corrientes con una muy rápida activación y una inactivación mayor. La parte ascendente de la curva se ajusta al modelo de comportamiento tipo n4, descrito por Hodgkin y Huxley.

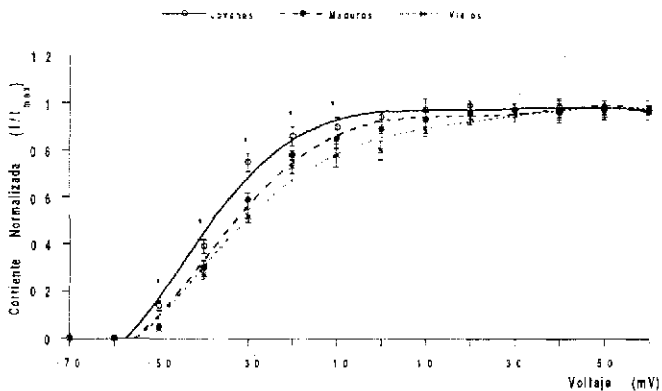


Fig 14 - La dependencia de voltaje de estos canales fue diferente de acuerdo a la edad del individuo del cual provenían estas células, entonces el voltaje medio de activación ($V_{1/2a}$) fue de -38.55 mV para los sujetos jóvenes, -33.73 mV para los sujetos maduros y -30.62 para los sujetos viejos.

En las curvas de la figura 14 es posible calcular un parámetro descrito como el voltaje medio de activación ($V_{1/2a}$), el cual en teoría corresponde al voltaje de la membrana en el cual la corriente alcanza el

50% de su valor total. Este parámetro entonces nos indica el grado de excitabilidad de la célula. El $V_{1/2}$ de los linfocitos de sujetos jóvenes fue en promedio de -38.55 mV, mientras que los sujetos maduros mostraron un valor promedio de -33.73 y los viejos de -30.62 . Si consideramos que el potencial de membrana se encuentra fijo en -60 mV, entonces se necesita un estímulo mayor para activar estas corrientes en linfocitos viejos, comparativamente con los jóvenes. Las diferencias más importantes se encuentran entre los valores de voltaje de -50 y $+30$ mV, mientras que en los extremos las diferencias son mínimas. Estadísticamente se mostraron diferencias ($p < 0.05$) desde -50 hasta 0 mV.

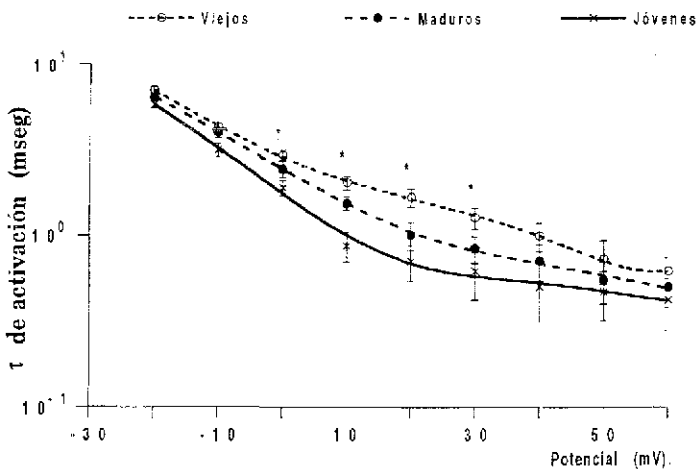


Fig. 15 - En esta gráfica se comparan la dependencia del voltaje de las τ de activación (constantes de tiempo) de las corrientes salientes de potasio de los 3 diferentes grupos de linfocitos ($n=16$). Estos valores se incrementaron con respecto a la edad. En valores de voltaje desde 0 hasta 30 mV, las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En esta gráfica la escala de las ordenadas es logarítmica.

Con la aplicación de este protocolo es posible también definir las constantes de tiempo de esta activación. Al ser los canales de K^+ dependientes de voltaje entonces este parámetro cinético, también muestra dependencia de voltaje. En la fig. 15 se muestra una gráfica que compara el promedio de las constantes de activación de 16 linfocitos de cada grupo de ratas a diferentes valores de voltaje. Aunque existen diferencias cualitativas en toda la gráfica, con valores de voltaje desde 0 hasta +30 mV, hay diferencias significativas entre los linfocitos de sujetos jóvenes con aquellos de sujetos viejos. Estos datos muestran que los viejos requieren de un más tiempo para activarse.

En el caso de la inactivación, ésta fue analizada empleando un protocolo de prepulsos o pulsos condicionantes que llevaron el potencial de membrana desde -120 hasta +20 mV durante 1 minuto, para después poner el pulso de prueba en +20 mV por 100 milisegundos. Las corrientes obtenidas con este procedimiento se observan en la figura 16.

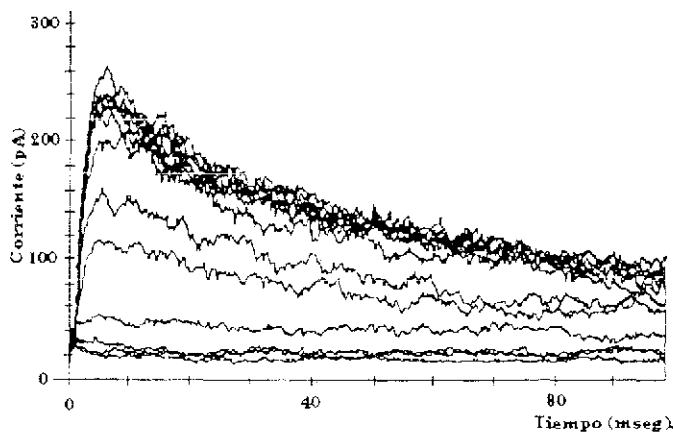


Fig. 16 - Empleando un protocolo donde se aplica un prepulso de 1 min desde -120 hasta +20 mV y un pulso de prueba en +20 mV, con duración de 100 mseg, se determinó la dependencia de voltaje de la inactivación. En esta figura se muestran las corrientes inducidas por dicho protocolo de una célula proveniente de un sujeto joven.

Al analizar esta curva se observa que se ajusta de manera puntual con una ecuación de Boltzmann de primer orden. La figura 17 fue realizada calculando la corriente normalizada para cada valor de voltaje en células de los tres grupos de animales (n=16). Para ello se dividió la corriente obtenida con cada uno de los voltajes aplicado entre la corriente máxima.

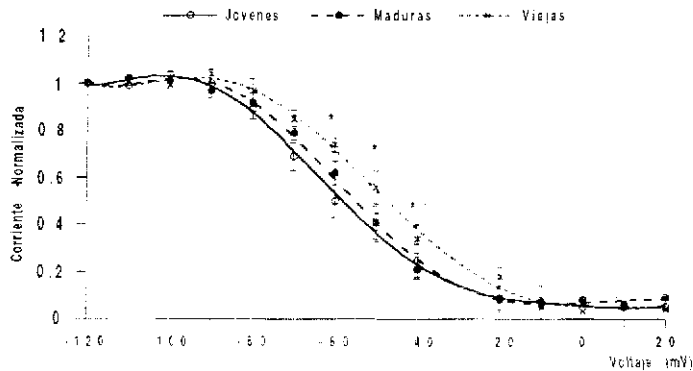


Fig 17 - Se muestra la curva de inactivación de los tres grupos de linfocitos (n=16). Aunque en los extremos los valores son aproximadamente los mismos, en la parte exponencial de la curva estos son diferentes. Por lo tanto, el valor de inactivación ($V_{1/2}$) para los jóvenes fue de -58.23 mV, de -55.53 para los maduros y finalmente de -47.50 para los viejos. Estadísticamente, los valores entre -60 y -40 mV de las ratas viejas y jóvenes fueron diferentes ($p < 0.05$).

A partir de estas curvas se calculó el valor del voltaje medio de inactivación ($V_{1/2}$); dicho voltaje describe el valor del potencial de membrana al cual se encuentra el 50% de los canales inactivados. Este voltaje fue para los jóvenes de -58.23 , de -55.53 y -47.50 mV, para los linfocitos provenientes de ratas maduras y viejas respectivamente.

Como se observa y en conjunto con los valores del $V_{1/2}$ de activación, los canales de sujetos viejos tardan más en activarse y se inactivan más lentamente que los de los sujetos jóvenes lo que explicaría, en parte, la menor corriente encontrada en los primeros. De los valores registrados en la figura 16, también obtuvimos el valor de las τ de inactivación y las graficamos con respecto al valor del potencial de fijación de la membrana para determinar la dependencia del voltaje. Los resultados de esto se observan en la figura 18.

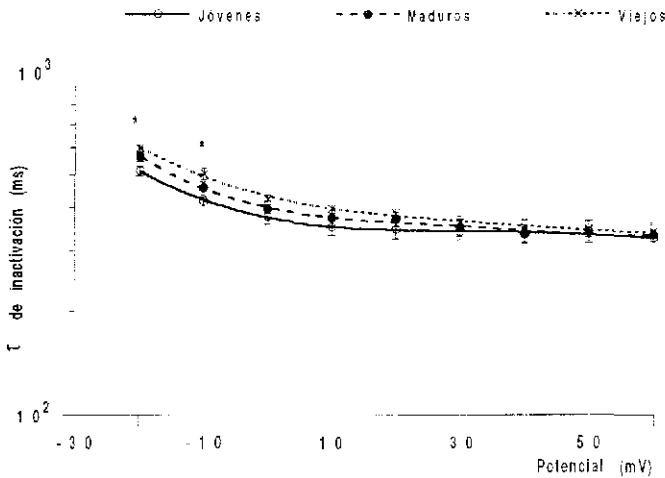


Fig. 18 - Se observaron variaciones en la τ de inactivación; aunque sólo los dos puntos más negativos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) cuando se compararon los registros de linfocitos provenientes de sujetos jóvenes con aquellos de ratas viejas. Como se observa el efecto de la edad se manifiesta principalmente en los valores más negativos. La escala de las ordenadas es logarítmica. *= $p < 0.05$

Para analizar el proceso de la deactivación recurrimos al registro

de las corrientes de cola. Para ello se llevó el potencial de membrana con un prepulso de duración de 1 seg hasta +20 mV y posteriormente el pulso de prueba mantenía durante 200 mseg el potencial de membrana en valores que oscilaban desde -110 hasta +30 mV. Los registros obtenidos con este protocolo de pulsos se ejemplifican en la figura 19, la cual proviene de un linfocito de una rata joven.

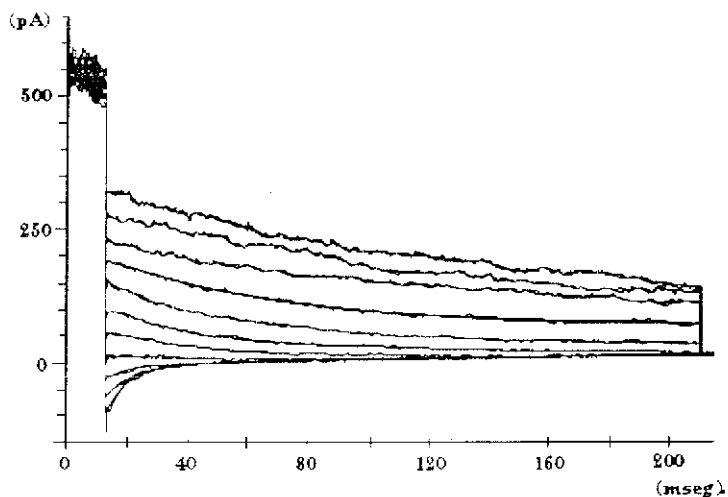


Fig 19.- El análisis de las corrientes de cola se realizó con la aplicación de un protocolo en el que se administraba un prepulso de 1000 mseg de duración que mantenía el voltaje en +20 mV; mientras que el pulso de prueba (con duración de 200 mseg), varió desde -110 hasta +30 mV; la medición del valor de la corriente se determinó en los primeros 5 mseg. Este registro fue obtenido de un linfocito de una rata joven.

El decaimiento de la corriente al retirar el pulso es decir la deactivación, mostró un comportamiento exponencial que puede describirse por una ecuación de primer orden en la función de Boltzmann, muestra claramente que la deactivación sigue un patrón específico determinado por el voltaje de la membrana celular. Para

describir en más detalle tal situación y realizar un análisis comparativo se realizó la curva I-V de las corrientes de los tres grupos de linfocitos (n = 16), los resultados de este análisis se muestran en la figura 20

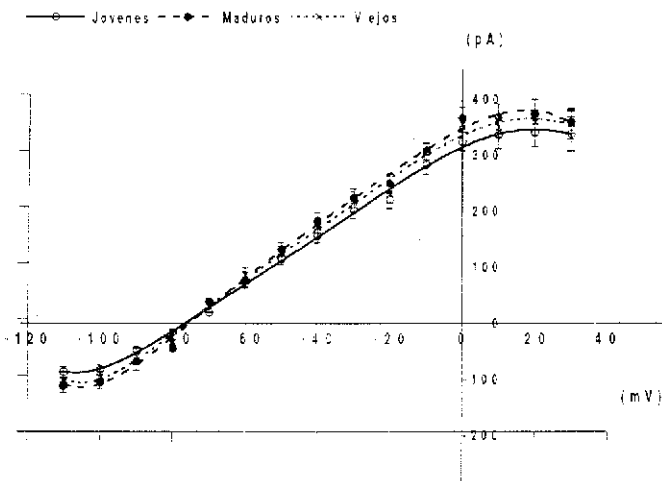


Fig 20 - Relación I-V de las corrientes de cola de los 3 diferentes grupos de linfocitos (n = 16) donde se observan ligeras diferencias que no son estadísticamente significativas en las relaciones de la corriente con el voltaje

El análisis estadístico de estos datos mostró que no existen diferencias entre los grupos al comparar los valores de corrientes de cola. Aunque cualitativamente se observa que conforme se incrementa la edad se observa un ligero incremento en la pendiente de la conductancia de este canal. Con los trazos de corriente de cola de la figura 19, se calcularon las τ de desactivación a los diferentes valores del potencial de membrana. Los resultados de tal análisis se muestran en la figura 21. Al igual que con las curvas I-V, el análisis de las constantes de tiempo de la

deactivación no mostró diferencias estadísticamente significativas, aunque cualitativamente con voltajes menos negativos los sujetos viejos mostraron constantes de tiempo más largas. En términos generales, los resultados mostraron que los linfocitos de los sujetos viejos desarrollan menores corrientes y una cinética de activación inactivación y deactivación diferentes que las mostradas por los sujetos jóvenes.

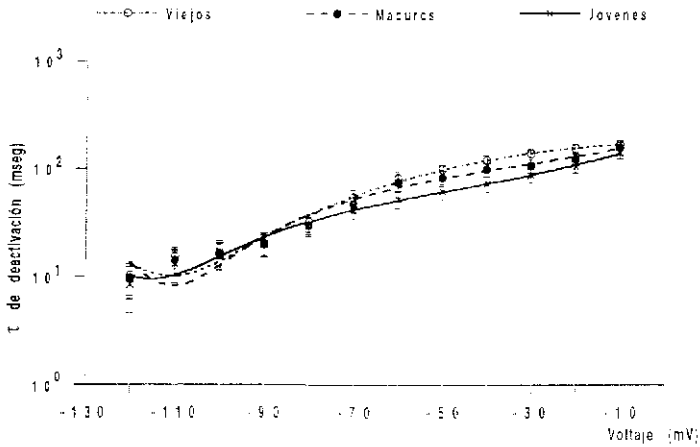


Fig 21 - En el caso de la τ de deactivación también las diferencias no fueron significativas, aunque cualitativamente en los valores menos negativos se mostraron diferencias importantes.

DISCUSIÓN

Tanto la incidencia como la intensidad de muchos cuadros patológicos es mayor en individuos viejos que en sujetos jóvenes. Esta observación que parece obvia, conlleva un trasfondo relacionado con una disfunción inmunológica muy importante. Es decir, la presencia de estas patologías en la vejez es causa o efecto del propio envejecimiento. En otras palabras, la disfunción inmunológica provoca la vejez o el transcurso del tiempo es la consecuencia de tal alteración inmunológica. De acuerdo con las teorías que se han desarrollado para explicar el origen de la vejez, la disfunción inmunológica es considerada como un efecto (Miller 1996). Sin embargo, existen individuos muy viejos de determinadas especies, incluyendo humanos, que no muestran tal alteración inmunológica (Franceschi 1995).

En general, el envejecimiento debe considerarse como una resultante de la interacción de factores externos con aquellos internos propios de cada individuo, que ocurre en una determinada etapa de su ciclo vital. Esta conjunción de factores lleva a la expresión y/o represión genómica, lo cual delinea los caracteres estructurales y funcionales del estado específico por el que cursa el sistema a lo largo de su ciclo vital (Johnson et al. 1999). Desde un punto de vista terapéutico es deseable prevenir, evitar o incluso revertir la susceptibilidad de los individuos viejos a todo este conjunto de patologías, caracterizadas como enfermedades de la senectud. Se trata de una mayor vulnerabilidad a las infecciones, a las enfermedades degenerativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades autoinmunes (Rink et al. 1998). El cumplir con este objetivo, requerirá fundamentalmente del conocimiento de los procesos tisulares, celulares y moleculares responsables de esta disfunción inmunológica. Por lo que es necesario primero describir en forma puntual como se lleva a cabo el proceso de activación inmunológica y

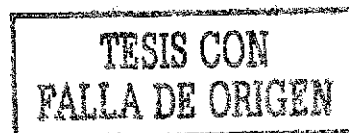
posteriormente determinar que ocurre en los sujetos conforme su edad avanza, inquiriendo simultáneamente las causas de los posibles cambios funcionales en estos elementos

Múltiples estudios han mostrado que la piedra angular en el proceso de la respuesta inmunológica en la inmunidad adquirida o activa reside en los linfocitos T (Abbas et al 1994) Estas células poseen receptores membranales a mitógenos y antígenos, por lo que son las responsables directas del inicio de este tipo de respuesta inmunológica (Segel, 1981) En este sentido ante la presencia de un inmunógeno, los linfocitos T entran en acción a través de un proceso definido como activación linfocitaria (Miceli y Parnes 1993) Una de las primeras fases de la respuesta de los linfocitos es un cambio en el potencial de membrana Algunos autores han descrito que el cambio más consistente en esta respuesta es una hiperpolarización (Grinstein y Dixon, 1989), aunque también se ha descrito la presencia de una despolarización (Gelfand et al 1987a Pieri et al 1989) e incluso un proceso en el cual primero se observa una despolarización breve seguida por una hiperpolarización (Grinstein y Dixon 1989) Sin embargo cuando se bloquea esta hiperpolarización se inhibe la activación linfocitaria (DeCoursey et al 1987) Bajo estas circunstancias el valor del potencial de membrana en reposo es fundamental para determinar la disponibilidad funcional de los linfocitos Nuestros hallazgos señalan que los linfocitos provenientes de ratas de tres diferentes edades tienen potenciales de reposo diferentes. Estos valores fueron -72.2 ± 2.07 .

-52.06 ± 2.08 y -47.6 ± 2.51 para los linfocitos provenientes de ratas jóvenes, maduras y viejas respectivamente Estos resultados sugieren que los animales jóvenes tienen una mayor disponibilidad y menor dificultad para ser activados inmunológicamente La causa por la cual los linfocitos mostraron estas diferencias probablemente reside en diferencias estructurales en la membrana celular que se han venido

dando por el transcurso del tiempo

El potencial de membrana resulta de la distribución asimétrica de iones a ambos lados de la membrana, de sus propiedades energéticas y de permeabilidad. En condiciones de reposo, la permeabilidad a la mayoría de iones está reducida, con la excepción del ión potasio. Este ión posee un potencial electroquímico consecuencia del voltaje de la membrana y a su distribución asimétrica entre el interior y el exterior celular, muy cercano al potencial de membrana de la célula en reposo. En términos generales y en la mayoría de las células el potencial de equilibrio del potasio es de 10 a 15 mV más negativo que el valor del potencial de membrana en reposo. Tal diferencia genera una fuerza electromotriz que obliga al potasio a salir continuamente de la célula, por la dependencia que guarda el potencial de membrana con el flujo continuo del potasio, algunos autores han llamado a estos canales "de fondo" o "subyacentes" (Shrivastava y Sansom, 2000). Sin embargo, la presencia de bombas metabólicas que movilizan el potasio extracelular hacia el interior de la célula revierte el efecto de la salida de potasio y se genera una condición estable. Si se incrementa la salida del potasio, entonces la célula adopta valores más negativos, lo que significa la existencia de una hiperpolarización. La mayor parte del flujo transmembranal de potasio ocurre gracias a la presencia de canales en la membrana celular. Estos canales poseen mecanismos de "compuerreo", cuya función básicamente consiste en modular la entrada o salida de iones de la célula y por ende de la corriente que atravieza la célula (Ortega et al, 2000). Los que parecen ser fundamentales en la activación linfocitaria son los de potasio y de éstos, aunque se ha descrito la presencia de canales de potasio rectificadores entrantes, de canales de potasio dependientes de calcio y de canales de potasio dependientes del voltaje, los que resultan pivotaes en este proceso son estos últimos, los cuales constituyen verdaderos rectificadores salientes celulares (De



Coursey et al, 1984).

Estos canales, los cuales son muy similares a los descritos en estructuras excitables, muestran una cinética que les da la peculiaridad de ser dependientes de voltaje (Lewis y Cahalan, 1988). Entonces, procesos como la activación, la inactivación y la deactivación son constantes cinéticas, todas ellas dependientes del voltaje.

Los registros iniciales mostraron que con las soluciones intra y extracelular empleadas, únicamente podíamos registrar corrientes de potasio salientes, pero no detectamos corrientes de sodio o de calcio en estas circunstancias. Se diseñó el protocolo para detectar las corrientes. En él, a partir del potencial de sostenimiento (-60 mV) se aplicaban pulsos crecientes que llevaban el potencial de la membrana hasta +60 mV en etapas de 10 mV durante 1 segundo.

Un ejemplo de las corrientes salientes de potasio registradas en este trabajo se muestran en la figura 7. Se trata de corrientes salientes cuyo valor máximo, obtenido a los +60 mV de potencial de membrana, oscila entre 400 y 500 pA, valores similares a los reportados por otros autores (Panyi et al, 1994, Verheugen y Vijverberg, 1995a) y cuya cinética gráfica fue caracterizada y adscrita a canales de potasio dependientes de voltaje por Cahalan y cols. en 1985. Estas corrientes se caracterizan por tener una activación rápida (τ de activación de 1.89 ± 0.07 , 2.43 ± 0.10 , 2.93 ± 0.09 mseg para linfocitos de ratas jóvenes, maduras y viejas respectivamente), una inactivación más lenta (τ de inactivación de 375.15 ± 18.3 , 394.43 ± 23.6 , 421.29 ± 34.8 mseg para linfocitos de ratas jóvenes, maduras y viejas respectivamente) y una deactivación intermedia (τ de deactivación de 52.24 ± 5.63 , 74.85 ± 8.23 , 82.16 ± 9.78 mseg para linfocitos de ratas jóvenes, maduras y viejas respectivamente a -60 mV), valores también muy cercanos a los descritos por Cahalan y cols. en 1985. El análisis comparativo de estas corrientes en linfocitos provenientes de ratas con tres diferentes edades, mostró

que existen cambios significativos en las constantes cinéticas de estos canales de potasio. Aunque las diferencias estadísticas encontradas sólo existieron en las comparaciones de los sujetos jóvenes con los viejos, cualitativamente sí se mostraron cambios entre los sujetos jóvenes y maduros.

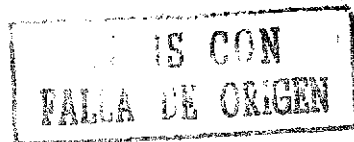
En lo que respecta al tamaño de las corrientes, las figuras 9 y 12 muestran que tanto la corriente instantánea como la corriente estacionaria fueron diferentes. Las corrientes instantáneas fueron menores conforme avanza la edad de los individuos de tal manera que los sujetos viejos mostraron aproximadamente el 80% de la corriente máxima mostrada por los jóvenes, mientras que los maduros alcanzaron el 89% de esta misma corriente. En este sentido la τ de inactivación también mostró cambios significativos: ésta se incrementó en los sujetos viejos con respecto a los jóvenes (pasó de 375.15 ± 18.3 a 421.29 ± 34.8 mseg) lo cual significa que la inactivación de la corriente en los linfocitos de sujetos viejos es más lenta, lo que podría explicar la menor corriente registrada, ya que la presencia de la inactivación del canal impediría un mayor incremento de esta corriente (Hille, 1992). Las curvas I-V de la corriente instantánea mostradas en la figura 10 ponen de manifiesto las diferencias en las corrientes máximas registradas en estos grupos de linfocitos.

Sin embargo, las corrientes estacionarias mostraron el fenómeno inverso, es decir éstas fueron mayores en sujetos viejos con respecto a los jóvenes. Entonces la corriente registrada en los sujetos viejos es 24% mayor a la registrada en los jóvenes, mientras que las maduras mostraron un 9% más de la misma corriente. El incremento en la corriente estacionaria refleja una disminución en la corriente de inactivación, ya sea en su intensidad o en su velocidad. De hecho, las mediciones con las que se realizaron las figuras 11 (curva I-V estacionaria) y la figura 17 (curvas de inactivación) muestran que tanto

la tasa como la amplitud de la inactivación son menores conforme se incrementa la edad de los individuos. Por esta razón, las τ s de inactivación fueron diferentes entre los respectivos grupos.

Otro de los parámetros cinéticos estudiados fue la deactivación. Para registrarla procedimos a realizar un estudio típico de corrientes de cola (Gáspar et al. 1998) como las que se muestran en la figura 19. Con estas corrientes se elaboró la curva I-V de la figura 20. Aunque se observaron variaciones en los valores de estas corrientes, el análisis estadístico empleado en este estudio no arrojó diferencia significativa alguna. Sin embargo, hay un incremento importante en la pendiente de las gráficas tanto en linfocitos de ratas maduras como de viejas con respecto a las jóvenes. Este incremento en la amplitud de las corrientes, significa que también hay una reducción en la tasa de deactivación.

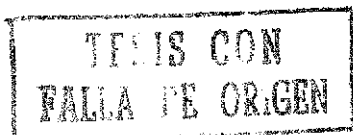
Estos cambios traen como consecuencia que las constantes de tiempo de estas tres variables cinéticas se modifiquen tal como se mostró en las figuras 15, 18 y 21. El cambio más significativo fue en su dependencia de voltaje, esto es, los cambios fueron más importantes a determinados voltajes. En el caso de la activación el mayor cambio se mostró en el rango de -10 a $+40$ mV, intervalo que es muy importante para activar por ejemplo a los canales de calcio dependientes de voltaje (Hille, 1992). Por lo que en los linfocitos viejos en consecuencia a esto, se activarían menos los canales con todas las repercusiones funcionales que esto traería ya que el flujo transmembranal de calcio es fundamental para inducir la activación linfocitaria (Lewis y Cahalan, 1990). En el caso de la τ de inactivación las principales diferencias residieron en el rango de voltaje de -20 a $+20$ mV, mientras que las diferencias en la deactivación se mostraron fundamentalmente en voltajes de -65 a -30 mV, voltajes en los que se activan o inactivan otros tipos de canales. En otras palabras, la función de proporcionar un ambiente eléctrico para una inducción de flujos iónicos adecuados para



la activación (Grinstein y Dixon 1989) se deteriora en los individuos conforme avanza la edad

La alteración de la cinética de estos canales con la edad también se manifiesta en las curvas que analizan la dependencia del voltaje de la activación y la inactivación (figuras 13 14 15 16 17 y 18). En ambos casos los cambios se manifiestan en los puntos donde la tasa de cambio tanto de la activación como de la inactivación es mayor. Estos cambios provocan que los voltajes medios de activación e inactivación se modifiquen en los linfocitos provenientes de los 3 grupos de ratas. Estas curvas se corrieron hacia voltajes menos negativos de tal manera que los linfocitos de sujetos viejos mostraron un valor de -30.62 mV, lo cual comparado con los -38.55 mV que se encontraron en los sujetos jóvenes, muestra una importante diferencia en este parámetro. El hecho de mostrar un valor menos negativo de voltaje medio de activación indica una menor sensibilidad de estos canales lo que significa que requieren de un mayor estímulo para activar a estos canales dependientes de voltaje (Hille 1992)

En el caso de la inactivación se observó que las curvas se desplazaron hacia valores menos negativos de un valor de -58.23 mV encontrados en linfocitos provenientes de sujetos jóvenes, se pasó a un valor de -47.50 mV en los linfocitos de sujetos viejos, el significado de este cambio se puede entender en función de una despolarización, la cual al regresar al voltaje de reposo inactivará primero los canales de potasio de linfocitos de animales viejos con respecto a los de los sujetos jóvenes. Por lo tanto si los canales de linfocitos provenientes de sujetos viejos se activan más tardíamente y se inactivan antes que los de ratas jóvenes, entonces los canales de potasio dependientes de voltaje de ratas viejas permanecerán conduciendo menos tiempo que los de animales jóvenes. Tal resultado explica el menor tamaño de las corrientes observado en los registros y los cambios en el potencial de membrana y



su activación descritos en éste y otros estudios electrofisiológicos (Panyi et al, 1994) De igual manera explican porqué los linfocitos provenientes de sujetos viejos, muestran una menor respuesta al efecto depolarizante de incrementar la concentración extracelular de potasio (Varga y cols, 1990)

Estos hallazgos, se complementan además con los cambios observados en las constantes de tiempo (τ) tanto de la activación como de la inactivación, las cuales se incrementaron de una forma proporcional con la edad. Aunque cualitativamente la constante de tiempo de la deactivación mostró modificaciones, éstas no fueron estadísticamente significativas, sin embargo, la dirección del cambio fue similar a la de las otras constantes

Los resultados similares, en relación a los cambios en el potencial de membrana y actividad general de los canales de potasio, han sido reportados en linfocitos provenientes de humanos (Panyi et al., 1994, 1996) y de ratón (Wilson et al., 1994, Webb et al 1995) Tal alteración en los canales de potasio induce cambios significativos en varios parámetros electrofisiológicos detectados por varios autores. Así, Wilson et al., 1984, mostraron que además de un potencial de membrana menor, los linfocitos de sujetos viejos presentan una menor concentración intracelular de calcio, tanto en estado de reposo, como en situaciones que provocan la activación linfocitaria. Tal reducción en la concentración intracelular de calcio trae como consecuencia una reducción en la activación y translocación de la proteína cinasa C. De igual manera la actividad de la enzima ATPasa Na^+/K^+ se encuentra reducida en linfocitos de sujetos viejos y los niveles de fosfatidil inositol son significativamente menores en las mismas células obtenidas de humanos de más de 90 años de edad (Varga y cols, 1990)

En un estudio realizado con el registro de canales unitarios en

linfocitos de humanos jóvenes y viejos, se mostró también que la probabilidad de apertura de canal está reducida significativamente conforme la edad del individuo se incrementa, por lo que la participación en el mantenimiento del potencial de membrana de estos canales se reduce considerablemente, lo que traería como consecuencia que el potencial de membrana en reposo de estas células fuese menor y que su respuesta a los estímulos activadores, estuviese muy reducida (Panyi y cols, 1994). Estos mismos autores mostraron resultados similares en lo que respecta a la activación de las corrientes; sin embargo, las diferencias que ellos encontraron en linfocitos de humanos fueron menores que las descritas en el presente trabajo. Tales diferencias pueden ser consecuencia de la especie analizada.

Los resultados encontrados en el presente estudio ponen en relieve la importancia de los canales iónicos en la función inmunológica, aunque los linfocitos son células no excitables, el potencial de membrana que presentan y su regulación son muy similares a los observados en estructuras excitables, tales como las células nerviosas (Lewis y Cahalan, 1988). Esta similitud implica la posibilidad de estudiar tales mecanismos con las mismas herramientas y procedimientos que las células nerviosas y extrapolar algunos de los resultados encontrados. A pesar de ello, los cambios electrofisiológicos reportados que ocurren con la activación linfocitaria, son aún controversiales, lo que ha sugerido la existencia de varios estados previos a la activación inmunológica (Grinstein y Dixon, 1989).

Los resultados encontrados muestran que los canales de potasio dependientes de voltaje juegan un papel imprescindible dentro de la mayor parte de estos procesos, es decir, desde la respuesta a la unión del ligando, la activación de canales de calcio dependientes de voltaje, hasta la puesta en marcha de procesos intracelulares que finalizarán con la mitogénesis y diferenciación linfocitaria (DeCoursey y cols 1984). Por

esta razón resulta muy importante determinar los cambios que ocurren como consecuencia del paso del tiempo, con la finalidad de describir los procesos subyacentes a la inmunosenectud.

Los procesos etiológicos inductores de las alteraciones cinéticas en los canales de potasio descritas en el presente trabajo, son desconocidos, sin embargo, al igual que el mismo proceso del envejecimiento, éstos deben ser multifactoriales. Posiblemente la mayor parte de las teorías existentes hoy en día que pretenden explicar el envejecimiento, involucre un alto porcentaje de factores físicoquímicos capaces de modificar tanto la estructura como las propiedades características de la membrana celular. Entre éstas se encuentra la viscosidad y la fluidez, así como su composición bioquímica, factores moleculares que son fundamentales en la organización funcional de todos los canales iónicos. Otros factores desencadenantes podrían también inducir cambios metabólicos en la síntesis, recambio y degradación de los canales, lo cual podría además explicar estas modificaciones.

Los resultados del presente estudio sugieren que los procesos encaminados a aliviar parte de las alteraciones mostradas por estos canales, tendrían una acción benéfica sobre la respuesta inmunológica en sujetos de edad avanzada y sugieren, además, la necesidad de emplear herramientas moleculares para determinar los cambios estructurales que dan origen a las alteraciones en la cinética de los mismos.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que sí existen diferencias electrofisiológicas significativas en la membrana de los linfocitos como consecuencia de la edad. Esta afirmación se sustenta en los hechos siguientes: la capacitancia de la membrana plasmática aumenta en relación directa a la edad, reflejando un incremento en el tamaño de la superficie celular; el potencial de membrana disminuye conforme aumenta la edad; las corrientes en los canales rectificadores salientes de potasio dependientes de voltaje ó $K^+(V)$ disminuyen al aumentar la edad de las ratas, lo cual es consecuencia de que se modifica de forma importante su cinética.

Los cambios electrofisiológicos observados en la membrana de los linfocitos se van dando de manera progresiva, representan estados adaptativos a las condiciones por las que cursa el sujeto como parte de su ciclo vital y desde luego, justifican la disminución en la respuesta inmunológica que se observa en los individuos de edad avanzada.



BIBLIOGRAFIA

- ABBAS K.A., A.H. LICHTMAN, J. S. POBER. Cellular and molecular immunology. W S Saunders Co. Ed. Philadelphia, USA. 457 pp, 1994
- ALLEN P.M. Antigen processing at the molecular level. Immunol Today 8: 270- 273, 1987
- BANERJEE M. Immunohistochemical analysis of ageing human B and T cellpopulations reveals an age-related decline of CD8 T cells in spleen but not gut-associated lymphoid tissue (GALT) Mech Ageing Dev 115 85 – 89, 2000
- BASON M. A., R. ZAMOYSKA. The CD4/CD8 lineage decision: integration of signalling pathways. Immunol Today 21, 10 509 – 514, 2000
- BINAH O., C. C. LIU, J. D. YOUNG, G. BERKE. Channel formation and (Ca⁺⁺) accumulation induced by perforin N-terminus peptides: comparison with purified perforin and whole lytic granules. Biochem Biophys Res Commun 240,3: 647 – 650, 1997.
- BOYUM A. Isolation of mononuclear cells. Methods Enzymol 108: 88 – 102, 1968
- BORST J., A. COPE. Turning the immune system on. Immunol Today 20, 4: 156 – 160, 1999
- BRENT L., J. BUBIEN, W.T. WOODS, J.L. BUTLER. The role of ion channels in human B cell activation. J Cell Biol 103 221, 1986.
- BRETSCHNEIDER F., M. KLAPPERSTUCK, M. LOHN, F. MARKWARDT. Nonselective cationic currents elicited by extracellular ATP in human B-lymphocytes. Pflugers Arch 429 (5): 691 – 8, 1995
- BUI A.H., J.S. WILEY. Cation fluxes and volume regulation by human lymphocytes. J Cell Physiol 108: 47 – 54, 1981.
- BURTON D. R., J.M. WOOLF. Human antibody effector function. Adv Immunol 51 1-84, 1992.
- BUSS T.J., R. LI, S.C. PEIPER, R.S. EL-MALLAKH. Lymphoblastoid transmembrane potential in bipolar patients, their siblings, and unrelated healthy comparison subjects. Psychiatry Res 59 (3): 197 – 201, 1996.
- CAHALAN M.D., CHANDY G.K., DECOURSEY T.E., GUPTA S. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. J Physiol

- Lond 358: 197 – 237, 1985
- CAHALAN M.D., R S LEWIS. Ion channels in T Lymphocytes. role in volume regulation. J Gen Physiol 90: 7, 1987.
- CAPLAN S., S ZELIGER, L WANG, M. BANİYASH. Cell surface expressed T cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4768 – 4772, 1995
- CHA A., G. ZINDER, P R SELVIN, F BEZANILLA Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. Nature 402: 809 – 813, 1999.
- CHANDY K.G., T E DECOURSEY, M.D CAHALAN, C. MCLAUGHLIN, S. GUPTA Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. J Exp Med 160: 369 – 385, 1984
- CHANDY K.G., T E DECOURSEY, M.D. CAHALAN, S. GUPTA Electroimmunology: the physiologic role of ion channels in the immune system. J Immunol 135 Suppl 787s – 791s, 1985a.
- CHANDY K.G., T.E. DECOURSEY, M.D. CAHALAN, S GUPTA Ion channels in lymphocytes J Clin Immunol 5: 1 – 6, 1985b.
- CHANDY K.G., T E DECOURSEY, M FISCHEBACH, N. TALAL, M.D. CAHALAN, S. GUPTA. Altered K⁺ channel expression in abnormal T lymphocytes from mice with the *lpr* gene mutation. Science Wash DC 233: 1197 – 1200, 1986
- CHENG J.T., T. KAHN, D. M. RAJI Mechanism of alteration of sodium potassium pump of erythrocytes from patients with chronic renal failure J Clin Invest 74 (5): 1811 – 20, 1984.
- CHEUNG R.K., S. GRINSTEIN, H M DOSCH, E W GELFAND Volume regulation by human lymphocytes. Identification of differences between the two major lymphocytes subpopulations. J Clin Invest 70: 632 – 638, 1982.
- DECOURSEY T.E., K.G. CHANDY, S. GUPTA M.D. CAHALAN Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? Nature Lond 307 465 – 471, 1984
- DECOURSEY T.E., K.G. CHANDY, S GUPTA, M.D. CAHALAN Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes J Neuroimmunol 10: 71 – 95, 1985.
- DECOURSEY T.E., K.G. CHANDY, S. GUPTA, M.D. CAHALAN Two types of potassium channels in murine T lymphocytes. J Gen Physiol 89: 379 – 404, 1987a

DECOURSEY T E , K.G CHANDY, S. GUPTA, M.D. CAHALAN. Mitogen induction of ion channels in murine T lymphocytes. J Gen Physiol 89: 405 – 420, 1987b

DEUTSCH C., M PRICE. Role of extracellular Na⁺ and K⁺ in lymphocyte activation. J Cell Physiol 113 (1): 73 – 9, 1982

DEUTSCH C , KRAUSE D , LEE S C. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. J Physiol 327 405 – 423, 1989.

DEUTSCH C , L Q. CHEN. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation Proc Natl Acad Sci USA 90 10036 – 10040, 1993.

DORIA G , D FRASCA. Genes, immunity and senescence: looking for a link. Immunol Rev 160: 159- 170, 1997.

DOYLE D A , J.M CABRAL, R.A. PFUETZNER, A KUO, J.M GULBIS, S L COHEN, B T CHAIT, R. MACKINON. The structure of the K⁺ channel. molecular basis of K⁺ conduction and selectivity Science 280: 69 – 77, 1998.

DRAKOPOULOU E., COTTON J., VIRELIZIER H , BERNARDI E , SCHOOF S A R., PARTISETI M , CHOQUET D , GURROLA G , POSSANI L.D , VITA C. Chemical synthesis, structural and functional characterization of noxioustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage dependent K⁺ channels Biochem Biophys Res Commun 213 901 – 907, 1995.

EFFROS B. R , G PAWELEC. Replicative senescence of T cells: does the Hayflick limit lead to immune exhaustion? Immunol Today 18: 450 – 454, 1997

EFFROS B R. Costimulatory mechanisms in the elderly. Vaccine 18: 1661 – 1665, 2000

EL-MALLAKH R S , R. LI. Is the Na⁺/K⁺ATPase the link between phosphoinositide metabolism and bipolar disorder? J Neuropsychiatry Clin Neurosci 5 (4) 361 – 8 1993

FUKUSHIMA Y , S HAGIWARA, M. HENKART. Potassium current in clonal cytotoxic T lymphocytes from the mouse J Physiol Lond 351: 645 – 656, 1984.

FRANCESCHI C. The immunology of exceptional individuals. the lessons of centenarians Immunol Today 16 12 – 16, 1995.

GALLIN E.K. Ion channels in leukocytes. Physiol Rev 71: 775 – 811, 1991

- GAMBLE D. A., R. SCHWAB, M. E. WEKSLER, P. SZABO. Decreased steady-state c-myc mRNA in activated T cell cultures from old human is caused by a smaller proportion of T cells that transcribe the c-myc gene J Immunol 144: 3569- 3573, 1990.
- GASPAR R., Z. VARGA, G. PANYI, Z. KRASNAI, C. PIER. Measurements and analysis of different aspects of potassium currents in human lymphocytes. En: Signal Transduction-single cell techniques. Van Duijin B., A. Wiltnik Eds. Phil USA 214 - 235, 1998.
- GELFAND E.W., R.K. CHEUNG, K. HA., S. GRINSTEIN. Volume regulation in lymphoid leukemia cells and assignment of cell lineage Engl N J Med 311. 939 - 945, 1984.
- GELFAND E.W., R.K. CHEUNG, G.B. MILLS. Role of membrane potential in the response of human T lymphocytes to phytohemagglutinin. J Immunol 138. 1115 - 1120, 1987a.
- GELFAND E.W., G.B. MILLS, R.K. CHEUNG, J.W.W. LEE, S. GRINSTEIN. Transmembrane ion fluxes during activation of human T lymphocytes: role of Ca^{++} , Na^{+}/H^{+} exchange and phospholipid turnover. Immunol Rev 95 59 - 87, 1987b.
- GINALDI L. The immune system in the elderly. III. Innate immunity. Immunol Res 20. 117 - 126, 1999.
- GLOBERSON A. The lymphocytes and aging. Int Arch Allergy Immunol 107. 491 - 497, 1995.
- GLOBERSON A. Thymocytopoiesis in ageing: the bone marrow-thymus axis Arch Gerontol Geriat 24 141 - 155, 1997.
- GLOBERSON A., R. B. EFFROS. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged Immunol Today 21, 10. 515 - 521, 2000.
- GRINSTEIN S., A. ROTHSTEIN, S. COHEN. Mechanisms of osmotic activation of Na^{+}/H^{+} exchange in rat thymic lymphocytes. J Gen Physiol 85 765 - 787, 1985.
- GRINSTEIN S., A. ROTHSTEIN. Mechanisms of regulation of the Na^{+}/H^{+} exchanger. J Membr Biol 90: 1 - 12, 1986.
- GRINSTEIN S., J.S. DIXON. Ion transport, membrane potential and cytoplasmic pH in lymphocytes changes during activation Physiol Rev 69. 417 - 481, 1989.
- HAMILTON L.J., J.G. KAPLAN. Flux of ^{86}Rb in activated human lymphocytes Can J Biochem 55 774 - 778, 1977.
- HILLE B. Ionic channels of excitable membranes. 2nd Ed. Sinauer,

Sunderland 1992

HIRSCH H E , M E. PARKS Na⁺-K⁺ dependent adenosine triphosphatase changes in multiple sclerosis plaques Ann Neurol 13 (6) 658 – 63, 1983

HOLIAN A , C. J., DEUTSCH, S.K. HOLIAN, R.P. DANIELE, D.F. WILSON Lymphocyte response to phytohemagglutinin: intracellular volumen and intracelular [K⁺]. J Cell Physiol 98. 137 – 144, 1979.

HOLMES T C., D.A. FADOOL, I.B. LEVITAN Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel J Neurosci 16 (5) 1581 – 90, 1996.

IBARRETA D., R. PARRILLA, M.S. AYUSO. Altered Ca²⁺ homeostasis in lymphoblasts from patients with late-onset Alzheimer disease Alzheimer Dis Assoc Disord 11 (4) 220 – 7, 1997

IKUTA K., N. UCHIDA, J. FRIEDMAN, I. L. WEISSMAN. Lymphocyte development from stem cells Annu Rev Immunol 10. 759 – 783, 1992

INVERSEN J G Unidirectional K⁺ fluxes in rat thymocytes stimulated by concanavalin A. J Cell Physiol 89. 267 – 276, 1976.

JAN L Y , Y. N. JAN. Cloned potassium channel from Eukariotes and Prokariotes. Annu Rev Neurosci 20. 91 – 123, 1997.

JOHNSON F B . D A SINCLAIR, L. GUARENTE Molecular biology of aging Cell 96: 291 – 302, 1999.

KABAKOV A. The resting potential equations incorporating ionic pumps and osmotic concentration J Theor Biol 169 (1): 51 – 64, 1994

KAPLAN J.G. Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. Annu Rev Physiol 40. 19 – 41, 1978

KAVANAUGH M.P., M.D. VARNUM, P.B. OSBORNE, M.J. CHRISTIE, A.E. BUSCH, J.P. ADELMAN, R.A. NORTH Interaction between Tetraethylammonium and aminoacid residues in the pore of cloned voltage-dependent potassium channels J Biol Chem 266 7583 – 7587, 1991.

KENNEDY R H , T. AKERA, Y. KATANO Aging: effects on sodium and potassium activated adenosine triphosphatase activity and ouabain binding sites in rat brain. J Gerontol 40 (4). 401 – 8, 1985

KUBO Y., T.J. BALDWIN, Y.N. JAN, L.Y. JAN. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. Nature 362: 127 – 132, 1993

- LEE S.C., D.E. SABATH, C. DEUTSCH, M.B. PRYSTOWSKY. Increased voltage-gated potassium conductance during interleukin 2-stimulated proliferation of a mouse helper T lymphocyte clone J Cell Biol 102: 1200 - 1208, 1986.
- LEE S.C., LEVY D.I., DEUTSCH C.J. Diverse K⁺ channels in primary human T lymphocytes J Gen Physiol 99: 771 - 793, 1992
- LEONARD R., GARCIA M.L., SLAUGHTER R.S., REUBEN J.P. Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin Proc Natl Acad Sci USA 89: 10094 --10098, 1992
- LEWIS R.S., M.D. CAHALAN. Diversity of K channel expression in developing T lymphocytes (Abstract) J Gen Physiol 90 27, 1987.
- LEWIS R.S., M.D. CAHALAN. Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes. Science Wash D.C. 239: 771 - 775, 1988a
- LEWIS R.S., M.D. CAHALAN. The plasticity of ion channels: parallels between the nervous and immune systems Trends Neurosci 11,5:214 - 218, 1988b
- LEWIS R.S., M.D. CAHALAN. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. Cell Regul 1: 99 - 112, 1989
- LEWIS R.S., M.D. CAHALAN. Ion channels and signal transduction in lymphocytes Annu Rev Physiol 52: 415 - 430, 1990.
- LEWIS R.S., M.D. CAHALAN. Potassium and calcium channels in lymphocytes. Annu Rev Immunol 13 623 - 653, 1995
- LICHTSTEIN D. Na⁺-,K⁺ATPase and heart excitability Adv Exp Med Biol 382:23 - 30, 1995.
- LIEM K.L., J.M. SIMARD, Y. SONG, T. KIRTI. The patch clamp technique. Neurosurgery 2: 382 - 392, 1995
- LIN C.S., BOLTZ R.C., BLAKE J.T., NGUYEN M., TALENTO A., FISCHER P.A., SPEINGER M.S., SIGAL N.H., SLAUGHTER R.S., GARCIA M.L., KACZOROWSKI G.J., KOO G.C. Voltage gated potassium channels regulate calcium dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. J Exp Med 177 637 - 645, 1993
- LIO D., G. CANDORE, D. SIGNA, C. DANNA, G. DILORENZO, ET AL. In vitro T cell activation in elderly individuals. failure in CD69 and CD71 expression Mech Ageing Dev 89: 51 - 58, 1996.
- LIU Y.S., K.Z. GUYTON, M. GOROSPE, Q. B. XU, G.C.

KOKKONEN, ET AL. Age-related decline in mitogen-activated protein kinase activity in epidermal growth factor-stimulated rat hepatocytes. J Biol Chem 271: 3604 – 3607, 1996

LUPPA D, F. MULLER Effect of diabetes and adrenocortical state on intestinal transport capacity and Na⁺-K⁺-activated adenosine triphosphatase activity. Diab Metab 12 (4): 191 – 196, 1986.

MCDUGALL S.L, S GRINSTEIN, E.W GELFAND Activation of Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in human B lymphocytes by anti-immunoglobulin. J Clin Invest 81: 449 – 454, 1988

MCKINNON D, R CEREDIG. Changes in the expression of potassium channels during mouse T cell development. J Exp Med 164: 1846 – 1861, 1986

MARKWARDT F, M. LOHN, T BOHM, M. KLAPPERSTUCK Purinoceptor-operated cationic channels in human B-lymphocytes. J Physiol (Lond) 498 (Pt 1): 143 – 51, 1997

MATTESON D.R, DEUTSCH C. K⁺ channels in T lymphocytes a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. Nature 307: 468-471, 1984

MICELI M. C., J. R. PARNES The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Adv Immunol 53: 59 – 122, 1993.

MILLER R.A The aging immune system primer and prospectus. Science 273 (5271): 70 – 4, 1996

MILLER R. A, G. GARCÍA, C. J. KIRK, J.M WITKOWSKI Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. Immunol Rev 160: 79- 90, 1997

MORRISON S. J The ageing of hematopoietic stem cells. Nat Med 2: 1011 – 1016, 1996.

MURASKO D. M., P. WEINER, D. KAYE Association of lack of mitogen induced lymphocyte proliferation with increased mortality in the elderly. Aging, Immunol Infec Dis 1: 1 – 23, 1988

NAGY P, G PANYI, A GENEI, L BENE, R. GASPAR JR., J MATKO, S. DAMJANOVICH Ion-channel activities regulate transmembrane signaling in thymocyte apoptosis and T-cell activation. Immunol Lett 44 (2-3): 91 – 5, 1995.

OETTGEN H C, TERHORST C, CANTLEY L C, ROSOFF P M Stimulation of the T3-T receptor complex induces a membrane potential sensitive calcium influx. Cell 40: 583-590, 1985.

ORTEGA S P, R PARDAL, A CASTELLANO, J LÓPEZ. Collapse

- of conductance is prevented by a glutamate residue conserved in voltage dependent K⁺ channels J Gen Physiol 116: 181 – 190, 2000
- OWENS T., J G. KAPLAN T-dependent B-cell activation is signalled by an early increase in potassium influx. Immunobiology 162: 277 – 287, 1982
- PANYI G , G. BERECKI, R. GÁSPÁR, I. SERES, T. FÜLÖP, S. DAMJANOVICH. Peripheral blood lymphocytes display reduced K⁺ channel activity in aged humans Biochem Biophys Res Commun 199, 2: 519 – 524, 1994
- PANYI G , C. DEUTSCH Assembly and suppression of endogenous Kv1.3 channels in human T cells. J Gen Physiol 107 (3): 409 – 420, 1996.
- PARISETI M., KHORN H , CHOQUET D Pattern of potassium channel expression in proliferating B lymphocytes depends upon the mode of activation J Immunol 151: 2462 – 2470, 1993.
- PAWELEC G., M. ADIBZADEH, R. SOLANA, I. BECKMAN. The T cell in the ageing individual. Mech Ageing Dev 93 (1-3): 35 – 45, 1997.
- PERILLO N. L., F. NAEIM, R. L. WALFORD, R. B. EFFROS The in vitro senescence of human T lymphocytes. Failure to divide is not associated with a loss of cytolytic activity of memory T cell phenotype. Mech Ageing Dev 93, 1 – 3. 35 – 45, 1997
- PIERI C , R. RECCHINI, F. MORONI, L. BALKAY, L. TRON, S. DAMJANOVICH Ligand and voltage gated sodium channels may regulate electrogenic pump activity in human, mouse and rat lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun 160, 3. 999 – 1002, 1989
- PIERI C , R. RECCHIONI, F. MORONI, F. MARCHESELLI, S. DAMJANOVICH Phytohemagglutinin induced changes of membrane lipid packing, c-myc and c-myb encoded protein expression in human lymphocytes during aging Ann NY Acad Sci 673: 110 – 119, 1992
- REDMANN K., S. WALLISER Different changes in transmembrane potential of cultured cells after ouabain-inhibited active Na⁺/K⁺-transport Arch Geschwulstforsch. 51(1): 96 – 102, 1981.
- RICCI R., M. BUFFELLI, A.P. RIVIERA, A. CANGIANO. An electrophysiological study of calcium entry during normal human T-lymphocyte activation FEBS Lett 390 (1): 778 – 80, 1996.

RINK L, M. SEYFARTH. Characteristics of immunologic test values in the elderly. Z Gerontol Geriater 30 (3): 220 – 5, 1997

RINK L, I. CAKMAN, H. KIRCHNER. Altered cytokine production in the elderly. Mech Ageing Dev 102 (2-3) 199 – 209, 1998.

ROBERTS-THOMSON I. C., S. WITTINGHAM, U. YOUNG-CHAIYUD, I. R. MACKAY. Ageing, immune response and mortality. Lancet 2: 368 – 370, 1974

RUSSELL J H., C B. DOBOS. Accelerated $^{86}\text{Rb}^+(\text{K}^+)$ release from the cytotoxic T lymphocyte is a physiologic event associated with delivery of the lethal hit. J Immunol 131: 1138 – 1141, 1983

SADEHI H. M. Phenotype functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. Exp Gerontol 34: 959 – 970, 1999.

SCHLICHTER L, N. SIDELL, S. HAGIWARA. Potassium channels mediate killing by human natural killer cells. Proc Natl Acad Sci USA 83: 451 – 455, 1986

SEGEL G B. Membrane alterations in lymphocyte proliferation. Am J Pediatr Hematol Oncol 3: 433 – 438, 1981

SHARP A. The bone marrow as an effector T cell organ in aging. Mech Ageing Dev 52: 219 – 233, 1990.

SHRIVASTAVA I. H., M. S. P. SANSOM. Simulation of ion permeation through a potassium channel: molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer. Biophys J 78: 557 – 570, 2000

SIDELL N., L. C. SCHLICHTER, S. C. WRIGHT, S. HAGIWARA, S. H. GOLUB. Potassium channels in human NK cells are involved in discrete stages of the killing process. J Immunol 137: 1650 – 1658, 1986

SJODIN R A. Contribution of electrogenic pumps to resting membrane potentials: the theory of electrogenic potentials. Soc Gen Physiol Ser 38: 105 – 27, 1984.

SOLANA R, E. MARIANI. NK and NK/T cells in human senescence. Vaccine 18: 1613 – 1620, 2000

SONG L. J., J. M. STEPHENS, S. KITTUR, G. D. COLLINS, J. E. NAGEL, ET AL. Expression of c-fos, c-jun and jun-b in peripheral blood lymphocytes from young and elderly adults. Mech Ageing Dev 65: 149 – 156, 1992.

STEINERT M., S. GRISSMER. Novel activation stimulus of chloride channels by potassium in human osteoblasts and human leukaemic T lymphocytes. J Physiol (Lond) 500 (Pt 3): 653 – 60, 1997

STRAUSS U., R. SCHUBERT, S. JUNG, E. MIX K^+ currents of encephalitogenic memory T cells decrease with encephalitogenicity while interleukin-2 (IL-2) receptor expression remains stable during IL-2 dependent cell expansion Receptor Channels 6(1): 73 – 87, 1998

SZABO I., B. NILIUS, X. ZHANG, A. E. BUSCH, E. GULBINS, H. SUESSBRICH, F. LANG Inhibitory effects of oxidants on n-type K^+ channels in T lymphocytes and *Xenopus* oocytes. Pflugers Arch 433 (5): 626 – 32, 1997.

TANNER M.K., S.R. WELLHAUSEN, J.B. KLEIN Flow cytometric analysis of altered mononuclear cell transmembrane potential induced by cyclosporin Cytometry 14 (1): 59 – 69, 1993.

TATHAM P.E., K. O'FLYNN, D.C. LINCH The relationship between mitogen-induced membrane potential changes and intracellular free calcium in human T-lymphocytes. Biochim Biophys Acta 856: 202 – 211, 1986

THOMAN L.M., W.O. WEIGLE. The cellular and subcellular bases of senescence. Adv Immunol 46: 21 – 26, 1989

TIELEN F.J., A.C.M. VAN VLIET, B. DEGEUS, L. NAGELKERKEN, J. ROZING. Age-related changes in $CD4^+$ Tcell subsets associated with prolonged skin graft survival in aging rats. Transplant Proc 25: 2872 – 2874, 1993.

UTSUYAMA M., Z. VARGA, K. FUKAMI, Y. HOMMA, T. TAKENAWA, K. IROKAWA Influence of age on the signal transduction of T cells in mice Int Immunol 5: 1177 – 1182, 1993.

VARGA Z., N. BRESSANI, A.M. ZAIA, L. BENE, T. FÜLÖP, A. LEÖVEY, N. FABRIS, S. DAMJANOVICH. Lymphocytes Immunol Lett 23: 275 – 280, 1990.

VERHEUGEN J.A., H.P. VIJVERBERG Intracellular Ca^{++} oscillations and membrane potential fluctuations in intact human T lymphocytes: role of K^+ channels in Ca^{2+} signaling Cell Calcium 17 (4): 287 – 300, 1995a.

VERHEUGEN J.A., H.P. VIJVERBERG, M. OORTGIESEN, D.M. CAHALAN Voltage-gated and Ca^{2+} -activated K^+ channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential and intracellular calcium J Gen Physiol 105 (6): 765 – 94, 1995a.

VERHEUGEN J.A., H.P. VIJVERBERG. Intracellular Ca^{++}

oscillations and membrane potential fluctuations in intact human T lymphocytes: role of K⁺ channels in Ca²⁺ signaling. Cell Calcium 17 (4): 287 – 300, 1995b

VERHEUGEN J.A., H.P. VIJVERBERG, M. OORTGIESEN, D.M. CAHALAN. Voltage-gated and Ca²⁺-activated K⁺ channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential and intracellular calcium. J Gen Physiol 105 (6): 765 – 94, 1995b.

VERHEUGEN J.A. Elevation of intracellular Ca²⁺ in the physiologically relevant range does not inhibit voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes. J Physiol (Lond) 508 (pt1): 167 – 77, 1998

VINZENCI F.F., C.D. MORRIS, L.B. KINSEL, M. KENNY. Decreased calcium pump adenosine triphosphatase in red blood cells of hypertensive subjects. Hypertension 8(11): 1058 – 66, 1986.

WANG L., P. ZHOU, R.W. CRAIG, L. LU. Protection from cell death by *mcl-1* is mediated by membrane hyperpolarization induced by K⁺ channel activation. J Membr Biol 172: 113 – 120, 1999

WANG M.H., U. OH, H.I. RHEE. Amino acid substitution within the S2 and S4 transmembrane segments in shaker potassium channel modulates channel gating. Biochem Biophys Res Commun 275: 720 – 724, 2000.

WAYNE S. J., R. L. RHYNE, P. J. GARRY, J. S. GOORDWIN. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. J Gerontol 45: 45 – 48, 1990

WEBB G.D., E.A. TAYLOR, V.M. OH, S.B. YEO, L.L. NGY. Effect of extracellular potassium concentration on the sodium-potassium pump rate in human lymphocytes. Clin Sci 88 (6): 695 – 700, 1995

WEKSLER M. E. Changes in the B cell repertoire with age. Vaccine 18: 1624 – 1628, 2000.

WHISLER R.L., Y. G. NEWHOUSE, S. E. BAGENSTOSE. Age-related reductions in the activation of mitogen-activated protein kinases p44 (MAPK)/ERK1 and p42 (MAPK)/ERK2 in human T cells stimulated via ligation of the T cell receptor complex. Cell Immunol 168: 201 – 210, 1996.

WICK G, B. GRUBECK-LOEBENSTEIN. Primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly: impact of dietary factors and disease. Immunol Rev 160: 171-84, 1997

WILSON O.I., I MARRIOTT, M.P. MAHAUT-SMITH, L.J. HYMEL, M.J. MASON. Isolation and characterization of membrane potential changes associated with release of calcium from intracellular stores in rat thymic lymphocytes J Membr Biol 137: 159 – 169, 1994

YELLEN G., D. SODICKSON, T.Y. CHEN, M.E. JURMAN. An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. Biophys J 66: 1068 – 1075, 1994

YU S. Thymocyte progenitors and T cell development in ageing Mech Ageing Dev 94: 103 – 111, 1997

ZENG Y.X., J. WU, S.T. YEE, H. NARIUCHI, K. HIROKAWA. Abnormality in the early signal transduction pathway is responsible for the impaired proliferative response and low K⁺ current in a T cell clone by stimulation with anti-CD3 antibody Cell Signal 8 (4): 263 – 7, 1996