

R.25041

1153205

S TD A/1114

ELECTROFISIOLOGIA DEL ADIPOCITO BLANCO
EFECTOS DE NORADRENALINA E INSULINA



Jorge Acosta López

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jorge Acosta López". The signature is stylized and written in a cursive script.

Tesis presentada para optar al grado de

Doctor en Medicina y Cirugía

por la

Universidad de Sevilla

Sevilla, 1996



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPTO. FISIOLÓGIA: FISIOLÓGIA MÉDICA Y BIOFÍSICA

Avda. Sánchez Pizjuán, 4 E-41009 SEVILLA ESPAÑA

Telf. (95) 4551768 / 4900066 / 4551770

Int. phone.: (34 - 5) 4551768 / 4900066 / 4551770

Fax: (95) 4551769 Int. fax: (34 - 5) 4551769

E-mail: FISMED@CICA.ES

D. Juan A. Bellido Gámez, Catedrático, y Dña. M. Pilar Ramírez-Ponce, Profesora Titular, del Dpto. de Fisiología: Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN:

Que D. Jorge Acosta López ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Electrofisiología del Adipocito Blanco: Efectos de Noradrenalina e Insulina", que presenta para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 22 de octubre de 1996



DPTO. DE FIOLOGIA MEDICA
Y BIOFISICA
FACULTAD DE MEDICINA

Fdo.: Juan A. Bellido Gámez

Fdo.: M. Pilar Ramírez-Ponce

Agradecimientos:

A Juan Bellido y Pilar Ramírez, por la oportunidad que me quisieron brindar para iniciarme en investigación colaborando en su equipo, y por el estímulo y ayuda que de ellos recibí, sin los cuales este trabajo no vería la luz.

A todos los miembros del Dpto. de Fisiología, por el afecto que siempre me demostraron

A Castillo, por tanto como le debo.

A mis hijas, por la dedicación que les robé.

*A mi padre, in memoriam, por la ilusión que
constantemente me transmitía para
que me formara en Ciencia*

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. Características morfológicas	1
1. 1. Tejido adiposo marrón	1
1. 2. Tejido adiposo blanco	2
2. Características funcionales	3
2. 1. Aspectos comunes	3
2. 1. 1. Receptores en el tejido adiposo	5
2. 2. Aspectos específicos	8
3. Tejido adiposo marrón: metabolismo y actividad eléctrica	8
4. Tejido adiposo blanco: metabolismo y actividad eléctrica	11
4. 1. Interacción de iones, actividad metabólica y regulación hormonal	12
4. 1. 1. Calcio	13
4. 1. 2. Potasio	14
4. 1. 3. Otros iones	16
4. 2. Soporte molecular del movimiento iónico transmembrana	17
4. 3. Características eléctricas del adipocito blanco	19
5. Planteamiento del problema y objetivos	20

MATERIAL Y METODO	21
1. Animal de experimentación, preparación de la muestra y técnica empleada	21
2. Soluciones y sustancias empleadas	22
3. Sistema de registro intracelular	23
3. 1. Equipo óptico-mecánico	24
3. 2. Equipamiento electrónico	27
3. 3. Equipo complementario para el análisis y reproducción de registros	30
4. Análisis estadístico de los datos	31
5. Método experimental	32
RESULTADOS	35
1. Características eléctricas del adipocito blanco	35
1. 1. Características eléctricas pasivas	35
2. Estudio de las respuestas de voltaje del adipocito a estímulos despolarizantes e hiperpolarizantes	37
2. 1. Características de las respuestas de voltaje	37
2. 2. El adipocito rectifica la respuesta de voltaje pasiva	41
2. 3. La rectificación de la respuesta de voltaje es dependiente de voltaje y de tiempo	43
2. 4. Durante la rectificación tras pulsos hiperpolarizantes se producen modificaciones de la resistencia de la membrana del adipocito	46
2. 5. Estudio de las respuestas eléctricas activas	48

3. Bases iónicas de los fenómenos eléctricos activos	53
3. 1. Estudio de la participación del potasio	53
3. 2. Estudio de la participación del calcio	62
4. Efecto de las hormonas, insulina, noradrenalina y péptido intestinal vasoactivo, sobre la actividad eléctrica del adipocito	67
4. 1. Insulina	67
4. 2. Noradrenalina	70
4. 3. Péptido intestinal vasoactivo	74
5. Efecto de las modificaciones de la concentración intracelular de AMPc sobre la actividad eléctrica del adipocito	76
5. 1. Forskolín	76
5. 2. Dibutiril-AMPc e isobutilmetil xantina	79
DISCUSION	84
1. Propiedades pasivas	84
2. Bases iónicas de los fenómenos eléctricos activos	86
2. 1. Participación del potasio	87
2. 2. Participación del calcio	89
3. ¿Son los mismos canales responsables de los cambios de conductancias provocados por la despolarización o la hiperpolarización del adipocito?	91
4. Efecto de la insulina, la noradrenalina y el péptido intestinal vasoactivo sobre la actividad eléctrica del tejido adiposo blanco	93
4. 1. Insulina	93

4. 2. Noradrenalina	95
4. 3. Péptido intestinal vasoactivo	95
5. Participación del AMPc en la actividad eléctrica del tejido adiposo blanco	96
6. Papel funcional de la actividad eléctrica en el adipocito blanco	97
CONCLUSIONES	99
REFERENCIAS	101

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo es el órgano de reserva energética más importante en los mamíferos y en la mayoría de las especies animales. Sus células pueden sintetizar y almacenar triglicéridos (TG), sustancia de alto valor calórico que ocupa poco volumen, hidrolizar estos TG y liberar ácidos grasos (AG). La velocidad con que ocurren ambos procesos en el adipocito depende de las disponibilidades de substratos metabólicos y de la regulación nerviosa y hormonal.

Por sus características morfológicas y funcionales se distinguen dos tipos de tejido adiposo: el blanco y el marrón.

1. Características morfológicas

1. 1. Tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón (TAM) se caracteriza porque sus células, más pequeñas que las del tejido adiposo blanco, poseen un gran número de mitocondrias en su citoplasma, con alto contenido en *citocromo c*, lo que les

confiere el característico color marrón (Joel, 1965). Los depósitos de TG están en forma de pequeñas vesículas que cubren todo el volumen citoplasmático y tienen un núcleo central y bien definido.

La cantidad de TAM que poseen los mamíferos varía en las diferentes especies y con la edad de los individuos. En los mamíferos hibernantes el TAM es muy abundante y se localiza en la región interescapular, zonas subaxilares y áreas extratorácicas paravertebrales (Joel, 1965). En los mamíferos no hibernantes el tejido adiposo marrón es cuantitativamente menos importante. El TAM disminuye a medida que el animal envejece. En el momento del nacimiento existe en la especie humana una formación de TAM en la zona interescapular que desaparece con el tiempo.

1. 2. Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (TAB) está formado por células de color blanco que pueden alcanzar un diámetro de hasta 120 μm (Koivisto y cols., 1993). Poseen pocas mitocondrias y su protoplasma se reduce a un pequeño anillo, en el que se sitúa el núcleo, que envuelve a una gran gota de grasa central (Williamson y Lacy, 1965). Esta ordenación estructural les confiere una característica forma de anillo.

El TAB en los mamíferos se encuentra fundamentalmente en la superficie corporal o zona subcutánea, en zonas profundas y en la médula ósea (Vague y Fenasse, 1965). El tejido adiposo subcutáneo ocupa el espacio entre la piel y la fascia muscular superficial. El de las zonas profundas se distribuye en las regiones profundas de las extremidades (perivascular e intermuscular), en la cavidad peritoneal y envolviendo a órganos internos como corazón, riñón, etc. El tejido adiposo de la médula ósea ocupa la zona no hematopoyética de la médula

de los huesos. La cantidad de TAB varía en las diferentes especies y aumenta a medida que el animal envejece.

El TAB que constituye el panículo del epidídimo en la rata es una formación celular bien diferenciada, envuelta por una fina capa de tejido conjuntivo, que permite visualizar los adipocitos subyacentes. Tiene forma de lengüeta. En la porción próxima al testículo su grosor es superior al que posee en la porción distal. En ésta, sólo dos o tres capas de células la integran. Por su localización, vascularización y fácil manejo, es una preparación frecuentemente utilizada para estudiar los aspectos funcionales del tejido adiposo, tanto "in vivo" como "in vitro".

2. Características funcionales

2. 1. Aspectos comunes

Las células adiposas, blancas y marrones, tienen capacidad para sintetizar y almacenar TG (lipogénesis) y glucógeno (glucogenogénesis) e hidrolizar TG (lipólisis) y glucógeno (glucogenólisis) (Fig. 1) (Joel, 1965; Martin y Vagelos, 1965; Shapiro, 1965; Bensadoun, 1991). Ambos tipos de células poseen la dotación enzimática necesaria para:

- a) Captar los AG de las lipoproteínas circulantes o sintetizarlos a partir de carbohidratos, aminoácidos lipogénicos y otros intermediarios metabólicos.
- b) Esterificar los AG con α -glicerofosfato (α -GP) para formar TG.

c) Almacenar los TG en vesículas, únicas o múltiples, y envolverlos con una proteína específica, la perilipina, que actualmente se considera que puede participar en la lipólisis al ser fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) (Greenberg y cols., 1993; Blanchette-Mackie y cols., 1995; Londos y cols., 1995; Servetnick y cols., 1995).

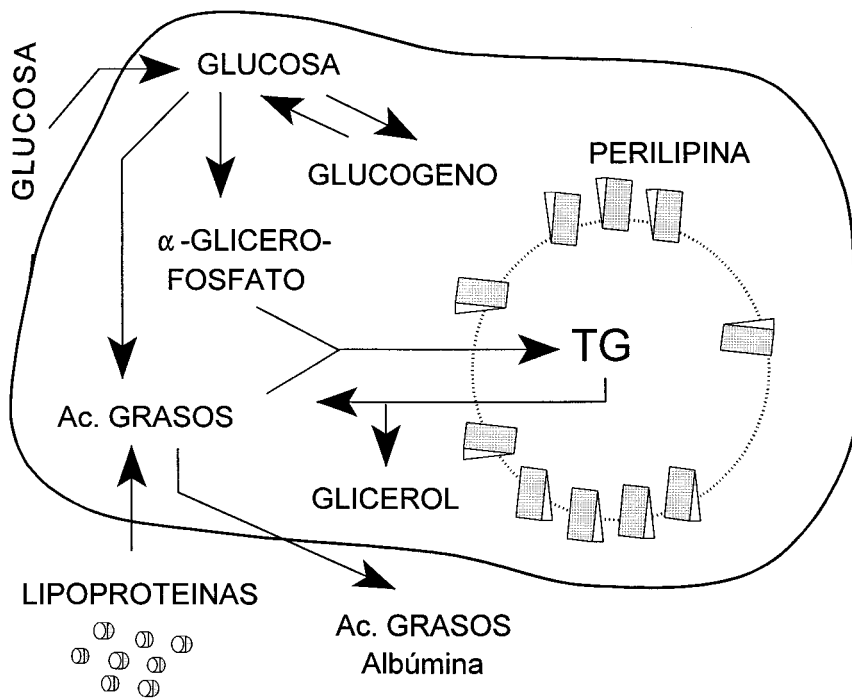


Fig. 1. Esquema del metabolismo del tejido adiposo.

d) Hidrolizar los TG almacenados separando sus componentes estructurales: AG y glicerol.

e) Oxidar “in situ” los AG para obtener energía, o liberarlos al plasma para su transporte a otros órganos y tejidos, donde serán utilizados como substratos energéticos.

f) Sintetizar glucógeno a partir de carbohidratos o liberar glucosa de glucógeno y obtener de ésta el α -GP necesario para esterificar los AG.

El balance que en cada momento se establece entre lipogénesis y lipólisis en el tejido adiposo depende del resultado de la suma de las señales reguladoras de carácter hormonal, nervioso y paracrino, que están actuando sobre los receptores del adipocito. Los adipocitos blancos y marrones poseen gran número de receptores en su membrana plasmática o en el interior de su citoplasma y núcleo.

En condiciones fisiológicas los mamíferos ejercen un control más exhaustivo y preciso de la lipólisis que de la lipogénesis. Se ha comprobado, tanto “in vivo” como “in vitro”, que múltiples hormonas, neurotransmisores, neuromodulares y mensajeros paracrinicos regulan la lipólisis. Incluso la insulina, única hormona que regula la intensidad de la lipogénesis en condiciones fisiológicas, ejerce también un control de la lipólisis por su actividad antilipolítica (reduce la respuesta del tejido adiposo a la estimulación hormonal lipolítica).

2. 1. 1. Receptores en el tejido adiposo

El receptor de insulina, perteneciente a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa, es uno de los primeros que se describieron en la membrana plasmática de los adipocitos blancos y marrones. Desde hace más de dos décadas se conoce el efecto biológico de la insulina en el tejido adiposo: aumento de la lipogénesis, inhibición de la lipólisis e incremento de la captación

de glucosa. Aunque todavía quedan aspectos por entender de los mecanismos intracelulares que median su efecto biológico, se acepta que en el mismo participan la proteína quinasa C (PKC), el transportador de glucosa (Glut-4) regulado por insulina y una molécula específica, conocida como substrato receptor de insulina, que ensambla los mecanismos intracelulares que determinan el efecto biológico (Olansky, 1996). Todo este complicado proceso se inicia con la fosforilación de los residuos de tirosina de la porción interna del receptor como consecuencia de la formación del complejo hormona-receptor.

Entre los múltiples receptores que poseen las células del tejido adiposo y que participan en la regulación de la lipólisis cabe destacar los receptores adrenérgicos (RA). En 1983 Fain y García-Sáinz concluyeron que en el tejido adiposo humano y de algunos animales existen RA tipo α -1, α -2 (RA- α 1 y RA- α 2) y RA tipo β (RA- β). Los RA- β estimulan la lipólisis, incrementando el AMPc. Los RA- α 2 inhiben la lipólisis disminuyendo la concentración de AMPc. Los RA- α 1, caracterizados farmacológicamente como RA- α 1B por Torres-Márquez y cols. en 1992 en el TAB, activan la glucogenólisis y reducen la glucogenogénesis al incrementar la concentración del calcio iónico intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), con la intervención del diacilglicerol (DG) e inositol-trifosfato (IP3). En el TAM, los RA- α 1 estimulan la respiración. En 1991 Langin y cols. describieron en el TAB tres tipos de RA- β , los RA- β 1, RA- β 2 y RA- β 3. Todos estos tipos de receptores han sido identificados también en el tejido adiposo marrón (Lafontan y Berlan, 1993).

Además de los RA, los adipocitos expresan receptores que activan la lipólisis, como los receptores para ACTH (López y cols., 1959), para STH y glucagón (Uehara y cols., 1986), para PTH (Ziegler y cols., 1980; Ni y cols., 1994), para péptidos de melanocortina MC2 y MC5 (Boston y Cone, 1996), y también receptores para el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Green y cols., 1985).

En la membrana de las células adiposas existen también receptores que desencadenan respuestas antilipolíticas, como los receptores de adenosina tipo A (Saggerson y Jamal, 1990), los del neuropéptido Y (NY) y la prostaglandina E1 (PGE1) (Castan y cols., 1994), y los del neuropéptido YY (NYY) (Castan y cols., 1992 y 1993).

Otro grupo de hormonas modulan la respuesta hormonal lipolítica regulando el número de receptores lipolíticos, la afinidad de estos receptores a sus respectivas hormonas, o actuando sobre alguno de los intermediarios de la cascada de transducción intracelular.

Tavernier y cols. en 1995 comprobaron que los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo responden menos a la estimulación de los agonistas RA- β y más a los RA- α 2 que los obtenidos del epidídimo o del tejido adiposo perirrenal. También la edad y el sexo determinan cambios en la respuesta a estímulos agonistas del RA- α y RA- β (Langin y cols., 1995). Giudicelli y cols. en 1993 afirmaron que el sistema de transducción de la lipólisis mediada por RA es un punto de actuación de las hormonas sexuales que pueden modificar la síntesis del ARNm de la proteína-receptor o de algunas de las enzimas de la cadena de transducción (proteína-quinasa, adenil-ciclase o lipoproteínlipasa). Los estrógenos aumentan la síntesis de ARNm de la proteína RA- α 2 (Pecquery y cols., 1995) y la testosterona favorece la respuesta lipolítica del tejido adiposo blanco a las catecolaminas al incrementar la adenil ciclase y la proteína quinasa A (PKA) (Xu y cols., 1993).

Se han descrito receptores nucleares para T3 en adipocitos (Krahenbuhl y Burgi, 1987) que favorecen la lipólisis. El hipotiroidismo incrementa la respuesta antilipolítica y reduce la lipolítica (Saggerson, 1986) al producir un aumento de las proteínas Gi α 1, Gi α 2 y Gi α 3 (Milligan y Saggerson, 1990).

Por otro lado, insulina y glucagón realizan una “down regulation” de la adenil ciclasa de los RA- β 3 (Begin-Heick, 1995), y algunos péptidos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), interfiere con la acción lipolítica de glucagón e isoproterenol por interacción con proteínas Gs-Gi en adipocitos de ratas (Tebar y cols., 1993).

2. 2. Aspectos específicos

Aunque el TAB y el TAM pueden realizar los mismos procesos metabólicos con TG y glucógeno y sus células responden básicamente a las mismas señales reguladoras, ambos tejidos cumplen una función fisiológica diferente por el destino que tienen los AG que liberan y por la importancia que en cada uno de ellos tienen los distintos mecanismos reguladores.

3. Tejido adiposo marrón: metabolismo y actividad eléctrica

El TAM es el órgano más importante para la termogénesis sin temblor. Su actividad funcional tiene verdadero significado fisiológico en determinadas etapas vitales de los mamíferos. En los animales hibernantes, la síntesis y almacenamiento de TG ocurre especialmente en los períodos de prehibernación y durante el despertar de la hibernación hidrolizan los TG almacenados. En los no hibernantes, sólo en la fase de recién nacido o en adaptaciones al frío intenso, y en menor cuantía en la termogénesis inducida por la dieta (Koivisto y cols., 1993), juega el TAM un destacado papel funcional.

Una pequeña parte de los AG obtenidos por lipólisis en el TAM son liberados a la sangre para su utilización por otras células. La mayor parte de éstos se oxidan en la mitocondria del propio adipocito. En la mitocondria del adipocito marrón existe una proteína, la termogenina, desacopladora de la fosforilación oxidativa. Esta proteína funciona como un shunt de protones (Cannon y Nedergaard, 1985; Trayhurn y Nicholls, 1986) impidiendo que se genere un gradiente de protones entre la matriz y la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Al disiparse la fuerza protomotriz originada por la cadena de transporte de electrones, la energía química de los AG oxidados en la mitocondria, en vez de transformarse en ATP, se pierde en forma de calor.

La actividad lipogénica del TAM, al igual que ocurre con el TAB, está regulada por la insulina. La lipólisis depende de la regulación nerviosa y en menor proporción de la hormonal y paracrina. Se ha comprobado con técnicas histoquímicas y pruebas farmacológicas que los RA- β del TAM están densamente innervados (Grassby y cols., 1987). Los receptores β 3 median la mayoría de las respuestas lipolíticas en los adipocitos marrones (Arch y cols., 1984; Arch, 1989), con participación del AMPc como mediador intracelular (Schimmel y cols., 1983).

La capacidad termogénica del TAM está regulada muy estrechamente por el sistema nervioso simpático. La liberación de noradrenalina (NA) por neuronas simpáticas "in vivo" o la aplicación de NA "in vitro", al unirse a los RA- α y RA- β de los adipocitos marrones inicia dos respuestas, una eléctrica y otra metabólica. La respuesta eléctrica consiste en una modificación del potencial de membrana (V_m), que en condiciones basales es de -51 ± 4 mV (Girardier y cols, 1968). Se inicia con una rápida despolarización de 10 a 30 segundos de duración y 25 mV de amplitud, seguida de una hiperpolarización de 2 a 5 minutos de duración y 5 a 10 mV de amplitud, para finalizar con una nueva despolarización de 20 a 25

mV de amplitud, que perdura todo el tiempo que se mantiene la estimulación adrenérgica (Girardier y cols., 1968; Williams y Matthews, 1974a y b; Girardier y Schneider-Picard, 1983; Horwitz y Hamilton, 1984; Schneider-Picard y cols., 1985; Horwitz y cols., 1989; Lucero y Pappone, 1990).

Coincidiendo con la fase de despolarización lenta, se detectan en el TAM una elevación, de 10 a 40 veces, del consumo de oxígeno y de la producción de calor (Foster y Frydman, 1978; Wickler y cols., 1984). Se ha postulado por ello que los cambios iónicos producidos por la estimulación simpática y la termogénesis están íntimamente relacionados (Girardier y cols., 1968; Schneider-Picard y cols., 1985).

En el TAM se han descrito diferentes tipos de canales, que participan en el movimiento iónico transmembrana que se produce tras la estimulación simpática. Se ha sugerido que la despolarización inicial se debe a la salida de Cl⁻ a través de canales de cloro activados por Ca²⁺ (Sabanov y Nedergaard, 1995) mediados por RA- α 1 (Dasso y cols., 1990; Pappone y Lee, 1995); la hiperpolarización que se registra posteriormente se produce como consecuencia de la salida de K⁺ a través de dos tipos de canales de K⁺, uno Ca²⁺ dependiente y otro voltaje dependiente. Estos canales se activan preferentemente por receptores α 1 y en menor grado con agonistas de los receptores β 1 (Nanber y cols., 1985; Lucero y Pappone, 1989 y 1990). La despolarización final de larga duración se explica por la entrada de Na⁺ a través de canales catiónicos no selectivos (NSC) que se activan por la estimulación β -adrenérgica (Connolly y cols., 1986; Siemen y Reuhl, 1987; Lucero y Pappone, 1990).

Además de los canales anteriormente descritos, Ruß y cols. en 1993 han demostrado la existencia de un canal de K⁺ no sensible a voltaje y que no parece participar en la respuesta lipolítica a la NA.

4. Tejido adiposo blanco: metabolismo y actividad eléctrica

La función más importante del TAB es la de participar en la homeostasis de los sustratos metabólicos del plasma para asegurar un adecuado aporte energético a todos los órganos y tejidos. Almacena en forma de TG los sustratos metabólicos en exceso del plasma y los libera en forma de AG en situaciones de carencia.

La actividad metabólica en el tejido adiposo blanco tiene significado fisiológico durante toda la vida del animal. Sintetiza y almacena TG en los períodos digestivos y libera AG en los períodos de ayuno. Todos los animales atraviesan períodos de ayuno y de alimentación cuya frecuencia depende de los hábitos alimenticios.

En el adipocito blanco, los AG procedentes de la hidrólisis de los TG son liberados a la sangre, desde donde son transportados a los tejidos periféricos para su oxidación. Algunos de los AG pueden ser oxidados en la mitocondria del adipocito blanco para obtener ATP.

Mientras que la lipogénesis en el TAB, tal y como ocurre en el TAM, está regulada por la insulina, la lipólisis depende preferentemente de los niveles de hormonas circulantes (adrenalina, NA, glucagón, ACTH, GH, STH y VIP), de señales paracrinas (adenosina, EGF, PGE1) y neuropéptidos (NY, NYY), del efecto de hormonas que regulan el número y la sensibilidad de los receptores (glucagón, insulina, hormonas corticoideas, hormonas sexuales, hormonas tiroideas) y en menor proporción de la regulación nerviosa.

En el TAB se conocen bastante bien los aspectos bioquímicos de su metabolismo y los fenómenos de membrana e intracelulares que participan en su regulación. Por el contrario, hay muy pocos datos sobre las propiedades eléctricas de los adipocitos y sus bases iónicas, y carecemos de información sobre el posible papel funcional de estos fenómenos eléctricos. Hay, sin embargo, aportaciones experimentales publicadas que, de forma indirecta, apoyan la existencia de fenómenos eléctricos activos en la membrana de estas células y de su posible significado funcional. Entre estas publicaciones cabe destacar aquellas que demuestran:

- a) una estrecha interrelación entre las modificaciones iónicas y la actividad metabólica de los adipocitos blancos, en condiciones basales y bajo estimulación hormonal, y
- b) la existencia en la membrana del adipocito de ATPasas, cotransportes, etc., que constituyen el soporte molecular para el movimiento iónico transmembrana, y sugieren la presencia de canales iónicos.

4. 1. Interacción de iones, actividad metabólica y regulación hormonal

En general los iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , PO_4H^{2-} y CO_3H^- pueden, cuando se modifica experimentalmente su concentración intra o extracelular, inducir cambios, en mayor o menor cuantía, en la actividad metabólica del tejido adiposo y de los adipocitos blancos, en condiciones basales y tras estimulación hormonal. Aunque el efecto de las modificaciones y sustituciones iónicas sobre el metabolismo del TAB pueden explicarse, entre otras causas, por variaciones

en la actividad enzimática o en la afinidad hormona-receptor, es indudable que en estas condiciones se producen cambios en los gradientes electroquímicos transmembrana y que estos cambios pueden ser pasos obligados y significativos en el desencadenamiento de estas respuestas. Por otro lado, hormonas que regulan la actividad metabólica del TAB pueden modificar la distribución intra / extracelular de estos iones y sus flujos transmembrana.

4. 1. 1. Calcio

Se ha comprobado que la presencia de Ca^{2+} es necesaria para que algunas hormonas produzcan su efecto biológico "in vitro". Incubando en un medio sin Ca^{2+} , López y cols. en 1959 no obtuvieron respuesta lipolítica al estimular adipocitos blancos con ACTH, aunque se mantiene la respuesta lipolítica a glucagón y secretina (Schimmel, 1973) y a altas dosis de adrenalina (Mosinger y cols., 1962). En estas condiciones, disminuye la respuesta lipolítica a TSH, adrenalina y NA (Schimmel, 1973). La insulina en ausencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} no produjo incorporación de U^{14}C en los TG, ni ^3H -leucina en las proteínas, pero sí manifestó efecto antilipolítico (Emami y Perry, 1986). La quelación del Ca^{2+} intracelular bloquea el efecto de la insulina (Pershadshing y cols., 1987).

El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que se produce despolarizando los adipocitos al elevar la concentración de K^+ extracelular ($[\text{K}^+]_e$), inhibe la defosforilación del receptor de insulina y de la glucógeno sintetasa. Los bloqueantes de canales de Ca^{2+} y la ausencia de Ca^{2+} extracelular previnieron la inhibición de la fosfoproteína fosfatasa. El efecto del Ca^{2+} intracelular es reversible (Begum y cols., 1991). Si la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantiene durante algún tiempo, se reduce la captación de glucosa inducida por insulina, por probable actuación sobre el transportador o sobre la tirosina quinasa (Draznin y cols., 1989).

La elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ produce efectos distintos dependiendo de donde procede el Ca^{2+} . Si la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta por liberación de los almacenes intracelulares (oxitocina e ionomicina), no se modifica la elevación de la gluco-oxidación producida por la insulina, pero si la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta por entrada del Ca^{2+} desde el espacio extracelular (adrenalina y ATP), se inhibe el aumento de la gluco-oxidación producido por la insulina (Kelly y cols., 1989). Las sustancias que aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ (ouabaina, lantano, procaina, ionóforos de Ca^{2+}) mimetizan la acción antilipolítica de la insulina (Ho y cols., 1967).

En “fantasmas” de adipocitos (membrana plasmática de adipocitos), la insulina altera la salida del Ca^{2+} intracelular, aumenta la unión del Ca^{2+} a la membrana (McDonald y cols., 1976) y a la calmodulina de la membrana (Goewert y cols., 1983), y favorece la fosforilación de la calmodulina (Sacks y cols., 1992).

La estimulación con ACTH, NA y sustancias noradrenérgicas elevan en el adipocito blanco la $[Ca^{2+}]_i$ en 10 segundos. La ACTH activa la fosfolipasa A acoplada a proteína fijadora de GTP sensible a toxina pertusis, libera ácido araquidónico del fosfatidilinositol y de la fosfatidilcolina. Esto incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ de forma rápida y sostenida (Izawa y cols., 1994; Izawa y Komabayashi, 1994). La NA determina una menor elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ cuando se añade a adipocitos incubados en un medio libre de Ca^{2+} , por lo que estos autores sugieren que esta hormona puede movilizar el Ca^{2+} de depósitos intracelulares y promover el influjo de Ca^{2+} .

4. 1. 2. Potasio

La presencia de K^+ es necesaria para obtener una respuesta lipolítica óptima. La falta de K^+ redujo, de forma reversible, la lipólisis inducida por adrenalina, glucagón, ACTH y GH (Bleitcher, 1966; Ho y cols., 1966; Mosinger y Kujalová, 1966a y b; Mosinger y Vaughan, 1967a; Kypson y cols., 1968). La

ausencia de K^+ extracelular en el medio de incubación disminuye la elevación del AMPc producido por la NA (Kuo y DeRenzo, 1969), pero no afecta a la respuesta lipolítica inducida por teofilina, dibutilil-AMPc (db-AMPc), e incluso aumenta la lipólisis desencadenada por ouabaina (Mosinger y Vaughan, 1967b).

Si se reduce la permeabilidad a los cationes con anestésicos locales (Taylor, 1959), se inhibe la respuesta lipolítica de adipocitos aislados a ACTH, glucagón, glucocorticoides y STH (Hales, 1970), especialmente con dibucaina, que reduce también la respuesta lipolítica a teofilina y db-AMPc.

Cuando se incrementa la $[K^+]_e$ en el medio de incubación aumenta la actividad lipolítica y la captación de glucosa en condiciones basales en el tejido adiposo. En estas condiciones experimentales la insulina produce un efecto menos manifiesto sobre la captación de glucosa y bloquea el efecto lipolítico del K^+ (Mosinger, 1968 y 1969; Perry y Hales, 1969). Con 10 mM de $[K^+]_e$ aumenta la actividad de la adenil ciclasa de la membrana de los "fantasmas" de adipocitos (Birnbaumer y cols., 1969).

Los primeros datos del efecto de la insulina sobre la distribución y flujo del K^+ en el tejido adiposo fueron publicados por Zierler y Ribanovitch en 1963 y 1964. Estos autores demostraron que perfundiendo insulina en la arteria braquial del hombre hasta alcanzar una concentración de 30 a 40 μ U/ml se producía un incremento en la captación de K^+ , tanto en el músculo como en el tejido adiposo. El tejido adiposo incubado in vitro, en ausencia de insulina, gana Na^+ y pierde K^+ . La adición de insulina invierte el proceso (Gourley y Bethea, 1964).

Por el contrario, las hormonas y sustancias lipolíticas como adrenalina, cafeína, teofilina, ouabaina y 2-deoxiglucosa reducen la captación neta de K^+ en adipocitos aislados. Este efecto es bloqueado por la insulina (Touabi y Jeanrenaud, 1970). En tejido adiposo del epidídimo, adrenalina y ACTH reducen

el contenido de K^+ (Clausen, 1969). Perry y Hales en 1969 midieron el tiempo medio de salida del ^{42}K en adipocitos aislados y premarcados, comprobando que la adrenalina, ACTH y 3'5' db-AMPc aumentan la velocidad de salida de este ión.

Estos hechos se interpretan como secundarios a las modificaciones que hormonas lipogénicas y lipolíticas producen sobre la concentración intracelular de AG libre. Estos funcionan como desacopladores de la fosforilación oxidativa. Su aumento reduce la producción de ATP y frena la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ dependiente. La insulina al favorecer la lipogénesis invierte el proceso (Touabi y Jeanrenaud, 1970; Clausen, 1969).

4. 1. 3. Otros iones

Los iones fosfatos y bicarbonatos son esenciales para que el TAB responda adecuadamente a la insulina, pues al disminuir la concentración de estos iones en el medio de incubación, el tejido reduce su sensibilidad a la hormona.

Cuando se reemplaza el Cl^- por otro anión, aumenta la captación de glucosa por el tejido adiposo (Hales, 1967) y se produce una inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina (Hales y cols., 1968). El mismo resultado obtuvo Perry en 1969 al sustituir los Cl^- por acetato, comprobando además que se reduce también la lipólisis inducida por db-AMPc. La adrenalina aumenta el flujo de salida de Cl^- (Perry y Hales, 1967).

Cuando se modifica la actividad de la ATPasa activada por Na^+ y K^+ , descrita por Skou en 1965, se producen cambios en el metabolismo del tejido adiposo. Al bloquearla, se reduce la degradación de glucógeno y la liberación de lactato (Ho y Jeanrenaud, 1967). La insulina aumenta a los 10 minutos de su

aplicación la actividad de la bomba Na^+/K^+ (Perry y Hales, 1969; Hales y Perry, 1970). De las dos formas de ATPasa Na^+/K^+ dependientes descrita por Lytton y cols. en 1985 en el adipocito de rata (isoformas 1 y 2), la insulina estimula a ambas (McGill y Guidotti, 1991), pero afecta preferentemente a la afinidad del Na^+ por la ATPasa y ambas isoformas dependen fuertemente de la concentración de Na^+ intracelular (McGill, 1991).

La insulina activa el intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática del adipocito sensible al amiloride, descrito por Arsenis y Spencer en 1995.

4. 2. Soporte molecular del movimiento iónico transmembrana

Se sabe que en la membrana plasmática de los adipocitos blancos existe una ATPasa activada por Na^+ y K^+ (Skou, 1965; Modolell y Moore, 1967; Letarte y cols., 1969; Letarte y Renold, 1969) y por ello los adipocitos aislados acumulan K^+ y expulsan Na^+ , por un mecanismo dependiente de energía y sensible a ouabaina (Letarte y cols., 1969; Perry y Hales, 1969; Touabi y Jeanrenaud, 1970).

Arsenis y Spencer en 1995, bloqueando con ouabaina la bomba Na^+/K^+ ATP dependiente y disminuyendo el pH intracelular, demostraron que la insulina aumenta la entrada de Na^+ en el adipocito y que este efecto es bloqueado por el amiloride. De este modo, postularon la presencia de un intercambiador Na^+/H^+ en la membrana plasmática del adipocito.

Pershadshing y cols. en 1989 describieron la existencia de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la membrana del adipocito. Demostraron que, al sustituir parcialmente el Na^+ por K^+ en el medio extracelular y reducir el gradiente químico de K^+ , se despolariza el adipocito, y se eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al caer el

gradiente electroquímico de Na^+ que representa la fuerza de empuje del intercambiador. Estos datos confirmaban los publicados por Clausen en 1970 en los que comprobaba que la salida de Ca^{2+} del adipocito blanco era dependiente de Na^+ , pues al sustituir este ión por Li^+ o por colina aumentaba la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

En relación con el Ca^{2+} se ha demostrado la existencia de una ATPasa en la membrana del adipocito dependiente de Ca^{2+} (Pershadshing y McDonald, 1979), que expulsa el Ca^{2+} desde el interior de la célula contra gradiente. Esta ATPasa Ca^{2+} dependiente se inhibe por la insulina.

Pershadshing y cols. en 1989 midiendo las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con fura-2, han sugerido la existencia de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en la membrana del adipocito, que se bloquean por diltiazem. Ni y cols. en 1994, midiendo la concentración intracelular de Ca^{2+} al estimular con PTH, vuelven a sugerir la presencia de estos canales. En 1996 Gaur y cols., basados en datos obtenidos midiendo el Ca^{2+} intracelular con fura-2, apuntan que en la membrana del adipocito blanco puede haber canales de Ca^{2+} tipo L, y que la incorporación de estos canales a la membrana está regulada por la GH.

Cuando estimulan adipocitos blancos aislados con agonistas de $\text{RA-}\alpha$ y $\text{RA-}\beta$, Hardy y cols. en 1992 comprueban una elevación transitoria de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que puede explicarse por la entrada del Ca^{2+} desde el medio extracelular por la posible activación de canales Ca^{2+} dependientes, como los que han sido sugeridos en otros tejidos (Petersen y Wakui, 1990).

Pershadshing y cols. en 1986, midiendo la captación de ^{86}Rb en adipocitos aislados, concluyeron que la membrana de estas células puede poseer una conductancia a K^+ dependiente de Ca^{2+} que se bloquea por TEA y pH bajo. También se ha propuesto que los adipocitos blancos expresan canales catiónicos no selectivos sensibles a ATP, similares a los descritos en el TAM (Koivisto y cols., 1993).

4. 3. Características eléctricas del adipocito blanco

Las primeras aproximaciones experimentales al estudio de las propiedades eléctricas del adipocito blanco se realizaron durante la década de los 60. Beigelman y Hollander, en tres trabajos que publicaron en 1962, 1964 y 1965, fueron los primeros autores que, utilizando microelectrodos intracelulares, midieron el V_m de los adipocitos blancos y estudiaron el efecto de la insulina sobre este parámetro. En condiciones basales el valor del V_m encontrado fue de -17 a -37 mV. La insulina produjo un aumento del V_m de hasta 30 mV y la adición de anticuerpos-antiinsulina al líquido de perfusión bloqueó este efecto. Este nivel de potencial de los adipocitos blancos en condiciones basales es similar al medido por Miller y cols. en 1966 y al calculado por Perry y Hales en 1969 a partir de la distribución intra / extracelular de iones Cl^- .

Hasta la década de los 80 no hay ninguna nueva aportación en este campo. En 1983 Vallano y cols., utilizando trifenilmetilfosfonio (TFMF), un colorante cuya distribución intra / extracelular e intra / extramitocondrial depende del V_m de la célula y de la mitocondria, demostraron que las hormonas con actividad lipolítica (adrenalina, ACTH y el AMPc) y los agentes lipolíticos despolarizan el adipocito. En 1994 Kamei y Sugimoto estudiaron los iones que intervienen en la despolarización producida por la histamina en el adipocito aislado de cobaya. De su estudio concluyeron que la despolarización depende de los iones de Na^+ y K^+ pero no del Ca^{2+} . Pershadshing y cols. en 1986 demuestran de forma indirecta que el V_m del adipocito depende del gradiente intra / extracelular de K^+ , pues cuando se reduce este gradiente al elevar la $[K^+]_e$, el adipocito se despolariza y entra Ca^{2+} en la célula.

5. Planteamiento del problema y objetivos

De todo lo anterior se concluye que en el TAB:

1.- Existe una estrecha relación causal entre los gradiente y flujos iónicos, y como consecuencia el V_m , con la actividad metabólica basal y su respuesta hormonal. La modificación de alguno de estos tres parámetros produce cambios en los otros dos.

2.- Hay datos experimentales que sugieren que la membrana plasmática del adipocito blanco puede poseer canales iónicos que pueden mediar el movimiento iónico transmembrana.

3.- Podrían generarse también, como ocurre en el TAM, fenómenos eléctricos de membrana que participen de forma significativa en su papel fisiológico.

Por todo ello hemos considerado de interés, como contenido de esta tesis doctoral, estudiar:

I. Las propiedades eléctricas pasivas y activas del adipocito blanco.

II. Sus bases iónicas.

III. El efecto que sobre estas propiedades eléctricas puedan ejercer hormonas y mediadores intracelulares con reconocida capacidad reguladora del metabolismo de estas células.

MATERIAL Y METODO

1. Animal de experimentación, preparación de la muestra y técnica empleada

En el presente trabajo se ha utilizado tejido adiposo blanco del epidídimo de ratas Wistar machos, de mes y medio de edad y 180 g de peso, alimentadas ad libitum.

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Tras abrir la cavidad abdominal se exteriorizaron los testículos y el pániculo adiposo del epidídimo presionando sobre las bolsas escrotales. Para favorecer una correcta nutrición de los adipocitos durante la incubación se seleccionaron, del tejido adiposo, las porciones más distales, delgadas y con menos capas de células.

Una vez cortadas, estas porciones se sumergieron en una solución estándar previamente oxigenada (Tabla I), con pH ajustado a 7.4 y a temperatura ambiente, donde se mantuvieron, para su estabilización metabólica y funcional, durante algunos minutos, antes de proceder al registro intracelular mediante técnica de fijación de corriente.

2. Soluciones y sustancias empleadas

Para la exploración del tejido adiposo mediante el registro intracelular se utilizaron las soluciones de incubación que se detallan en la Tabla I, según protocolo.

Tabla I
Composición de las soluciones externas empleadas
en el registro intracelular del adipocito blanco
(concentración en mM)

	<i>Estándar</i>	<i>Bajo K⁺</i>	<i>Sin Ca²⁺</i>	<i>Cobalto</i>
<i>CINa</i>	124	127.6	130	130
<i>ClK</i>	5	1.4	6.2	6.2
<i>Cl₂Ca</i>	2.4	2.4		
<i>Cl₂Cd</i>			1	
<i>Cl₂Co</i>				2.4
<i>Cl₂Mg</i>			1.3	1.3
<i>SO₄Mg</i>	1.3	1.3		
<i>PO₄H₂Na</i>	1.2	1.2		
<i>CO₃HNa</i>	25	26		
<i>Trizma *</i>			25	25
<i>EGTA</i>			0.5	
<i>Glucosa</i>	10	10	10	10

* Trizma, es el Tris (hidroximetil) aminometano, pH = 7.4

Todas las soluciones se gasearon con carbógeno (95 % de O₂ y 5 % de CO₂).

Las sustancias que se añadieron para caracterizar canales iónicos (tetrodotoxina, tetraetilamonio, cloruro de cesio, cloruro de bario, 4-aminopiridina), para estudiar el efecto hormonal (insulinas porcina y bovina, noradrenalina y péptido intestinal vasoactivo) y para determinar la posible participación del AMPc (forskolin, dimetil-sulfoxido, dibutilil-AMP-cíclico e isobutilmetil-xantina) se diluyeron en la solución estándar de incubación de la cámara de registro. En el apartado de resultados indicamos la concentración alcanzada en la cámara por cada sustancia.

Todos los productos químicos utilizados han sido suministrados por Merck y Sigma Chemical.

3. Sistema de registro intracelular

El material empleado para adquirir, registrar, almacenar, reproducir y analizar los cambios de voltaje producidos por pulsos de corriente en el adipocito blanco, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas, puede clasificarse, en base a sus aplicaciones, en tres grandes grupos:

1. Equipo óptico-mecánico. Conjunto de instrumentos cuya finalidad es la de mantener el tejido en condiciones adecuadas para asegurar la normalidad funcional del adipocito, favorecer la estabilidad mecánica de la preparación y controlar visualmente la aproximación del microelectrodo al tejido.

2. Equipamiento electrónico. En este apartado incluimos la instrumentación

básica necesaria para estimular con pulsos de corriente al adipocito y para registrar y almacenar su respuesta de voltaje.

3. Equipo complementario para el análisis y reproducción gráfica de las señales eléctricas almacenadas.

3. 1. Equipo óptico-mecánico

En este apartado incluimos la cámara de registro, el micromanipulador, el estéreomicroscopio, la jaula de Faraday y la mesa antivibratoria.

Para perfundir y mantener el tejido adiposo a temperatura constante durante el experimento utilizamos una **cámara de registro intracelular** construida en nuestro Departamento (Alvarez de Toledo, 1985), cuyo esquema se presenta en la Fig. 2. La cámara está dividida en distintos compartimentos. En el *compartimento central* (1) se coloca el tejido adiposo, sobre el que se sitúa una *malla de plástico* ajustada al perímetro del compartimento que permite mantener el tejido en su fondo evitando que flote.

Con la *precámara* se consigue que el flujo y las turbulencias del líquido de perfusión, a su paso por el compartimento central, no desplacen el tejido ni dificulten la penetración intracelular de la micropipeta. El líquido de perfusión, procedente de un *recipiente* situado a unos 50 cm sobre el nivel de la cámara, se vierte, a través de un *tubo de teflón* (2) y después de atravesar una *subcámara de calentamiento* (3), en la precámara (4), desde donde pasa al compartimento o cámara central.

El líquido de perfusión fluye, por la presión del nivel hidrostático, desde la cámara central a la *postcámara de drenaje* (5), pasando finalmente al

compartimento de succión (6). En este último compartimento se instala una aguja (7) conectada a una bomba de vacío que extrae por aspiración el líquido de perfusión de la cámara.

La cuantía del flujo que circula por la cámara y el nivel del líquido en la misma se regulan modificando la intensidad de la aspiración con una llave de entrada y la altura a la que se coloca la aguja de aspiración.

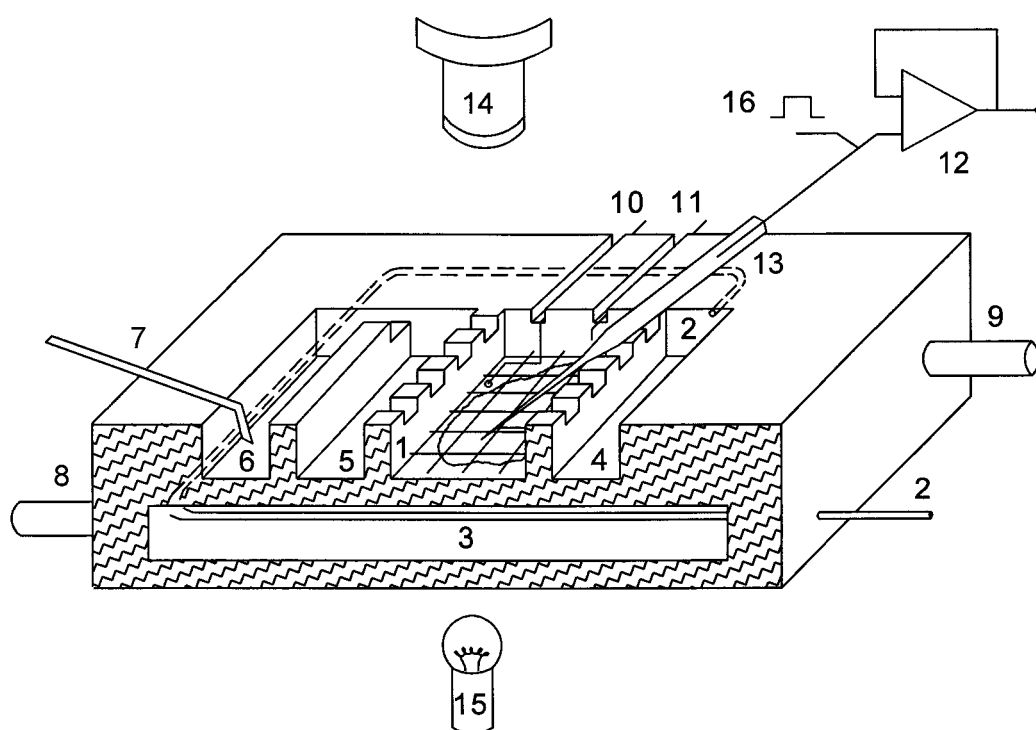


Fig. 2. Cámara de registro intracelular utilizada para el estudio de las propiedades electrofisiológicas del tejido adiposo blanco, cuyas características señaladas con números se reseñan en el texto; (16), estimulación. (Diagrama modificado del modelo original, por cortesía de Alvarez de Toledo, 1985).

Tanto la cámara central como los otros compartimentos están situados encima de la subcámara de calentamiento, a la que se le hace llegar agua a

unos 37 °C, procedente de un *baño termostático*, por tubos de goma de *entrada* (8) y *salida* (9). Por ella discurre el tubo de teflón que conduce el líquido de perfusión desde su recipiente a la cámara. Esta disposición espacial permite calentar el líquido de incubación y mantener su temperatura constante a 35 °C, mientras circula por los distintos compartimentos de la cámara. Dicha temperatura se controla mediante un *termistor* (10) sumergido en la solución del compartimento central. También en este compartimento se sumerge el *electrodo indiferente* (11).

El *Head Stage*, que contiene el *seguidor de voltaje* (12), y el *microelectrodo* (13) están fijados a un **micromanipulador** de control hidráulico a distancia (Narishige, mod. MO-10, Tokio, Japón), que permite la aproximación suave y controlada del microelectrodo al tejido y facilita la penetración al interior celular.

Para controlar visualmente la aproximación del microelectrodo a la superficie del tejido adiposo, hemos utilizado un **estéreo microscopio** (14) (Nikon, mod. 102, Japón), transiluminando el tejido con una *lámpara de corriente continua* (15).

El filtrado de las interferencias electromagnéticas se consigue rodeando externamente todos los elementos descritos, particularmente los electrodos y el “Head Stage”, con una **jaula de Faraday** conectada a tierra.

Tanto cámara de perfusión, electrodos y seguidor de voltaje, como microscopio y micromanipulador, se sitúan sobre una **mesa antivibratoria** de aire comprimido (Microg, mod. 61-541-01, TMC, Massachusetts, EE.UU.), apoyada sobre cubetas de arena para evitar el efecto perturbador de las vibraciones mecánicas.

3. 2. Equipamiento electrónico.

El equipo electrónico básico usado en nuestros experimentos se conforma mediante la combinación de un generador de pulsos con un amplificador de registro intracelular, a los que se incorporan un sistema de grabación digitalizada para almacenamiento de registros y un osciloscopio para su monitorización.

Tanto el generador de pulso como el amplificador se han construido en nuestro Departamento, según diseño original modificado (Alvarez de Toledo, 1985; Alvarez de Toledo y López Barneo, 1988).

El **generador de pulsos** permite producir, simultánea o sucesivamente, dos pulsos cuadrados de voltaje y controlar su amplitud, frecuencia, duración, polaridad y retraso de uno con respecto al otro.

Las características de estos pulsos son:

1. Un primer pulso cuadrado de estimulación, positivo o negativo, con una duración de 5 ms a 1 s y de 0 a 500 mV de amplitud, con posibilidad de retrasar su disparo entre 0 y 300 ms con respecto a la señal de sincronismo.

2. Un segundo pulso cuadrado de estimulación con una duración entre 5 y 300 ms, del mismo rango de amplitud que el primero y con posibilidad de retrasar su disparo entre 1 y 300 ms con respecto al primero. Admite una repetitividad de hasta 99 veces, a intervalos de 3 a 100 ms.

Finalmente, el generador de pulsos también proporciona un pulso tipo TTL (0 - 5 V), para sincronizar todo el sistema electrónico de registro, con una frecuencia de disparo de entre 0.1 y 10 Hz.

El **amplificador de registro intracelular** está compuesto por tres elementos básicos: el seguidor de voltaje, una etapa de ganancia y varias etapas de acondicionamiento de la señal.

Al seguidor de voltaje se le asocia un sistema de oscilación, de frecuencia regulable, que permite vibrar la punta del microelectrodo, con control manual o de forma automática, mediante relé. Estas funciones facilitan la penetración del microelectrodo en la célula y permiten limpiar su punta.

La etapa de ganancia posibilita multiplicar la señal por 10 y las etapas de acondicionamiento consiguen compensar la capacitancia y resistencia del microelectrodo y los potenciales de unión.

El amplificador posee también un sistema de inyección de un nivel de corriente continua que se puede generar a partir de pulsos de voltaje procedentes del generador o aplicando un voltaje positivo o negativo a la entrada positiva del amplificador.

En su conjunto, con este equipo **generador / amplificador** se consigue:

1. Generar pulsos cuadrados de corriente continua, positivos o negativos, para estimular la célula, actuando el amplificador como un convertidor voltaje-corriente, con una relación de conversión de 1 nA / 100 mV. En función de las características del generador de pulso, la corriente inyectada en la célula puede oscilar entre 0 y 5 nA.

2. Generar un nivel de corriente continua, positiva o negativa, con un rango de entre 0 y 2 nA, para mantener la célula despolarizada o hiperpolarizada.

3. Compensar la capacitancia y resistencia del microelectrodo y los potenciales de unión, así como producir una oscilación en el electrodo que favorece la limpieza de su punta y la penetración intracelular del mismo.

Los **microelectrodos** de registro intracelular se han obtenido sometiendo a estiramiento *capilares de vidrio* de borosilicato (A-M Systems, nº catálogo 6030, Everett, WA, EE.UU.), con un diámetro externo de 1.50 mm y un diámetro interno de 0.86 mm, mediante un estirador (Narishigue, mod. PE-2, Tokio, Japón). Estos capilares llevan en su interior una fibra hueca de vidrio que favorece su posterior llenado con acetato potásico 3 M. En esta solución se introduce el filamento de plata clorurada (Ag-ClAg) conectado al seguidor de voltaje del amplificador. El electrodo indiferente, introducido en la solución de incubación, también es de plata clorurada.

Las señales de corriente y las de voltaje se han digitalizado en un **sistema de conversión analógico-digital y codificación a señal de video** (Cibertec, mod. Physiorec-3, España), con una resolución de 16 bits y una respuesta en frecuencia de 20 kHz. De este modo se consigue una transferencia de señales analógicas a pulsos digitales, mediante modulación de la frecuencia de su tren de pulsos. Con esta conversión se ha garantizado la calidad del almacenamiento de los registros a través de una **grabación videomagnetoscópica** (Sony, mod. SL-HF150 PAL/SECAMost, Beta HiFi, Japón), en cintas videomagnéticas (Sony β , L-750 DX), y la fiabilidad de la reproducción de los mismos, para su ulterior análisis. La señal de sincronismo TTL, así como una *señal de audio* con comentarios sobre datos o incidencias del experimento, se graban en sendas bandas del audio estéreo, sin ser necesaria su digitalización.

La monitorización en tiempo real de los registros de voltaje y de corriente, y el análisis de los reproducidos desde la grabación, se ha realizado con un

osciloscopio analógico/digital (Gould DSO 1604, Essex, Reino Unido) de cuatro canales y entrada de sincronismo, con una base de tiempo de 0.2 μ s/div a 10 ms/div en forma analógica, y de 50 μ s/div a 200 s/div en forma digital, y una deflexión vertical de 2 mV/div a 10 V/div. En modo digital el equipo posee una memoria de adquisición de 10 Kb por canal y una capacidad de resolución de imagen de 8 bits por Kb.

El osciloscopio tiene también un *plotter interno* que permite reproducir en papel la imagen digitalizada y congelada en pantalla. Además viene equipado con un **procesador de ondas** (Gould Waveform Processor, mod. 160, Essex, Reino Unido), que facilita el análisis de los parámetros de las señales eléctricas en imagen.

3. 3. Equipo complementario para el análisis y reproducción de registros

Con el procesador de ondas se puede medir la amplitud de las deflexiones verticales (potencial y corriente inyectada) y de la horizontal (tiempo), así como el área incluida bajo la curva de los registros almacenados en videograbación. Los datos así obtenidos han sido tabulados y sometidos al **análisis estadístico** mediante la utilidad informática *Sigma Plot para Windows versión 1.01* (Jandel Scientific, 1993).

Para la **reproducción** definitiva de los registros, se ha hecho una nueva adquisición de la señal de voltaje desde la grabación videomagnética (previa decodificación y conversión digital-analógica), mediante una **tarjeta de adquisición analógico-digital** (Indec IDA-15125, Sunnyvale, California, EE. UU., 15 bits de resolución y frecuencia de muestreo de 125 kHz), incorporada a un

computador PC-486. Esta transferencia de los registros a un nuevo almacenamiento en binario se ha conseguido con la aplicación informática *Acquirea*, versión 4.70 (Indec Systems y University of Washington, EE. UU., 1990).

Los registros así obtenidos se han transformado en ficheros ASCII, a través de la aplicación *Read*, versión 4.62 (Indec Systems y University of Washington, EE. UU., 1989) y posteriormente han sido definitivamente almacenados en archivos del programa *Origin*, versión 3.54 para Windows (Microcal Software, Inc., EE. UU., 1994), en el computador PC. Este programa permite un completo análisis matemático complementario de los registros de voltaje del adipocito blanco, así como su reproducción gráfica final por medio de una impresora láser.

4. Análisis estadístico de los datos

Hemos estudiado el efecto de una determinada prueba experimental sobre las características eléctricas pasivas y activas del adipocito, expresándolo en porcentaje respecto de su situación basal, y calculando la media (m) y la desviación estándar (d.e.) o el error estándar (e.e.) de ese porcentaje en el conjunto de registros que constituyen dicha prueba. Cuando la muestra es suficientemente amplia se ha empleado la desviación estándar como medida de dispersión. Cuando el número de registros es inferior a 30, hemos utilizado el error estándar (Carrasco, 1989). Para el estudio del nivel de significación (P), hemos aplicado el **test t de Student para datos apareados**, tomando como criterio de significación estadística un valor de P igual o menor que 0.05 (Pardell y cols., 1986; Martín y Luna del Castillo, 1994).

5. Método experimental

El **dispositivo experimental** se esquematiza en la Fig. 3. En este diagrama se pueden diferenciar los sistemas para el mantenimiento funcional del tejido y el desarrollo de los experimentos, como son: los de perfusión y calentamiento, el microelectrodo, el sistema electrónico de registro, los sistemas de monitorización con osciloscopio y audio, y el sistema de videograbación, así como los componentes para análisis y reproducción.

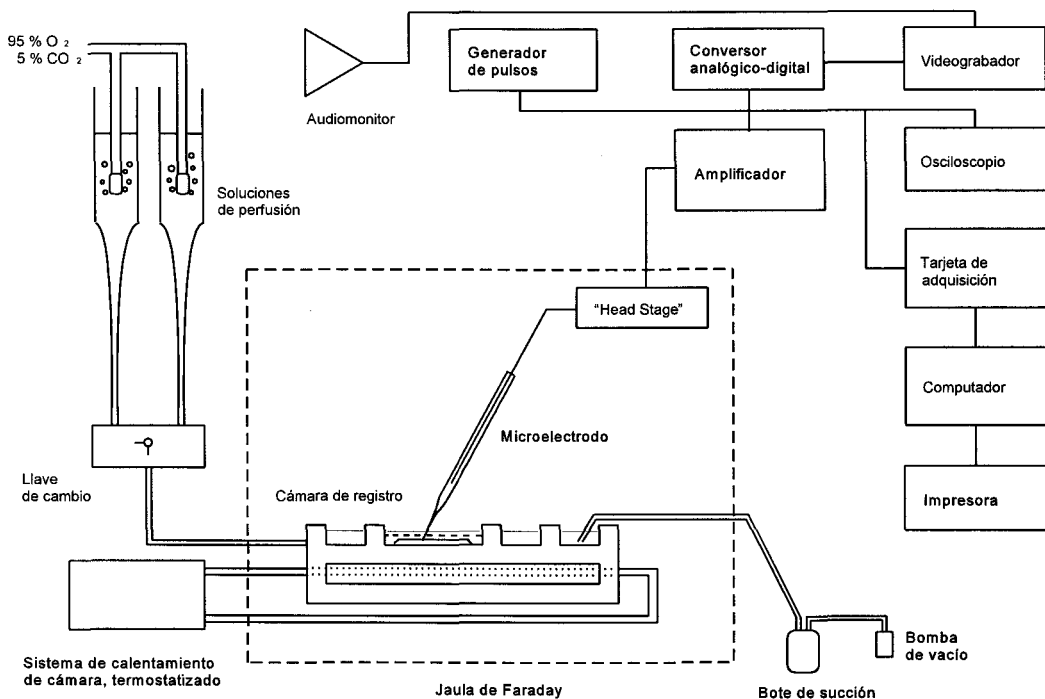


Fig. 3. Diagrama del dispositivo experimental utilizado para el registro intracelular del tejido adiposo blanco del epidídimo de rata.

Una vez calentada la cámara de registro, se deposita en el compartimento central de la misma un trozo de la porción distal del tejido adiposo del epidídimo, de aproximadamente unos 0.5 cm^2 y 0.5 mm de espesor, perfundiéndolo con la solución estándar o con una de las soluciones de composición modificada, gaseadas previamente con carbógeno y mantenidas entre 34 y $36 \text{ }^\circ\text{C}$. El flujo se regula entre 1.5 y 2 ml/min .

El filamento de plata clorurada conectado al seguidor de voltaje en el "Head Stage" se introduce en la micropipeta rellena con acetato potásico 3M . A todos los microelectrodos se les mide la resistencia, con estímulos de 0.2 nA , desechando todos aquellos que presentan valores de la misma fuera del rango comprendido entre 55 y $65 \text{ M}\Omega$.

Bajo observación microscópica y transiluminación se hace una primera aproximación del microelectrodo al tejido adiposo, manejando los tornillos macro y micrométrico del micromanipulador mecánico, según las tres direcciones del espacio. Posteriormente se cierra la jaula de Faraday y desde el exterior se hace una aproximación con resolución de un micrómetro de avance, utilizando el micromanipulador de control hidráulico a distancia acoplado al micromanipulador mecánico.

Una vez introducido el microelectrodo en la solución de perfusión, se cierra el circuito constituido por el amplificador, el microelectrodo, la propia solución y el electrodo indiferente incluido en el baño. A continuación se hace pasar, mediante el amplificador, pulsos de corriente de 0.2 nA y 400 ms de duración, obteniéndose una respuesta de voltaje propia de un circuito RC en paralelo, debida a las características de resistencia al flujo iónico y de capacidad generadas en la interfase micropipeta-solución de perfusión. Se procede a la compensación de la resistencia y la capacitancia del microelectrodo, de tal manera que cualquier cambio posterior en la resistencia se deba al contacto del

electrodo con el tejido. Cuando se produce una brusca caída de potencial se considera que el microelectrodo ha penetrado en el interior celular. Paralelamente se controla con el audiomonitor esos cambios bruscos en el potencial. Tras un período de espera de unos 5 minutos, se determina el valor del potencial de membrana de la célula.

A continuación se realizan las pruebas experimentales necesarias para el estudio de las propiedades eléctricas pasivas y activas del tejido adiposo blanco, según protocolo experimental. Posteriormente se procede al almacenamiento videomagnético de los registros y a su análisis, mediante el procesador de ondas asociado al osciloscopio y el programa Sigma Plot. La reproducción de los registros de mayor interés se lleva a cabo con la tarjeta de adquisición y las aplicaciones informáticas Acquirea, Read y Origin, en el computador PC.

RESULTADOS

1. Características eléctricas del adipocito blanco

Mediante técnica de registro intracelular con fijación de corriente hemos estudiado las características eléctricas del adipocito blanco. Los resultados que presentamos se han obtenido de una muestra de 142 células, que mantuvieron estables sus propiedades eléctricas, pasivas y activas, al menos durante 20 minutos. Aunque algunos registros se prolongaron durante casi dos horas, el promedio estuvo entre 30 y 45 minutos.

1. 1. Características eléctricas pasivas

En la Tabla II se relacionan los valores medios (m) y la desviación estándar (d.e.) del potencial de membrana, resistencias de entrada y específica, constante de tiempo, capacidad eléctrica y diámetro del adipocito blanco.

El potencial de membrana (V_m) se determina midiendo la caída de potencial, registrado 5 minutos después de haber conseguido la penetración de la célula con el microelectrodo. El valor promedio del V_m es de -32.5 mV. Cuando se extrae el microelectrodo al final de los experimentos, la cuantía del salto de voltaje registrado coincide con el valor del V_m medido al inicio.

La resistencia de entrada se calcula aplicando la ley de Ohm, $R = \Delta V / \Delta I$, a los valores máximos de voltaje obtenidos con la inyección de pulsos hiperpolarizantes de corriente de entre -0.1 y -1.0 nA de intensidad. En nuestros experimentos la resistencia de entrada alcanza un valor promedio de $266.7 \text{ M}\Omega$.

Tabla II
Características eléctricas pasivas del adipocito blanco
(m \pm d.e.)

<i>Potencial de membrana, Vm (n = 142)</i>	$-32.5 \pm 11.4 \text{ mV}$
<i>Resistencia de entrada, R (n = 142)</i>	$266.7 \pm 146.0 \text{ M}\Omega$
<i>Constante de tiempo, τ (n = 64)</i>	$52.2 \pm 24.0 \text{ ms}$
<i>Capacidad de membrana, Cm (n = 64)</i>	$214.9 \pm 9.4 \text{ pF}$
<i>Diámetro celular promedio</i>	$82 \text{ }\mu\text{m}$
<i>Resistencia específica promedio</i>	$56.4 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$

Aplicando la fórmula $V_m = V \cdot (1 - e^{-t/\tau}) = I \cdot R \cdot (1 - e^{-t/\tau})$, en la que haciendo $t = \tau$, se cumple $V_m = 0.632 \cdot V$, y midiendo el tiempo que tarda el cambio de potencial producido por un estímulo hiperpolarizante en alcanzar el 63.2 % de su valor máximo, se determina la constante de tiempo. Con este procedimiento, el valor medio de la constante de tiempo en nuestros experimentos es 52.2 ms .

Conociendo el valor de τ y R, hemos calculado la capacidad eléctrica de la membrana en cada adipocito utilizando la expresión $\tau = R \cdot C$. La capacitancia media de estas células es de 214.9 pF. En fibras musculares se admite la equivalencia de $1 \mu\text{F} / \text{cm}^2$ (Hille, 1992). Si asumimos esta relación para el tejido adiposo, el diámetro celular estimado es de 82 μm . Con este dato y el de la resistencia de entrada hemos calculado el valor de la resistencia específica, que se sitúa en $56.4 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$.

2. Estudio de las respuestas de voltaje del adipocito a estímulos despolarizantes e hiperpolarizantes

Para explorar la existencia de fenómenos eléctricos activos en el adipocito blanco hemos estudiado sus respuestas de voltaje a estímulos cuadrados de corriente, positivos y negativos, de 0.1 a 1.0 nA de amplitud y 400 ms de duración.

2. 1. Características de las respuestas de voltaje

Cuando estimulamos con pulsos positivos de corriente, el adipocito responde con despolarizaciones que se mantienen mientras dura la aplicación del estímulo, repolarizándose posteriormente al finalizar éste (Fig. 4).

La amplitud y el curso temporal de estas despolarizaciones dependen de la intensidad del estímulo. A medida que incrementamos la cuantía del pulso aumenta la amplitud de la respuesta despolarizante, alcanzándose más

rápidamente su valor máximo. Con pulsos de baja intensidad, la célula mantiene su nivel máximo de despolarización mientras que dura el estímulo. Con estímulos más intensos, la célula, una vez ha alcanzado el pico máximo de despolarización, se repolariza parcialmente, estabilizando su potencial a un valor que mantiene hasta que se repolariza totalmente, recuperando su potencial de reposo (V_m) cuando desaparece el estímulo.

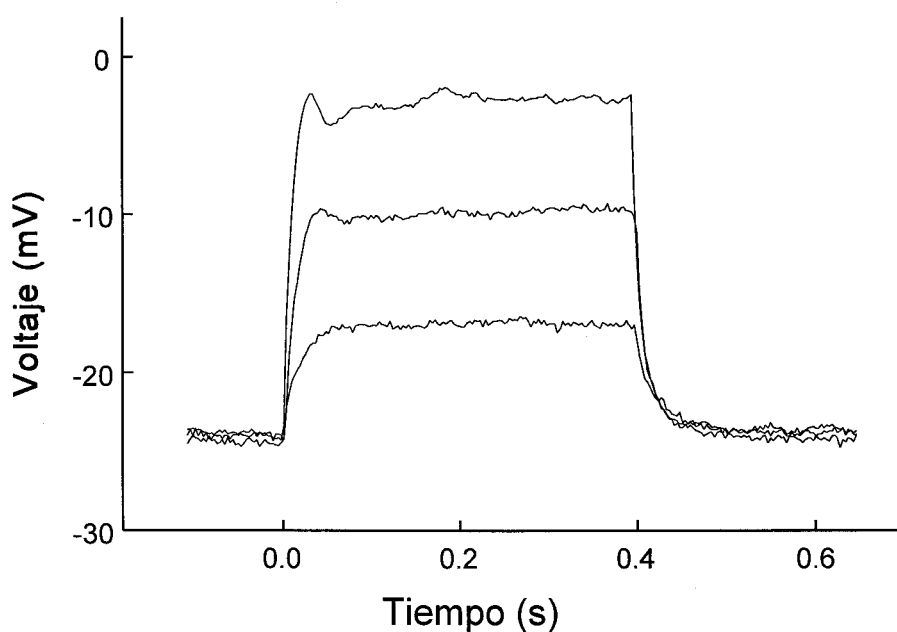


Fig. 4. Respuestas de voltaje a estímulos cuadrados de corriente de +0.1, +0.3 y +0.5 nA, en un adipocito blanco con un $V_m = -24$ mV.

En un 26.9% de las células estudiadas ($n = 93$), una vez finalizado el pulso despolarizante, aparece una posthiperpolarización (Fig. 5).

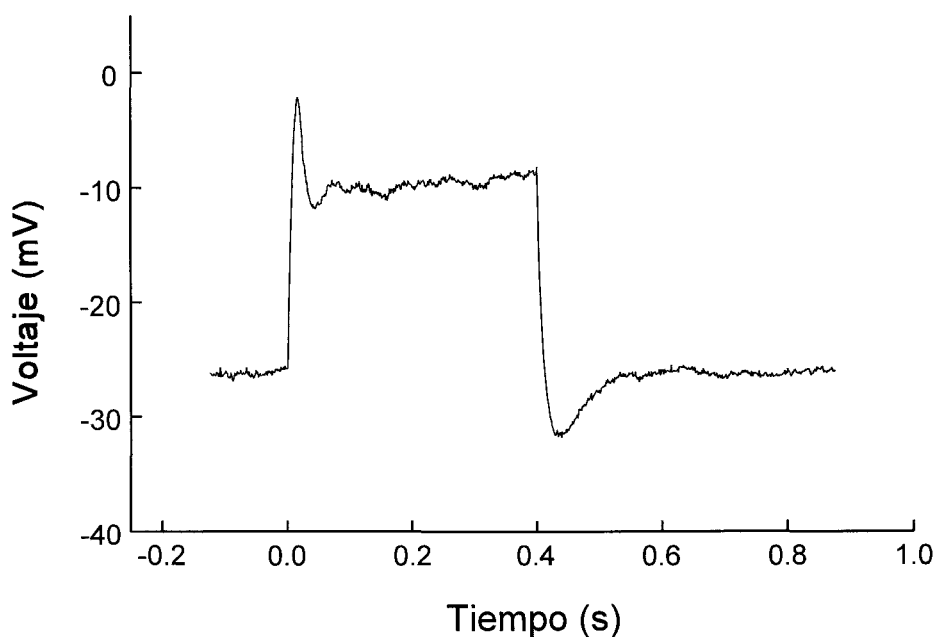


Fig. 5. *Respuesta de voltaje a un estímulo de +0.55 nA. Registro de una célula con $V_m = -26$ mV.*

Cuando estimulamos con pulsos negativos de corriente, el adipocito responde con hiperpolarizaciones que se mantienen mientras dura el estímulo. La amplitud y el curso temporal de estas hiperpolarizaciones dependen de la intensidad del estímulo. A medida que incrementamos la cuantía del pulso aumenta la amplitud de la respuesta hiperpolarizante, alcanzándose más

rápida su valor máximo. Con pulsos de baja intensidad la célula mantiene este nivel de hiperpolarización mientras persiste el estímulo. Con estímulos más intensos el adipocito, una vez ha alcanzado el valor máximo de hiperpolarización, reduce algo su potencial, hasta que finalizado el pulso inicia el proceso de recuperación para restablecer su V_m (Fig. 6).

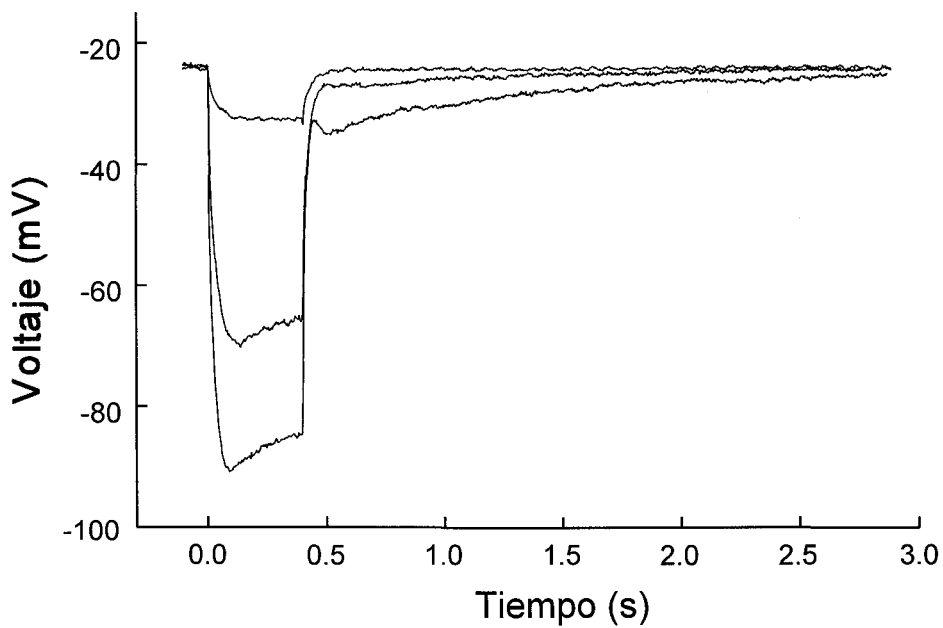


Fig. 6. Respuestas de voltaje a estímulos cuadrados de corriente de -0.1 , -0.6 y -1.0 nA, en un adipocito blanco con $V_m = -24$ mV.

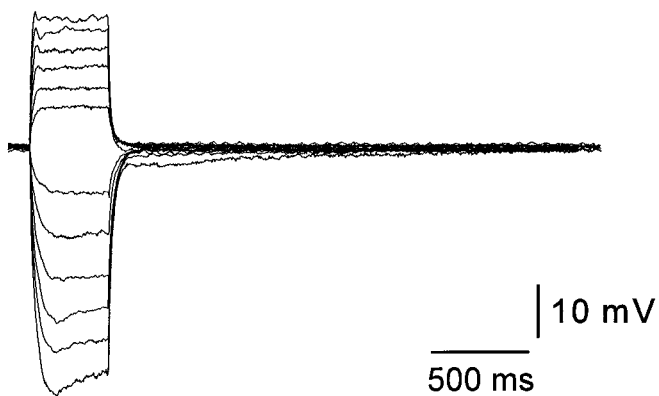
Finalizado el pulso hiperpolarizante, la cinética de recuperación presenta dos fases bien diferenciadas. Una primera fase rápida y una segunda lenta. La fase lenta de la recuperación se hace más evidente a medida que aumentamos la intensidad del estímulo, llegando incluso a invertirse el sentido de la recuperación con estímulos de elevada intensidad. Esto determina que el tiempo que tarda la célula en restablecer su V_m se prolongue a medida que aumentamos la intensidad del estímulo.

2. 2. El adipocito rectifica la respuesta de voltaje pasiva

Si a partir de los valores máximos de voltaje obtenidos con pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes construimos la curva I/V (Fig. 7, A y B) se comprueba que con pulsos hiperpolarizantes la relación I/V es de tipo lineal, propia de un circuito RC en paralelo. Por el contrario, con pulsos positivos de corriente superiores a 0.1 nA, la relación I/V se aleja progresivamente de la línea recta que caracteriza la respuesta pasiva. Estos datos demuestran que el adipocito, durante la aplicación del estímulo, responde con fenómenos eléctricos pasivos a pulsos hiperpolarizantes, pero rectifica la respuesta eléctrica pasiva cuando se estimula con pulsos despolarizantes de cierta intensidad.

Para determinar si el adipocito rectifica también la respuesta de voltaje pasiva tras la aplicación de pulsos hiperpolarizantes, hemos superpuesto a la curva de recuperación obtenida experimentalmente, la teórica debida a fenómenos eléctricos pasivos, comprobando que el adipocito, finalizado el pulso hiperpolarizante, rectifica durante la fase lenta de la recuperación la respuesta de voltaje (Fig. 8).

A



B

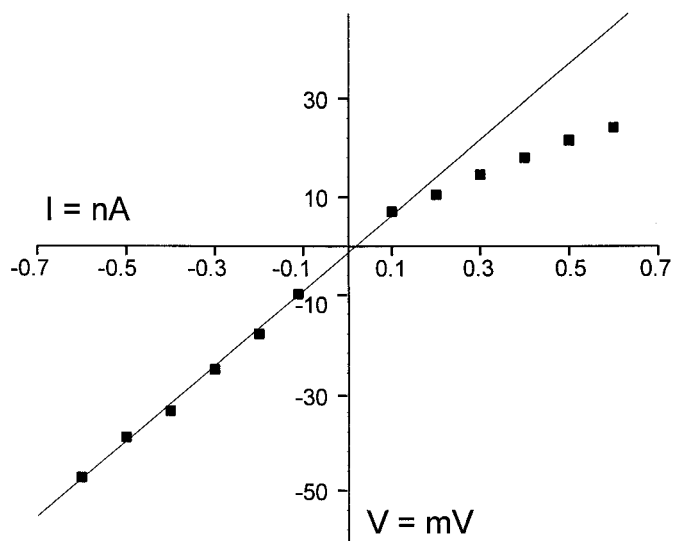


Fig. 7. Curva I/V (B), construida a partir de los picos máximos del cambio de voltaje (A) obtenidos con estímulos, positivos y negativos, de 0.1 a 0.6 nA. Los registros corresponden a una célula con $V_m = -24$ mV.

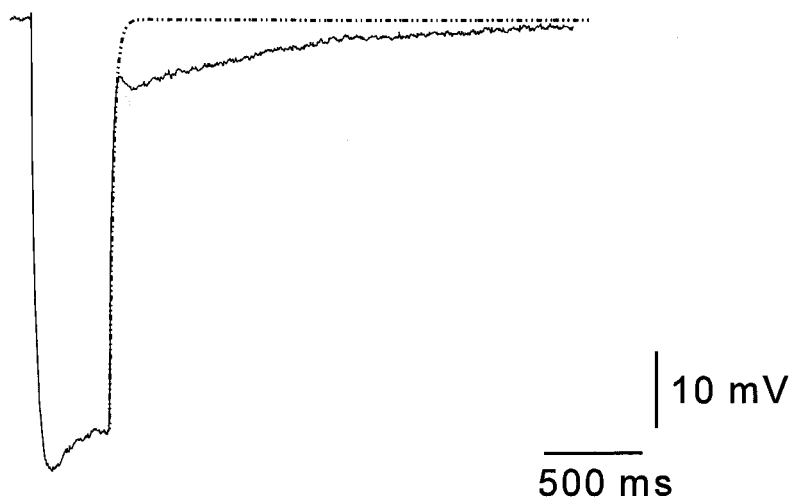


Fig. 8. *Respuesta de voltaje de un adipocito a un estímulo de -0.9 nA, a la que se le ha superpuesto la curva teórica de recuperación pasiva. Célula con un $V_m = -24$ mV.*

2. 3. La rectificación de la respuesta de voltaje es dependiente de voltaje y de tiempo

Cuando previo a la estimulación con pulsos de corriente modificamos el V_m del adipocito inyectándole un nivel de corriente continua positiva (DC+) o negativa (DC-), se modifican las características de sus respuestas de voltaje.

Con un DC+ (Fig. 9 A) la rectificación de la respuesta de voltaje a pulsos despolarizantes es menos manifiesta que cuando utilizamos un DC- (Fig. 9 B).

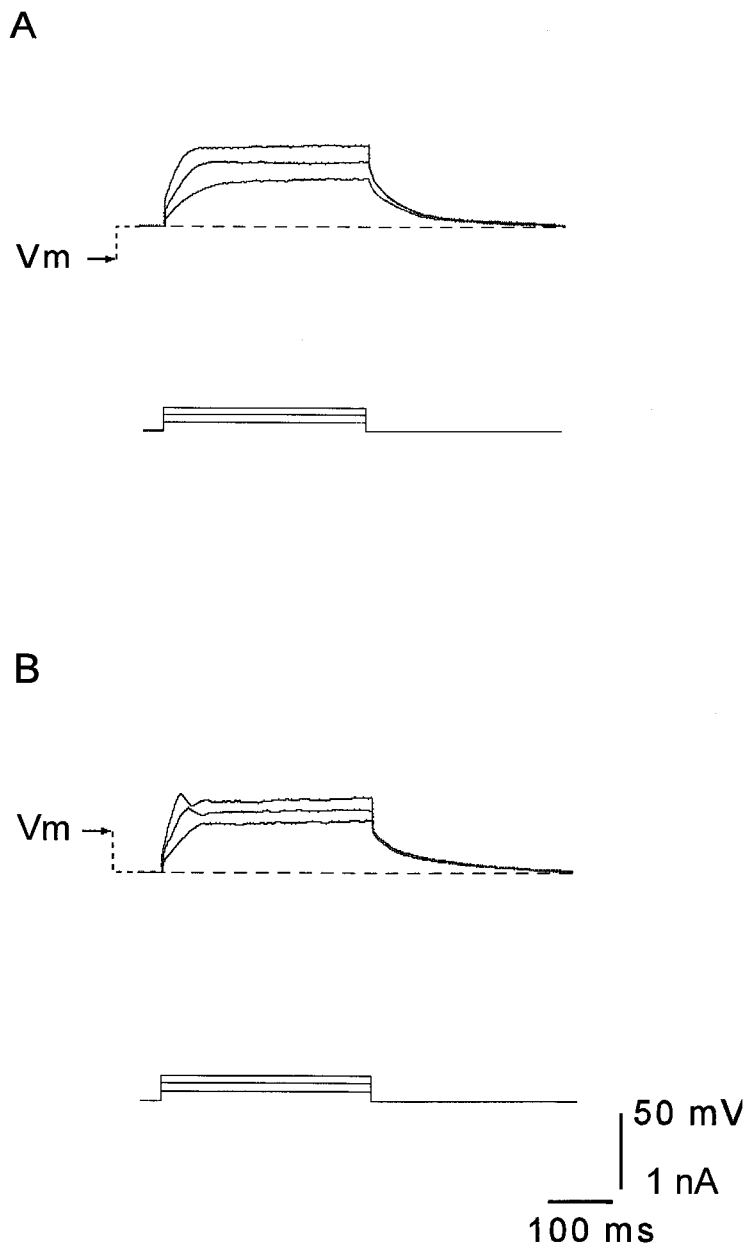


Fig. 9. Respuestas de voltaje provocadas en un adipocito por la inyección de pulsos cuadrados de corriente positiva tras la aplicación de un DC positivo (A) y negativo (B) de 20 mV. Los registros pertenecen a una célula con un $V_m = -40$ mV.

Con pulsos hiperpolarizantes la rectificación de la recuperación aumenta cuando aplicamos un DC+ (Fig. 10 A) y es menos marcada con DC- (Fig. 10 B).

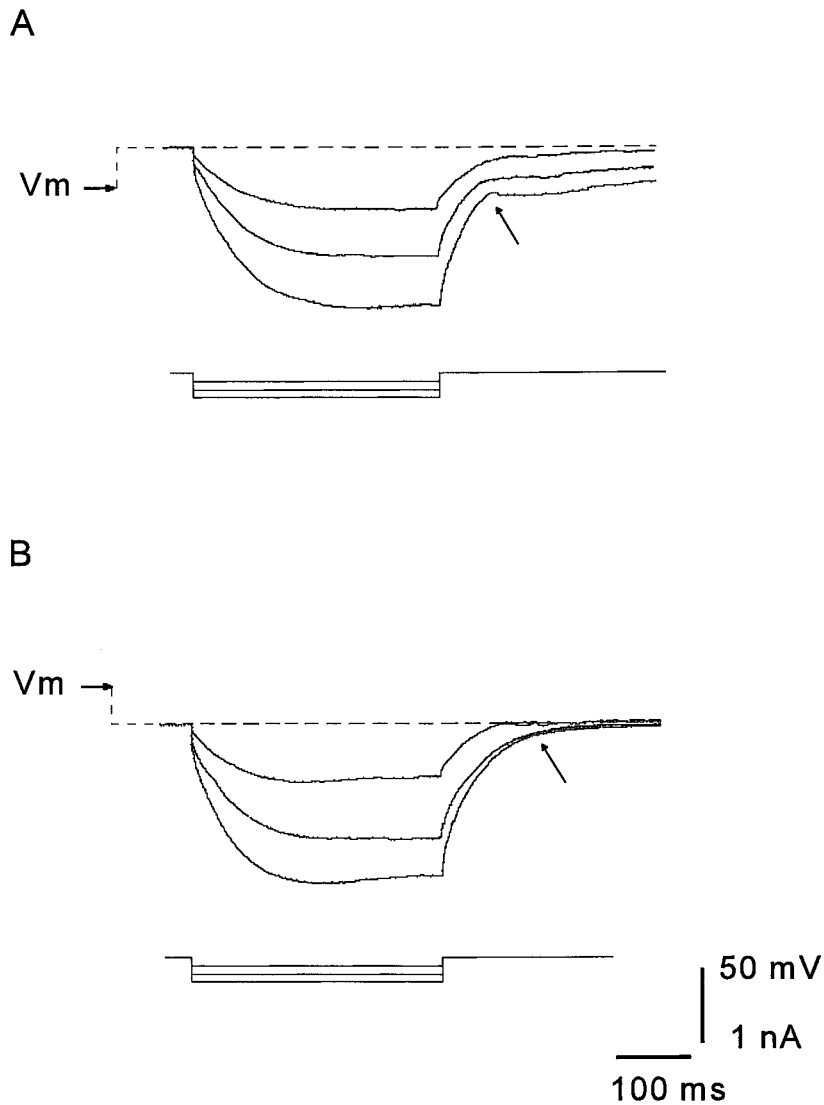


Fig. 10. Respuestas de voltaje provocadas en un adipocito por la inyección de pulsos cuadrados de corriente negativa tras la aplicación de un DC positivo (A) y negativo (B) de 20 mV. Los registros pertenecen a una célula con $V_m = -40$ mV.

La duración del pulso de corriente modifica también las características de la respuesta de voltaje.

Cuando aplicamos un pulso de corriente hiperpolarizante de duración variable, la amplitud de la rectificación de la recuperación aumenta a medida que prolongamos el tiempo de aplicación del estímulo (Fig. 11).

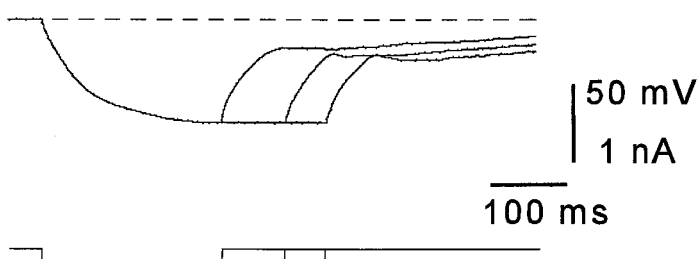


Fig. 11. *Respuestas de voltaje obtenidas en un adipocito cuando se aplican pulsos cuadrados de corriente negativa de duración variable. El registro pertenece a una célula con $V_m = -44$ mV.*

2. 4. Durante la rectificación tras pulsos hiperpolarizantes se producen modificaciones de la resistencia de la membrana del adipocito

Cuando durante la fase lenta de la recuperación obtenida con un pulso de corriente de -0.4 nA de amplitud y 400 ms de duración, aplicamos un tren de pulsos de -0.2 nA de amplitud, de 200 ms de duración y con una separación entre pulsos de 300 ms, se registran una serie de respuestas de voltaje cuya amplitud va incrementándose progresivamente a medida que aumenta el tiempo de recuperación (Fig. 12). Este aumento en el cambio de voltaje puede deberse

al incremento de las resistencias durante el tiempo que dura la recuperación como consecuencia de una disminución progresiva de las conductancias de la membrana del adipocito.

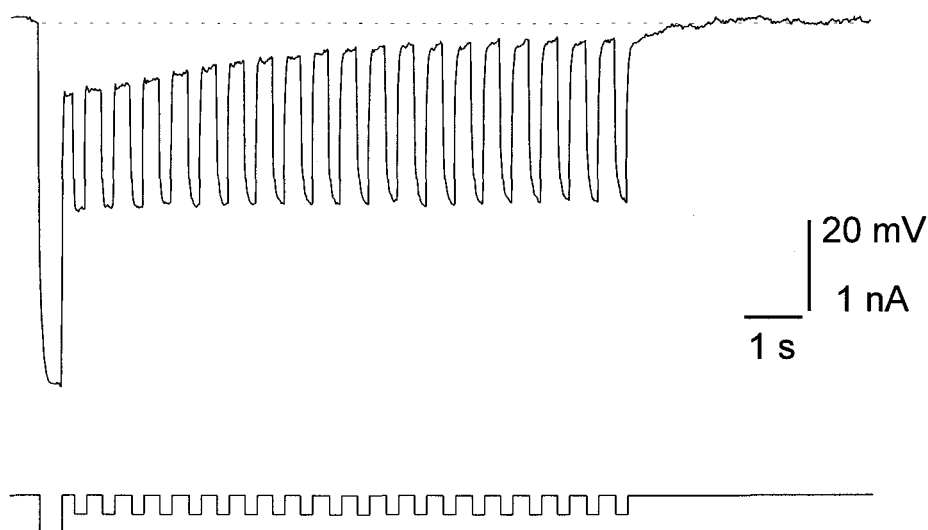


Fig. 12. *Respuesta de voltaje de un adipocito, con $V_m = -20$ mV, a un tren de 20 pulsos de -0.2 nA de intensidad, 200 ms de duración y separación entre pulsos de 300 ms, durante la fase lenta de la recuperación provocada tras la aplicación de un pulso de -0.4 nA y 400 ms de duración.*

De todo lo anterior puede concluirse que la rectificación de la respuesta eléctrica del adipocito durante la aplicación de pulsos despolarizantes y tras la estimulación con pulsos hiperpolarizantes se debe a fenómenos activos, pues se producen cambios en la resistencia eléctrica de la membrana como consecuencia de modificaciones en las conductancias iónicas, y la amplitud de los mismos depende del potencial que alcanza la célula en respuesta a la aplicación del estímulo. La duración del pulso de estimulación sólo afecta a la respuesta en hiperpolarización.

2. 5. Estudio de las respuestas eléctricas activas

El análisis de la curva I/V de la Fig. 7 nos da información puntual sólo de la magnitud de los fenómenos activos de membrana que ocurren en el momento en que se alcanza el pico máximo de voltaje, pero no obtenemos datos sobre el curso temporal de éstos.

Para estudiar las características de la respuesta eléctrica activa que se produce durante la aplicación de estímulos despolarizantes hemos superpuesto las respuestas obtenidas durante la aplicación de pulsos negativos y positivos de la misma amplitud (Fig. 13). Estos datos nos permiten deducir que el segmento de la respuesta despolarizante que coincide con la hiperpolarizante se produce

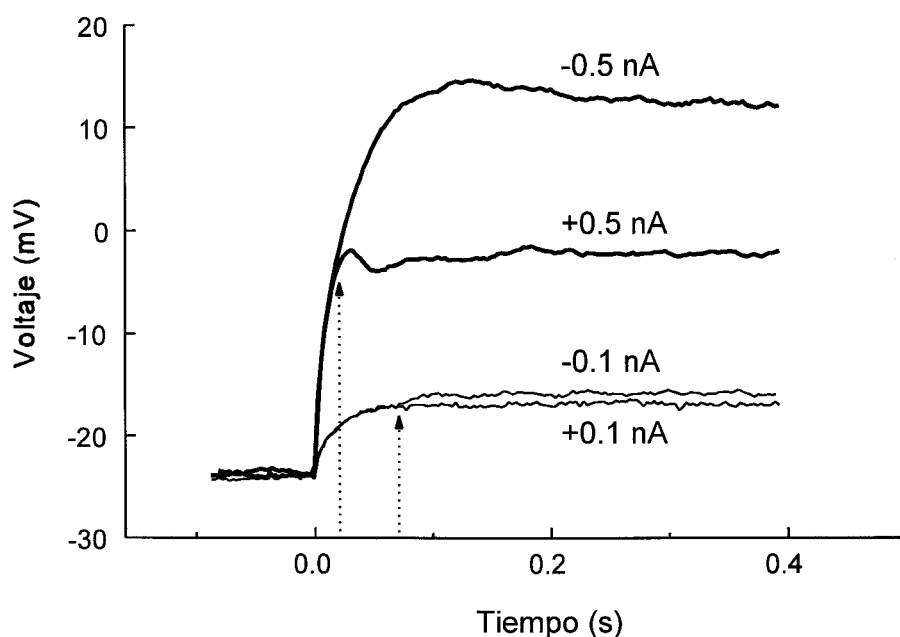


Fig. 13. Superposición de las respuestas de voltaje a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes de 0.1 y 0.5 nA, en un adipocito con $V_m = -24$ mV, mediante inversión de la respuesta hiperpolarizante.

como consecuencia de procesos pasivos de membrana y el momento en que los perfiles de las curvas se separan indica el punto en que los fenómenos activos modifican la respuesta pasiva. Este análisis nos permite conocer el tiempo y el potencial en que empiezan a registrarse los fenómenos eléctricos activos. La diferencia entre ambas respuestas es indicativa de la amplitud de los fenómenos eléctricos activos. En la célula representada en la Fig. 13, el voltaje y el tiempo son -16.9 mV y 0.069 s, para el estímulo despolarizante de 0.1 nA, y -3.4 mV y 0.016 s, para el estímulo de 0.5 nA.

Si representamos la diferencia entre las respuestas de voltaje en hiperpolarización y en despolarización, con respecto al tiempo, obtendremos información sobre el curso temporal de los fenómenos activos (Fig. 14).

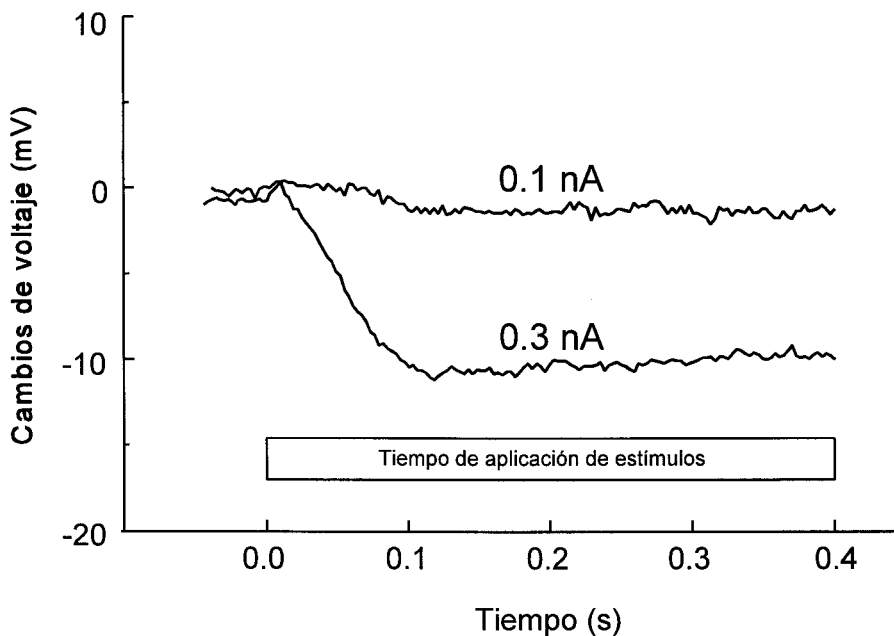


Fig. 14. *Curso temporal calculado de los fenómenos eléctricos activos desencadenados por estímulos despolarizantes de 0.1 y 0.3 nA, en la misma célula de la figura anterior.*

De estos datos puede concluirse que el tiempo y el voltaje en que se detectan los fenómenos eléctricos activos y su amplitud dependen de la intensidad del pulso despolarizante.

Para caracterizar los fenómenos eléctricos activos que participan en el proceso de recuperación tras la aplicación de pulsos hiperpolarizantes, hemos representado de nuevo la curva teórica de la respuesta pasiva, superponiéndola a la de los cambios de voltaje registrados experimentalmente durante la recuperación (Fig. 15).

El análisis de las semejanzas y diferencias entre la curva experimental y la teórica nos permite determinar el tiempo y el nivel de voltaje en el que los fenómenos eléctricos activos empiezan a registrarse. En la célula representada en la Fig. 15, el voltaje y el tiempo son -28.4 mV y 0.477 s, respectivamente, para el estímulo hiperpolarizante de -0.6 nA, y -31.8 mV y 0.449 s, para el estímulo de -0.9 nA. De estos datos puede concluirse que los dos parámetros son dependientes de la amplitud del pulso.

El estudio del curso temporal de los fenómenos eléctricos activos tras la aplicación de pulsos hiperpolarizantes puede hacerse analizando la fase lenta de la recuperación, pues esta fase se produce como consecuencia de la puesta en funcionamiento de los fenómenos eléctricos activos. En esta fase de vuelta lenta al potencial de membrana (VLVm) hemos analizado su amplitud y su duración (Fig. 15).

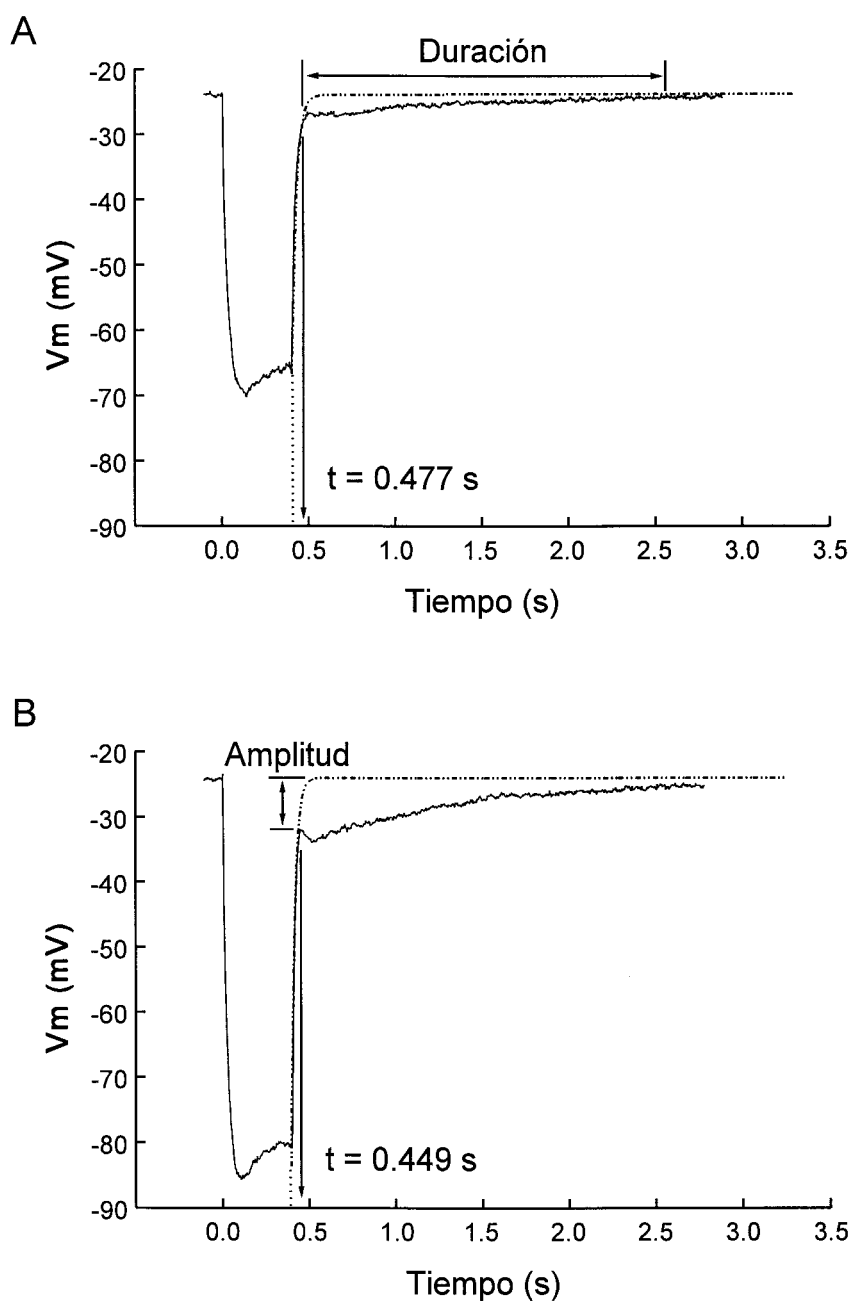


Fig. 15. Respuestas de voltaje de un adipocito a estímulos de -0.6 nA (A) y -0.9 nA (B), a las que se les ha superpuesto las curvas teóricas de recuperación pasiva. Ambos registros pertenecen a una célula con $V_m = -24$ mV. En ellos se indican la amplitud (B) y la duración (A) de VLVm.

Para cuantificar su duración, aceptamos que VLVm se inicia en el momento en que se detecta, una vez finalizado el pulso hiperpolarizante, un punto de inflexión en la cinética de recuperación o una brusca modificación en su pendiente, y termina cuando la célula alcanza el nivel de su Vm. Su amplitud se determina cuantificando la diferencia entre el Vm y el potencial en el que se inicia VLVm. En la Fig. 15, la amplitud de VLVm es, respectivamente, de 4.4 mV para -0.6 nA y de 7.8 mV para -0.9 nA. La duración de VLVm en la respuesta al estímulo de -0.6 nA es de 2.1 s.

Dado que la amplitud y la duración de la VLVm dependen de la intensidad del estímulo y del Vm de cada célula, y que en todas las células estudiadas se alcanza un máximo en aquellos parámetros, a partir del cual un incremento del pulso no produce aumento de su amplitud y duración, en todas las células se determina el pulso mínimo de corriente hiperpolarizante necesario para desencadenar la aparición de un cambio máximo en la cinética de VLVm.

La Tabla III expresa los valores de estos parámetros obtenidos en 142 células.

Tabla III
Características
de la vuelta lenta al potencial de membrana, VLVm
($m \pm d.e.$, $n = 142$)

<i>Amplitud</i>	14.4 ± 9.1 mV
<i>Potencial de activación</i>	-43.9 ± 11.1 mV
<i>Duración</i>	8.4 ± 7.4 s

3. Bases iónicas de los fenómenos eléctricos activos

3. 1. Estudio de la participación del potasio

En el apartado anterior hemos puesto de manifiesto la existencia de fenómenos eléctricos activos en el adipocito blanco que modifican su respuesta pasiva a pulsos de corriente. Los fenómenos eléctricos activos tienden a acercar el potencial de la célula al potencial de equilibrio para el K^+ . En otros tejidos se han registrado respuestas eléctricas similares a la descrita como VLVm, y se ha demostrado que el ión K^+ participa en su génesis (Connors y Stevens, 1971; Zbics y Weight, 1985; Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988). Por ello hemos estudiado en primer lugar el posible papel de este ión en las manifestaciones eléctricas del TAB.

Todas las manipulaciones experimentales que modifican los gradientes químicos intra / extracelulares o la permeabilidad de la membrana del adipocito blanco al K^+ producen cambios en su respuesta eléctrica activa.

Cuando se reduce la concentración extracelular de K^+ ($[K^+]_e$) hasta 1.4 mM se producen cambios en el Vm caracterizados por una hiperpolarización de 11.6 ± 2.5 mV ($m \pm e.e.$, $n = 9$) de amplitud, lo que sugiere que este ión participa en el mantenimiento del gradiente eléctrico transcelular en condiciones basales. Para evitar el efecto que las modificaciones del Vm tienen sobre la respuesta eléctrica activa del adipocito, antes de proceder a su estimulación se restablece el Vm de inicio inyectando DC+.

El aumento del gradiente químico de K^+ produce además cambios en los procesos eléctricos activos de membrana, tanto a pulsos despolarizantes como a los hiperpolarizantes.

Los cambios registrados en la respuesta a pulsos despolarizantes (Fig.16) se caracterizan por una disminución en el nivel de despolarización del potencial transmembrana en el que empiezan a registrarse los fenómenos activos y un incremento en la intensidad de éstos, evidenciados por el aumento de amplitud de la fase de repolarización rápida y una fase de meseta más próxima al V_m . En esas condiciones experimentales, en algunas células se evidencia una posthiperpolarización. Estos cambios son reversibles, pues desaparecen cuando se perfunde de nuevo el tejido adiposo con solución estándar.

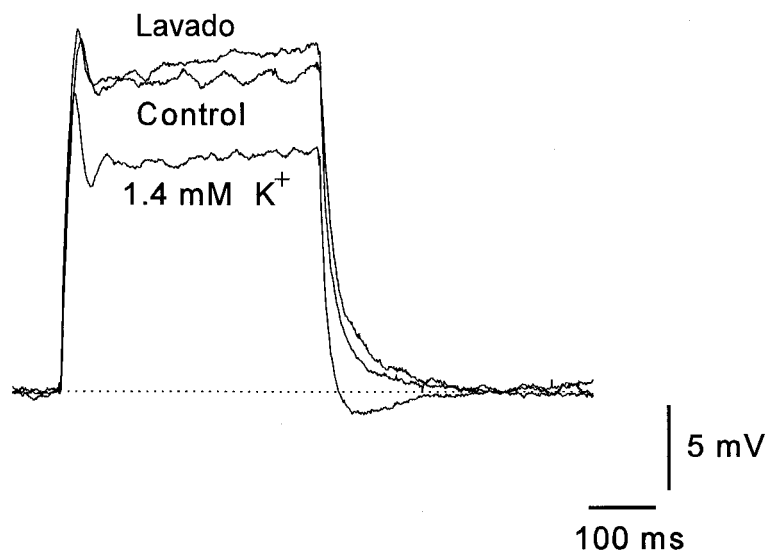


Fig. 16. Efecto de la disminución de la $[K^+]_e$ sobre la respuesta de voltaje a pulsos de +0.5 nA, en un adipocito con $V_m = -29$ mV.

Los cambios inducidos por la disminución de $[K^+]_e$ sobre la respuesta a pulsos hiperpolarizantes se observan en la fase de VLVm y se caracterizan por un aumento en la amplitud y duración de ésta (Fig. 17), como consecuencia de que los procesos activos de membrana se registran a un valor más elevado de hiperpolarización. En 8 células estudiadas en estas condiciones el nivel de voltaje transmembrana en que se detecta el inicio de VLVm ha aumentado un 83.7 ± 16 % ($m \pm e.e.$) con respecto a la situación de control y la duración de VLVm un 249 ± 129 % ($m \pm e.e.$) (Tabla V).

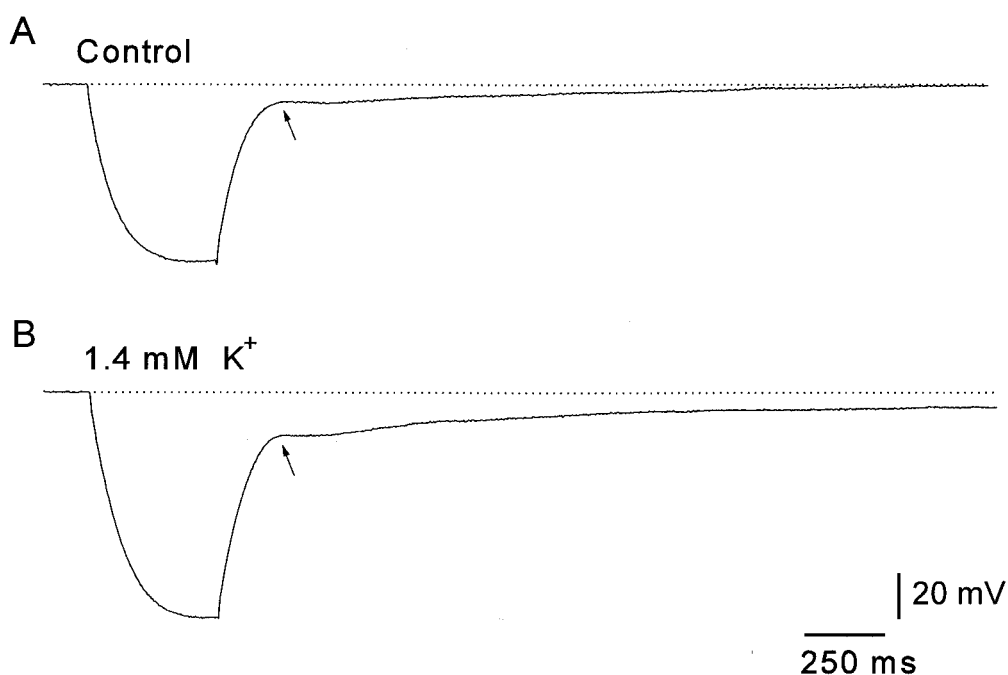


Fig. 17. Efecto de la disminución de la $[K^+]_e$ sobre la VLVm, en un adipocito con $V_m = -28$ mV, estimulado con pulsos de -0.5 nA.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los fenómenos eléctricos activos de membrana, provocados por estímulos eléctricos en el TAB, pueden estar producidos, entre otros, por cambios en las conductancias al ión K^+ . Para confirmar este hecho hemos diseñado una serie de experimentos utilizando bloqueantes de canales de K^+ añadidos a la solución de perfusión.

Los primeros bloqueantes utilizados, por poseer un amplio espectro de actuación sobre canales de K^+ , han sido el tetraetilamonio (TEA) y el cloruro de cesio (CICs).

Con el TEA 5 mM no hemos obtenido modificaciones en la respuesta eléctrica del adipocito (datos no mostrados) y con el CICs 5 mM se registra un ligero bloqueo en la amplitud y duración de VLVm, que es reversible (Fig. 18).

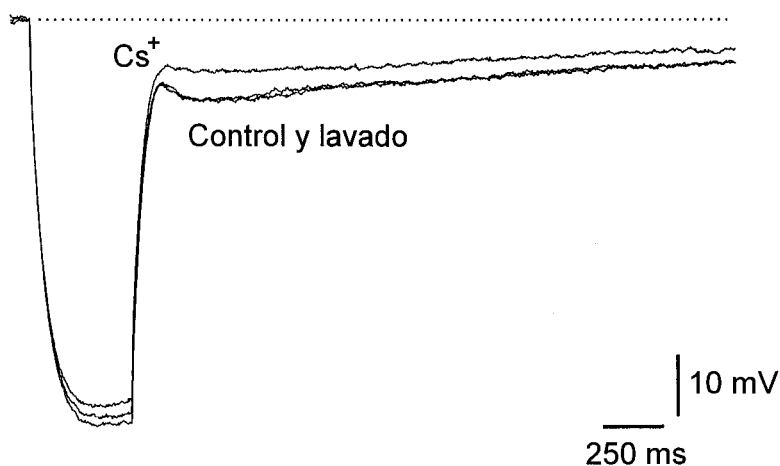


Fig. 18. Efecto de CICs 5 mM sobre la VLVm, en un adipocito blanco con $V_m = -23$ mV, estimulado con pulsos de -0.3 nA.

La ausencia de efectos derivados de la adición del TEA puede deberse a que esta sustancia, en nuestro modelo experimental, no alcance fácilmente la célula que se está explorando eléctricamente. El efecto poco marcado de la adición de Cs^+ puede deberse a esta misma circunstancia o al hecho de que este ión tiene una acción bloqueante más marcada cuando actúa en la porción intracelular de la membrana.

Cuando se añaden a la solución de perfusión cloruro de bario (Cl_2Ba) 2.5 mM, se producen modificaciones en la respuesta de la célula a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes.

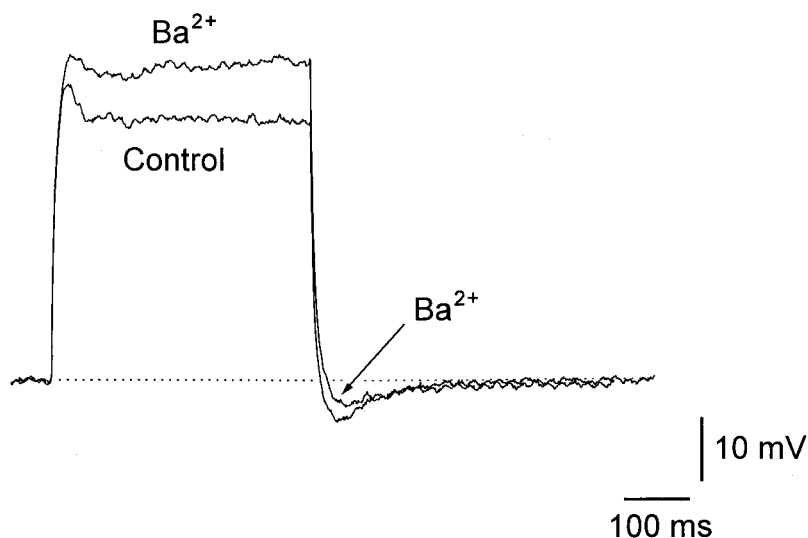


Fig. 19. Efecto de Cl_2Ba 2.5 mM sobre la respuesta de voltaje a pulsos de +0.8 nA, en un adipocito con $V_m = -26$ mV.

Durante la aplicación de pulsos positivos de corriente, la adición de Cl_2Ba 2.5 mM disminuye la amplitud de los procesos activos desencadenados por el estímulo eléctrico, pues aumenta el nivel de despolarización en que éstos se empiezan a registrar y se mantiene la célula más despolarizada durante el tiempo de aplicación del estímulo (Fig. 19). También en aquellas células que evidencian el fenómeno de la posthiperpolarización, ésta se reduce. Los valores numéricos del estudio estadístico de estos experimentos están recogidos en la Tabla IV.

Tabla IV
Efecto de Cl_2Ba 2.5 mM,
sobre la respuesta de voltaje de adipocitos a estímulos despolarizantes
 ($m \pm e.e.$, $n = 9$)

<i>Amplitud del cambio de voltaje</i>	<i>Control</i>	<i>Cl_2Ba</i>	<i>Efecto del Cl_2Ba en % del control</i>	<i>P</i>
<i>Inicio de rectificación</i>	$27.7 \pm 4.1 \text{ mV}$	$36.7 \pm 3.7 \text{ mV}$	141.9 ± 14.5	0.016
<i>Final de rectificación</i>	$25.8 \pm 4.1 \text{ mV}$	$35.5 \pm 3.9 \text{ mV}$	147.1 ± 13.4	0.027

Tras la aplicación de pulsos hiperpolarizantes se reduce la amplitud y duración de VLV_m (Fig. 20), pues sólo se registra la fase rápida de la recuperación correspondiente a la descarga de la capacidad de la membrana. Estas modificaciones son reversibles. Los adipocitos recuperan sus características eléctricas iniciales cuando se lava la preparación con solución estándar y se elimina el Cl_2Ba .

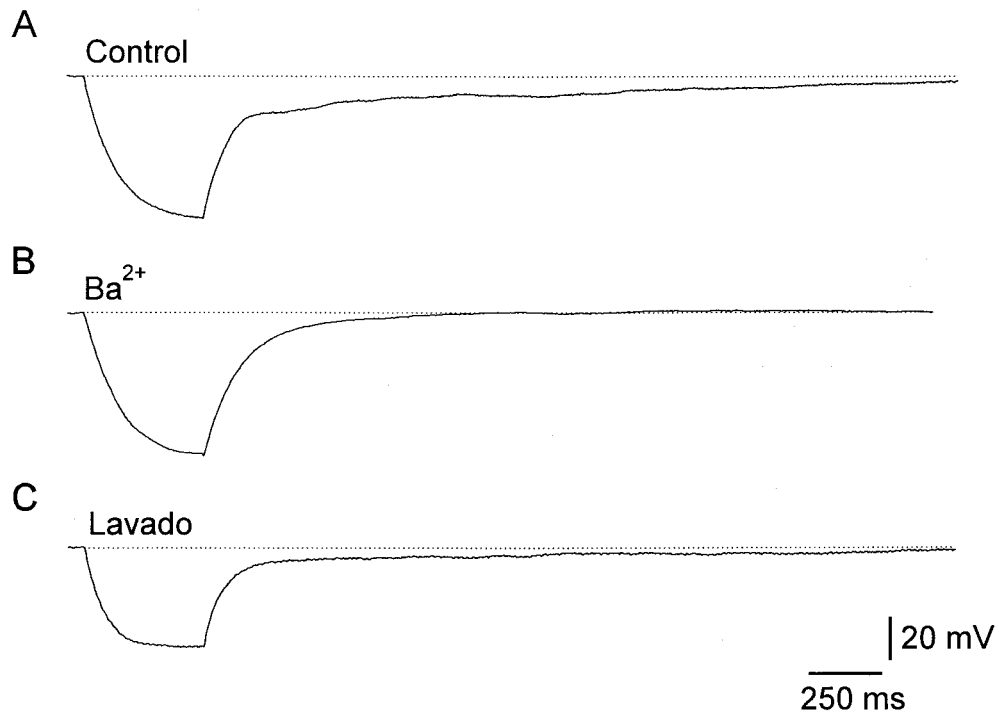


Fig. 20. Efecto de Cl_2Ba 2.5 mM sobre la VLVm, en una adipocito con $V_m = -40$ mV, estimulado con pulsos de -0.1 nA.

Puesto que el curso temporal de VLVm se asemeja al que presentan algunas células con corrientes transitorias tipo I_A (Alvarez de Toledo y López-Barneo, 1988) y dado que un bloqueante específico de esta corriente es la 4-aminopiridina (4AP), hemos explorado el efecto de este bloqueante en nuestra preparación.

La adición de 4AP 2.5 mM produce los mismos efectos sobre VLVm que el Cl_2Ba (Fig. 21), aunque no se detectan cambios significativos en la respuesta a pulsos despolarizantes. El efecto de la 4AP también es reversible.

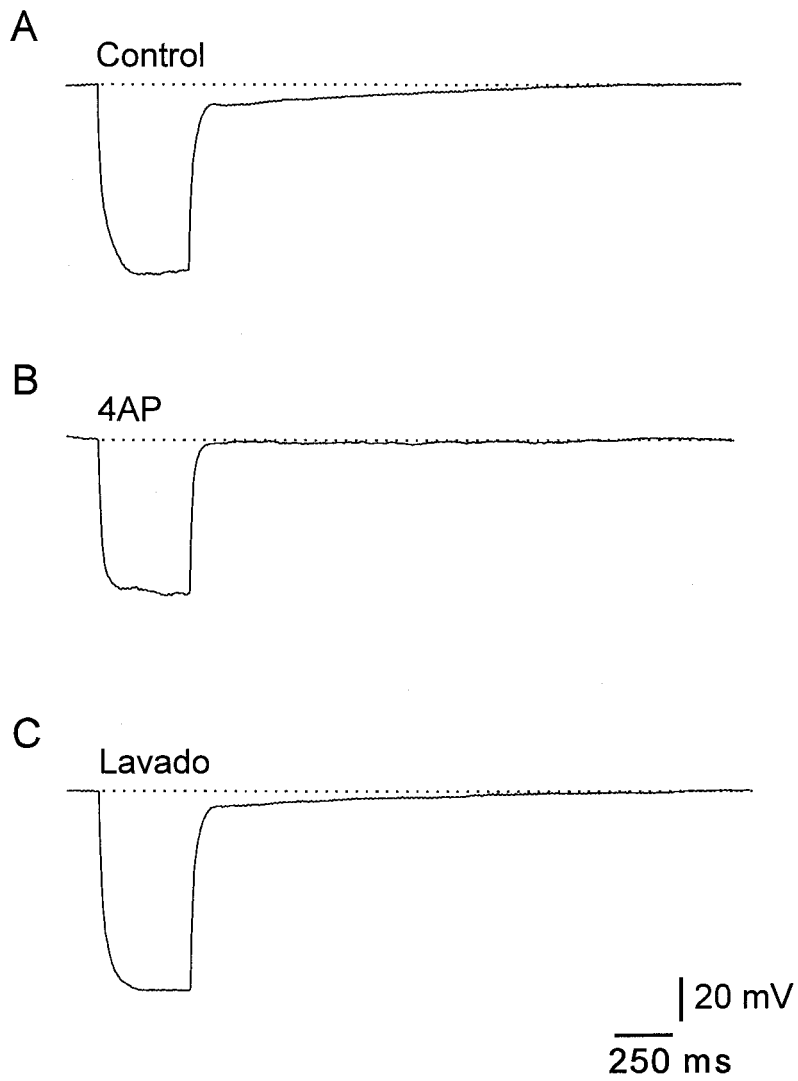


Fig. 21. Efecto de 4AP 2.5 mM sobre la VLVm, en un adipocito con $V_m = -33$ mV, estimulado con pulsos de -0.8 nA.

La Tabla V recoge los datos estadísticos de los experimentos descritos.

Tabla V
Efectos sobre la amplitud y la duración de VLVm,
de la disminución de $[K^+]_e$ y de bloqueantes de canales de K^+
(m \pm e.e.)

Control Sustancia Efecto en % del control P

**Perfusión con sol. externa
de bajo K^+ (1.4 mM)**

(n = 8)

<i>Amplitud</i>	7.0 \pm 1.2 mV	12.9 \pm 2.2 mV	183.7 \pm 16.0	0.002
<i>Duración</i>	3.2 \pm 1.1 s	7.5 \pm 2.9 s	349.0 \pm 129.2	0.232

CICs 5.0 mM

(n = 5)

<i>Amplitud</i>	10.5 \pm 2.4 mV	7.7 \pm 1.9 mV	73.4 \pm 5.8	0.025
<i>Duración</i>	9.9 \pm 2.0 s	9.5 \pm 3.8 s	87.5 \pm 29.4	0.893

Cl₂Ba 2.5 mM

(n = 9)

<i>Amplitud</i>	11.8 \pm 2.0 mV	4.9 \pm 4.1 mV	43.5 \pm 8.7	0.005
<i>Duración</i>	13.2 \pm 3.3 s	3.0 \pm 0.9 s	69.9 \pm 48.7	0.016

4AP 2.5 mM

(n = 12)

<i>Amplitud</i>	13.4 \pm 1.7 mV	7.4 \pm 1.1 mV	56.8 \pm 7.3	0.001
<i>Duración</i>	5.9 \pm 1.4 s	4.1 \pm 1.1 s	77.6 \pm 13.4	0.017

3. 2. Estudio de la participación del calcio

Conocemos la participación del K^+ en la actividad metabólica del TAB y acabamos de demostrar que este ión juega un papel importante en las manifestaciones eléctricas activas de los adipocitos blancos. Otro ión que en estas células tiene también importancia funcional en los procesos metabólicos es el Ca^{2+} . Por ello hemos explorado el efecto que sobre la respuesta eléctrica del adipocito producen las modificaciones y sustituciones de este ión y los bloqueantes de canales de Ca^{2+} .

Todas las manipulaciones experimentales que modifican los gradientes químicos extra / intracelulares o la permeabilidad de la membrana del adipocito blanco al Ca^{2+} inducen cambios en su respuesta eléctrica activa.

La perfusión del TAB con una solución sin Ca^{2+} y con Cl_2Co 2.4 mM reduce los procesos eléctricos activos que la membrana del adipocito genera durante la aplicación de pulsos despolarizantes o tras la aplicación de pulsos hiperpolarizantes. Estos cambios son reversibles, pues desaparecen al reconstruir la situación basal perfundiendo de nuevo con solución estándar.

En esta situación los fenómenos eléctricos activos inducidos por pulsos despolarizantes se registran a un nivel más alto de despolarización y la amplitud de aquéllos se reduce (Fig. 22).

También la VLV_m que se registra tras la estimulación con corrientes negativas se inicia a un menor nivel de hiperpolarización, disminuyen por tanto su amplitud, aunque no se detectan cambios significativos en su duración (Fig. 23).

Las Tablas VI y VII recogen la estadística de estos experimentos.

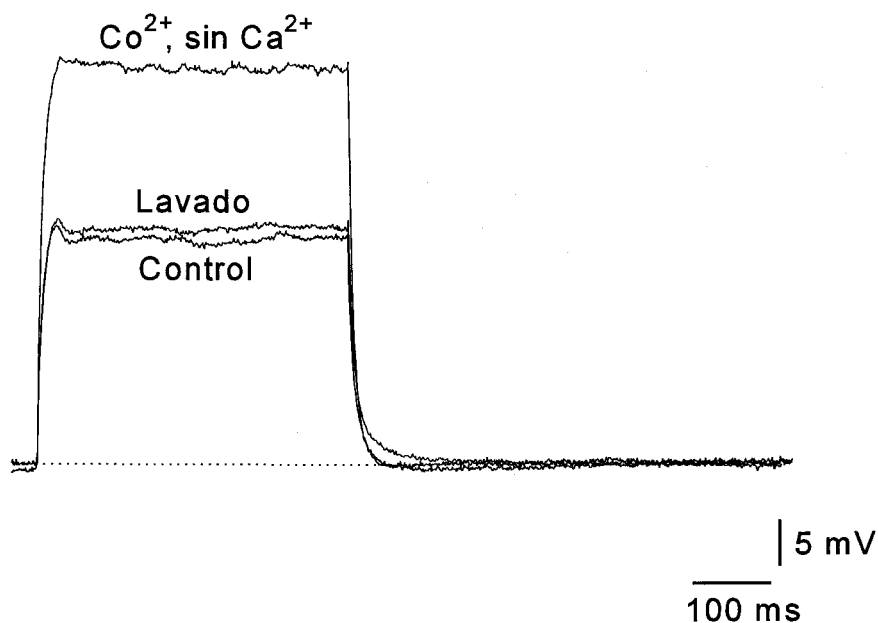


Fig. 22. Efecto de la perfusión con una solución sin Ca^{2+} que contiene Cl_2Co 2.4 mM sobre la respuesta de voltaje de un adipocito con $V_m = -24$ mV, estimulado con pulsos de +0.6 nA.

Tabla VI

Efecto de una solución **sin Ca^{2+}** y que contiene **Cl_2Co 2.4 mM**, sobre la respuesta de voltaje de adipocitos a pulsos despolarizantes ($m \pm e.e.$, $n = 4$)

Amplitud del cambio de voltaje	Control	Sol. Co^{2+} sin Ca^{2+}	Efecto sol. Co^{2+} sin Ca^{2+} en % del control	P
Inicio de rectificación	41.8 ± 7.5 mV	55.6 ± 6.1 mV	140.7 ± 17.0	0.062
Final de rectificación	45.5 ± 9.1 mV	61.8 ± 9.0 mV	143.7 ± 16.6	0.053

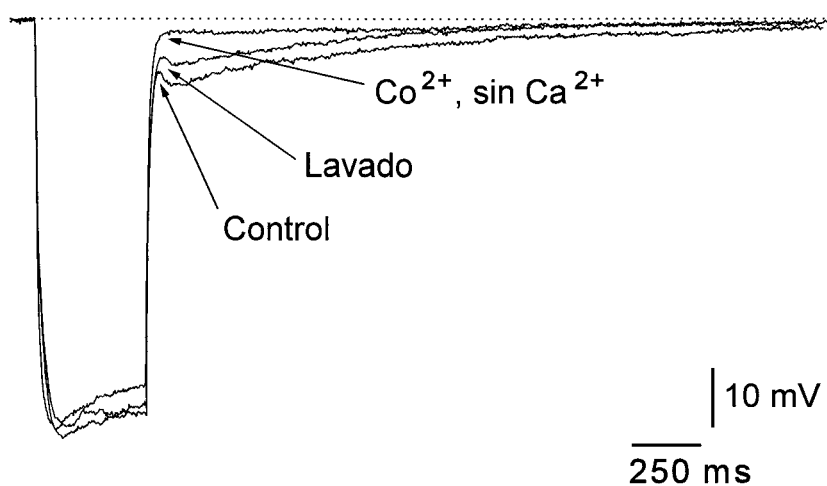


Fig. 23. Efecto de la perfusión con una solución sin Ca^{2+} que contiene Cl_2Co 2.4 mM sobre la $V_L V_m$, en un adipocito con $V_m = -24$ mV, estimulado con pulsos de -1.0 nA.

Tabla VII
*Efecto de una solución sin Ca²⁺, sin o con Co²⁺ 2.4 mM,
sobre la amplitud y la duración de la VLVm
(m ± e.e.)*

Control Sustancia Efecto en % del control P

Perfusión con
sol. externa **sin Ca²⁺**
(n = 8)

<i>Amplitud</i>	19.9 ± 3.7 mV	7.5 ± 1.1 mV	46.2 ± 10.8	0.011
<i>Duración</i>	8.6 ± 2.7 s	4.3 ± 1.2 s	80.8 ± 25.3	0.232

Perfusión con sol. externa
sin Ca²⁺ y con Cl₂Co 2.4 mM
(n = 6)

<i>Amplitud</i>	13.8 ± 2.6 mV	6.6 ± 1.5 mV	46.9 ± 5.4	0.002
<i>Duración</i>	5.3 ± 1.7 s	3.8 ± 1.1 s	89.0 ± 26.4	0.375

La adición de 4AP 2.5 mM a una preparación a la que se le ha disminuido la amplitud y duración de su VLVm perfundiéndola con una solución sin Ca²⁺ y con Cl₂Co 2.4 mM, reduce aún más el nivel de hiperpolarización en que se registra el inicio de VLVm y su amplitud (Fig. 24 B). El efecto de la 4AP es aditivo y reversible, pues desaparece cuando la eliminamos al restaurar la perfusión con la solución sin Ca²⁺ y que contiene Co²⁺ (Fig. 24 C).

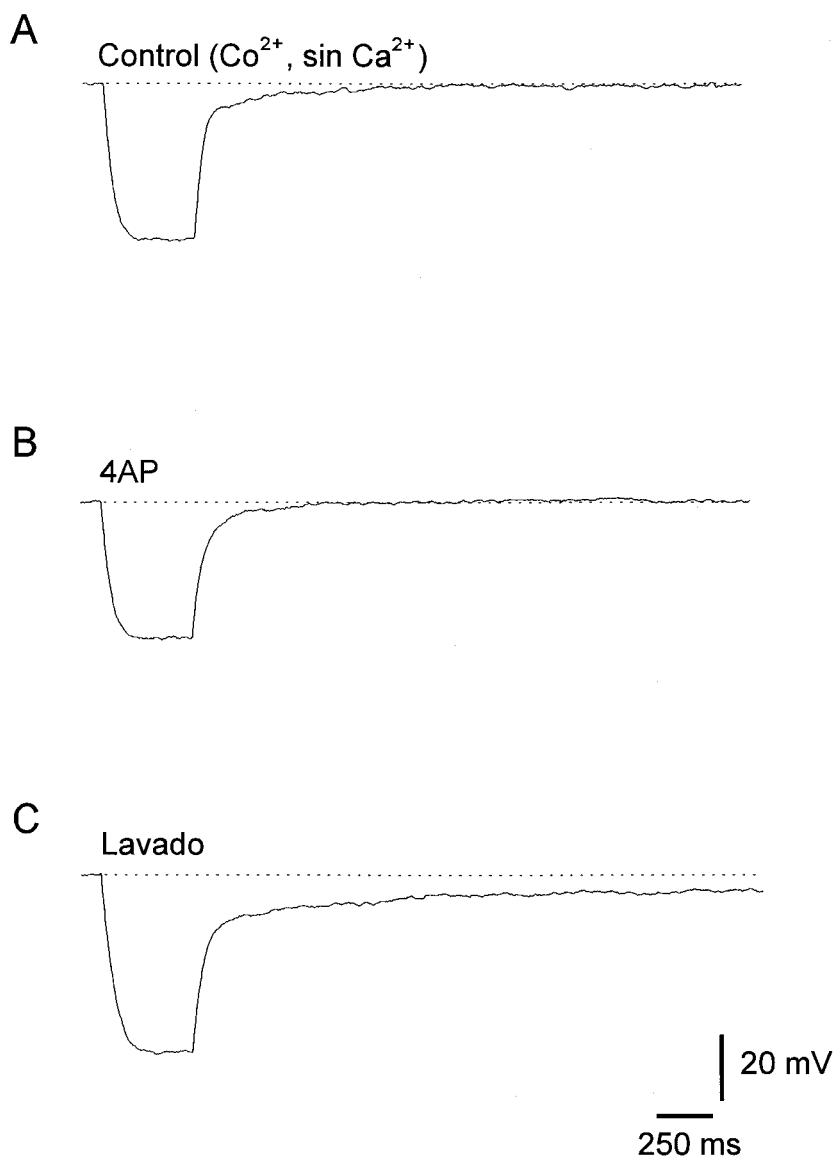


Fig. 24. Efecto de 4AP 2.5 mM sobre la $V_L V_m$ de un adipocito con $V_m = -30$ mV, perfundido con una solución sin Ca^{2+} y con Co^{2+} 2.4 mM, estimulado con pulsos de -0.3 nA. El registro C se ha obtenido lavando con una solución sin Ca^{2+} y con Co^{2+} .

4. Efecto de las hormonas, insulina, noradrenalina y péptido intestinal vasoactivo, sobre la actividad eléctrica del adipocito

De entre todas las hormonas que regulan la actividad del tejido adiposo, hemos seleccionado para su estudio la insulina, la noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

La insulina por ser la única hormona con un reconocido efecto lipogénico y con actividad antilipolítica; por influir en los flujos iónicos y en la distribución transmembrana del K^+ y del Ca^{2+} , y por su demostrado efecto sobre el V_m de los adipocitos.

La NA la hemos incluido en nuestro protocolo experimental por su acción lipolítica y por su efecto sobre el V_m en el TAB.

El VIP por su efecto lipolítico en el TAB, mediado por el AMPc al igual que la NA.

4. 1. Insulina

La adición de insulina porcina (2 UI/ml) o bovina (8.7 nM) al medio de perfusión determina, en nuestros experimentos, una hiperpolarización de 24.4 ± 4.1 mV ($m \pm e.e.$, $n = 15$) en los adipocitos y produce cambios en los procesos eléctricos activos de membrana desencadenados por pulsos hiperpolarizantes, sin modificar la respuesta a pulsos despolarizantes. Antes de estimular la célula, hemos restablecido su V_m inicial, aplicando DC+.

Con ambos tipos de insulina se comprueba un aumento en la amplitud y duración de la VLVm. El efecto de la insulina, que no se objetiva hasta pasados al menos diez minutos después de su aplicación, persiste incluso 30 minutos después de haber eliminado la insulina de la cámara de perfusión lavando la preparación con solución estándar (Fig. 25).

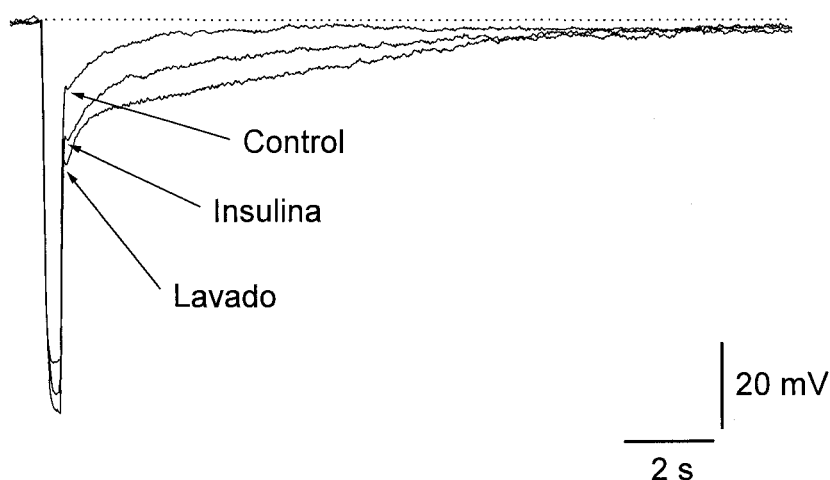


Fig. 25. Efecto de la insulina bovina 8.7 nM sobre la VLVm, en un adipocito con $V_m = -30$ mV, estimulado con pulsos de -0.3 nA.

También la insulina, a concentración 4.6 nM, no sólo restablece la amplitud y duración de la VLVm en células tratadas previamente con una solución de Cl_2Ba 2.4 mM, sino que incrementa estos parámetros después de eliminar el Cl_2Ba arrastrándolo con la solución de insulina (Fig. 26).

Los datos de estos experimentos están recogidos en la Tabla VIII.

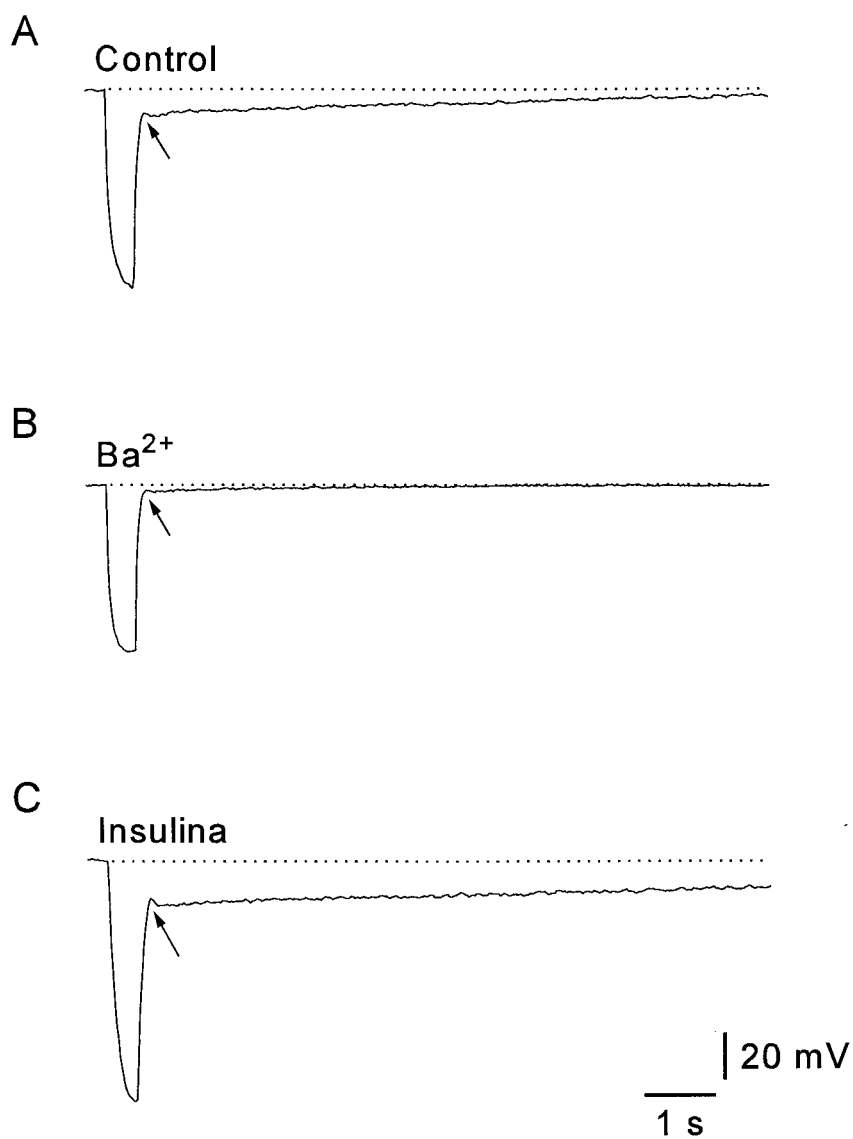


Fig. 26. Efecto de insulina bovina 4.6 nM (C) sobre la VLVm, en una célula adiposa con $V_m = -22$ mV, previamente tratada con Cl_2Ba 2.4 mM (B), y estimulada con pulsos de -0.15 nA.

4. 2. Noradrenalina

La NA a una concentración $4.7 \mu\text{M}$ añadida al medio de perfusión provoca una despolarización de 13.0 ± 2.7 (m \pm e.e., $n = 7$) en el V_m del adipocito y modifica su respuesta eléctrica a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes. Antes de estimular a la célula se restablece su V_m inicial aplicando un DC-.

Los fenómenos eléctricos activos registrados en despolarización disminuyen de amplitud en presencia de NA, al desaparecer la rectificación, y la respuesta de voltaje obtenida se asemeja a la de un circuito RC típico (Fig. 27). Los procesos eléctricos activos provocados por la hiperpolarización, V_{LVM} , disminuyen de amplitud y duración (Fig. 28 B), pues sólo se registra la fase rápida de la recuperación correspondiente a la descarga de la capacidad de la membrana.

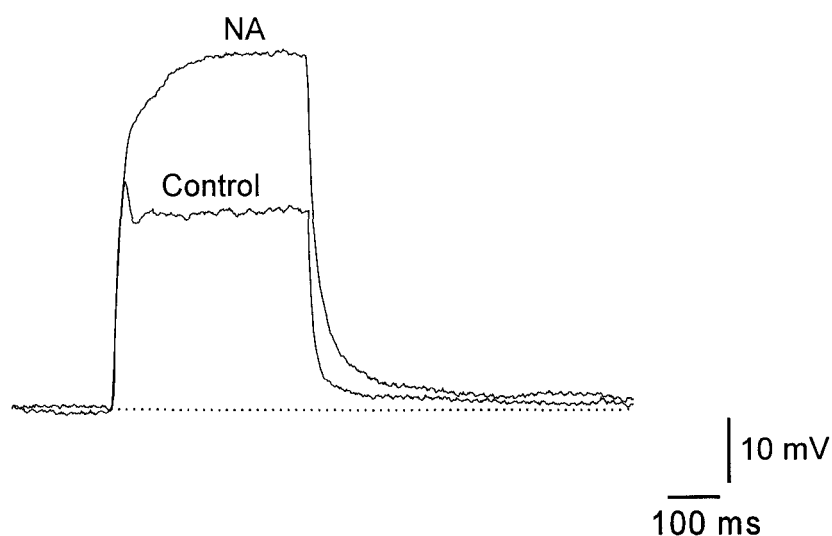


Fig. 27. Efecto de NA $4.7 \mu\text{M}$ sobre la respuesta de voltaje a pulsos cuadrados de corriente de $+0.2 \text{ nA}$, en una célula con $V_m = -38.5 \text{ mV}$.

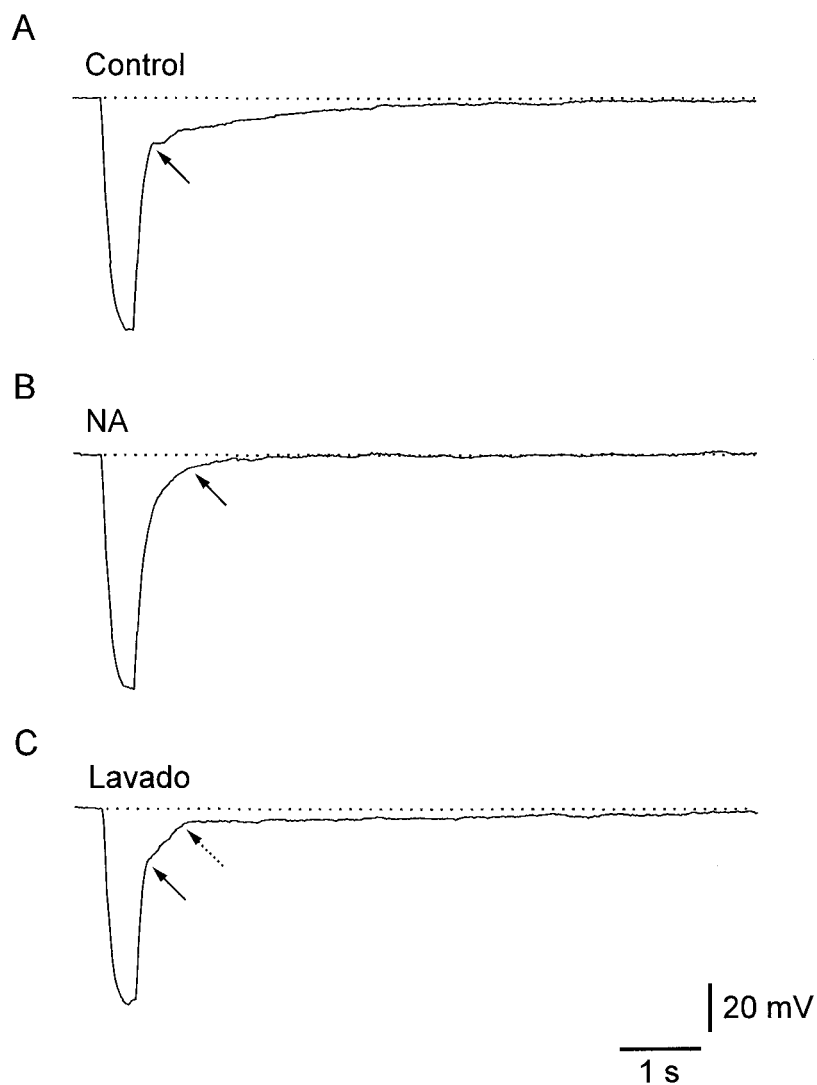


Fig. 28. Efecto de la NA $4.7 \mu\text{M}$ sobre la $V_L V_m$, en un adipocito blanco con $V_m = -26 \text{ mV}$, estimulado con pulsos de -0.2 nA .

El efecto de la NA se manifiesta mientras la catecolamina está presente y revierte parcialmente al lavar la preparación con solución estándar (Fig. 28 C). En algunas células, tal y como se recoge en la Fig. 28 C, tras el lavado se pueden identificar dos cinéticas distintas en la VLVm. Este hecho, así como la sensibilidad a distintos bloqueantes de canales de K^+ , podrían indicar la participación de más una población de canales de K^+ en la génesis de VLVm.

La NA bloquea también el incremento en la amplitud y duración del VLVm provocado previamente por la perfusión con una solución 1.4 mM de K^+ , como se observa en la Fig. 29.

Los datos estadísticos de estos experimentos se encuentran recogidos en la Tabla VIII.

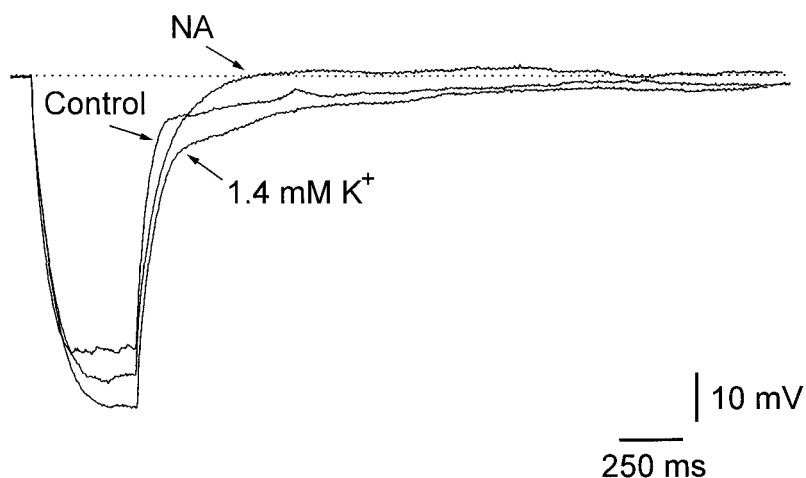


Fig. 29. Efecto de NA 4.7 μ M sobre la VLVm, obtenido con estímulos de -0.2 nA, en un adipocito perfundido con una solución 1.4 mM K^+ . Célula con $V_m = -45.5$ mV.

Tabla VIII

Efectos de la insulina y de la NA sobre la amplitud y la duración de la VLVm, en diferentes condiciones experimentales (m ± e.e.)

Control Sustancia Efecto en % del control P

insulina porcina 2.0 UI/ml (n = 9)

<i>Amplitud</i>	13.3 ± 1.9 mV	17.9 ± 1.8 mV	142.8 ± 10.1	0.001
<i>Duración</i>	5.1 ± 1.4 s	8.7 ± 2.1 s	203.7 ± 31.5	0.033

insulina bovina 8.7 nM (n = 4)

<i>Amplitud</i>	13.8 ± 1.3 mV	25.0 ± 4.4 mV	180.0 ± 21.9	0.053
<i>Duración</i>	4.9 ± 1.2 s	22.2 ± 3.5 s	611.0 ± 239.2	0.011

**insulina bovina 4.6 nM a células
previamente tratadas con Cl₂Ba 2.4 mM (n = 3)**

<i>Amplitud</i>	8.6 ± 3.5 mV	21.9 ± 4.0 mV	371.3 ± 149.0	0.006
<i>Duración</i>	5.7 ± 1.3 s	17.1 ± 5.5 s	421.6 ± 256.0	0.235

NA 4.7 μM en sol. estándar (n = 6)

<i>Amplitud</i>	20.8 ± 2.5 mV	10.3 ± 3.1 mV	51.7 ± 12.8	0.028
<i>Duración</i>	8.8 ± 1.8 s	3.4 ± 1.1 s	43.6 ± 13.2	0.065

NA 4.7 μM en sol. de bajo K⁺ (1.4 mM) (n = 2)

<i>Amplitud</i>	17.5 ± 1.4 mV	3.5 ± 3.5 mV	18.5 ± 18.5	0.095
<i>Duración</i>	11.2 ± 6.6 s	3.8 ± 3.8 s	21.5 ± 21.5	0.227

4. 3. Péptido intestinal vasoactivo

Las modificaciones de la respuesta eléctrica del TAB producidas por la adición de VIP a una concentración final de $0.25 \mu\text{M}$ son similares a las provocadas por la NA y son también parcialmente reversibles. Cuando se añade el VIP al líquido de perfusión se incrementa la respuesta de voltaje obtenida durante la aplicación de pulsos despolarizantes (Fig. 30), y se reduce la amplitud y duración de la VLVm tras la estimulación con pulsos hiperpolarizantes (Fig. 31). Los datos estadísticos de estos experimentos se muestran en la Tabla IX.

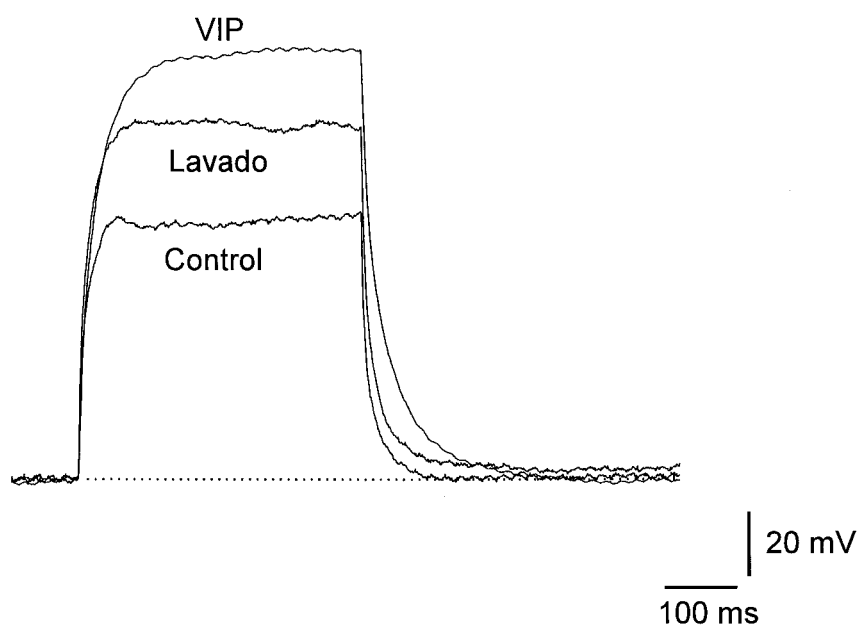


Fig. 30. Efecto de VIP $0.25 \mu\text{M}$ sobre la respuesta de voltaje desencadenada por estímulos de $+0.2 \text{ nA}$, en un adipocito con $V_m = -39 \text{ mV}$.

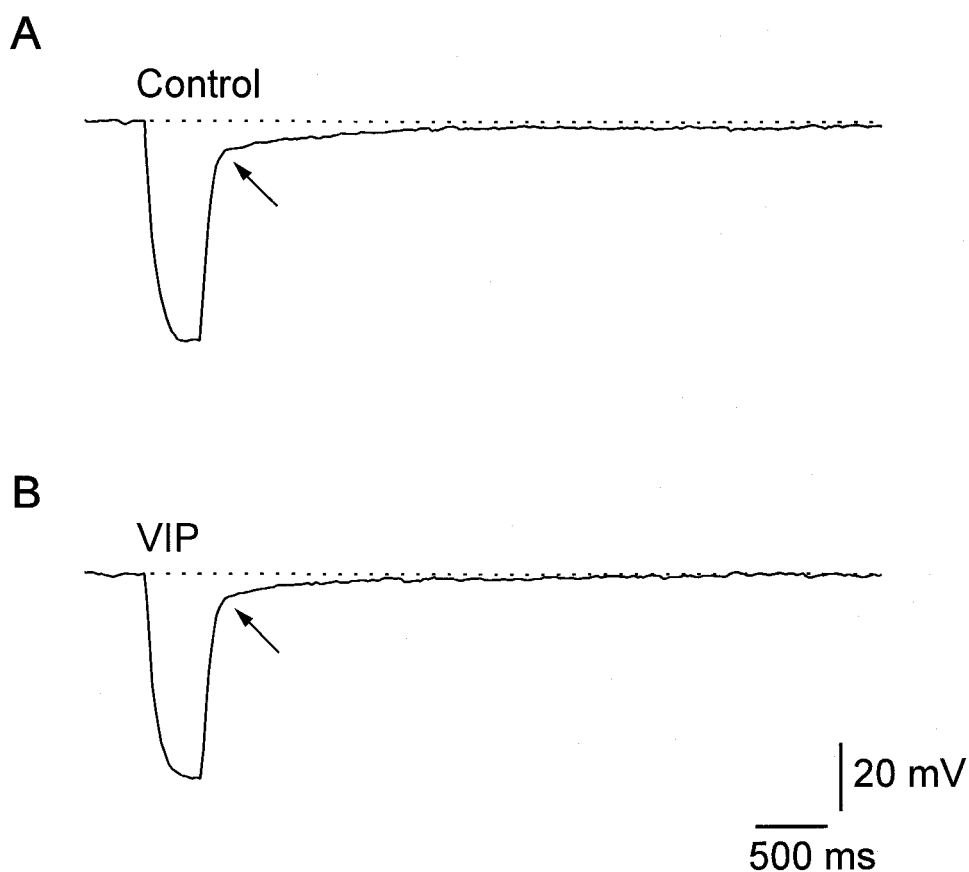


Fig. 31. Efecto de VIP $0.25 \mu\text{M}$ sobre la VLVm, en un adipocito con $V_m = -39 \text{ mV}$, estimulado con pulsos de -0.2 nA .

Tabla IX

Efecto de VIP $0.25 \mu\text{M}$ sobre la amplitud y la duración de VLVm
($m \pm e.e.$, $n = 3$)

	Control	VIP	Efecto del VIP en % del control	P
Amplitud	$11.4 \pm 1.8 \text{ mV}$	$8.9 \pm 1.2 \text{ mV}$	78.2 ± 2.6	0.053
Duración	$6.2 \pm 3.2 \text{ s}$	$3.9 \pm 1.3 \text{ s}$	130.7 ± 79.8	0.656

5. Efecto de las modificaciones de la concentración intracelular de AMPc sobre la actividad eléctrica del adipocito

Con los resultados aportados hasta ahora hemos demostrado que el TAB posee propiedades eléctricas activas mediadas por conductancias a K^+ , dependientes de voltaje y de tiempo y, al menos parcialmente, de la presencia extracelular de Ca^{2+} . También hemos presentado datos que permiten sugerir que los fenómenos eléctricos, y por tanto las conductancias a K^+ , pueden estar moduladas por hormonas como la insulina, la NA y el VIP.

Puesto que el AMPc es el mediador intracelular más importante en la respuesta lipolítica del TAB a la NA y al VIP, en la antilipolítica a la insulina, y se ha demostrado además que en otros tejidos puede actuar sobre canales y modular las corrientes iónicas, hemos explorado su posible participación en la actividad eléctrica del adipocito blanco. Para ello, hemos utilizado sustancias que aumentan la concentración intracelular de AMPc ($[AMPc]_i$): a) estimulando su síntesis; b) añadiendo un derivado liposoluble como el dibutiril-AMPc (db-AMPc); y c) bloqueando su degradación.

5. 1. Forskolín

Entre las sustancias que aumentan la $[AMPc]_i$, hemos utilizado el forskolín, sustancia obtenida de *coleus forskohlii*, que activa la adenilato ciclasa (Harris-Warrick, 1989; Garber y cols., 1990). En nuestros experimentos el forskolín se ha disuelto en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO) 1/2000, comprobando que el disolvente, a la concentración utilizada, no produce cambios en los parámetros eléctricos estudiados.

El forskolín, a una concentración 50 μM , reduce los fenómenos eléctricos activos en despolarización y la amplitud y duración del VLVm. En la Fig. 32 se aprecia su acción sobre la respuesta eléctrica activa en despolarización y en la Fig. 33 sobre la VLVm. Ambas modificaciones desaparecen parcialmente al lavar la preparación con solución estándar, y en despolarización, aunque no se recupera la cinética inicial de la respuesta (Fig. 32), sí se alcanza el mismo potencial al final del estímulo.

La Tabla X muestra los datos estadísticos de estos experimentos.

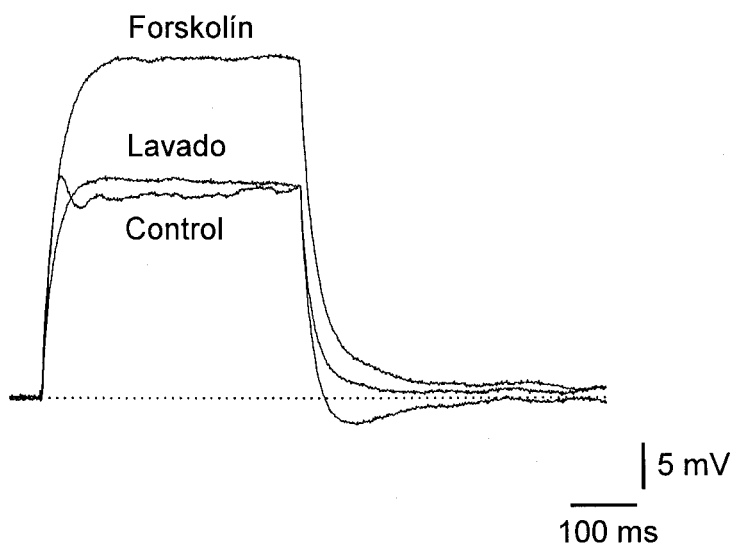


Fig. 32. Efecto de forskolín 50 μM sobre la respuesta de voltaje a estímulos de +0.35 nA, en un adipocito con $V_m = -30$ mV.

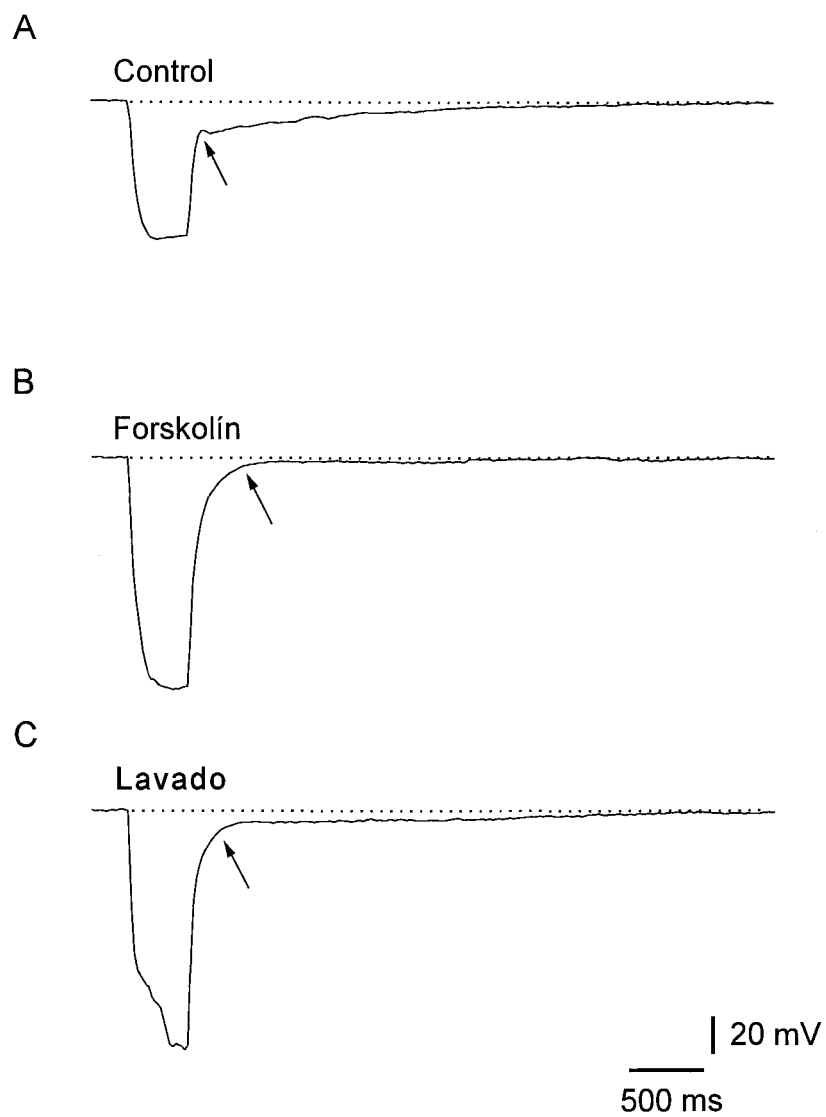


Fig. 33. Efecto de forskolin 50 μ M sobre la VLVm de un adipocito con $V_m = -44$ mV, estimulado con pulsos de -0.4 nA.

Tabla X
Efecto de forskolín 50 μ M
sobre la amplitud y la duración de VLVm
 (m \pm e.e., n = 4)

	<i>Control</i>	<i>Forskolín</i>	<i>Efecto de forskolín en % del control</i>	<i>P</i>
<i>Amplitud</i>	17.5 \pm 2.2 mV	4.7 \pm 1.2 mV	30.4 \pm 11.7	0.023
<i>Duración</i>	9.1 \pm 2.9 s	2.8 \pm 1.4 s	33.1 \pm 15.0	0.115

5. 2. Dibutiril-AMPC e isobutilmetil xantina

El efecto del forskolín sobre la respuesta eléctrica del adipocito puede deberse a una elevación en la [AMPC]_i y/o a una acción directa del forskolín sobre canales de K⁺, descrita en otras células (Harris-Warrick, 1989; Garber y cols., 1990).

Para valorar la acción aislada de modificaciones en la [AMPC]_i sobre la respuesta eléctrica del adipocito, hemos incrementado su concentración utilizando un derivado liposoluble del mismo, el db-AMPC.

La adición de db-AMPC a distintas concentraciones (desde 1.25 μ M hasta 1 mM) no produce cambios significativos en las respuestas eléctricas activas a pulsos despolarizantes (datos no mostrados), ni en las respuestas a pulsos hiperpolarizantes (Fig. 34).

La ausencia de efectos del db-AMPC puede deberse a su hidrólisis por las esterasas citosólicas. Para evitar este inconveniente hemos utilizado además del

db-AMPc un inhibidor de la fosfodiesterasa, la isobutilmetil xantina (IBMX) a una concentración final $10 \mu\text{M}$ (Valverde y cols., 1992).

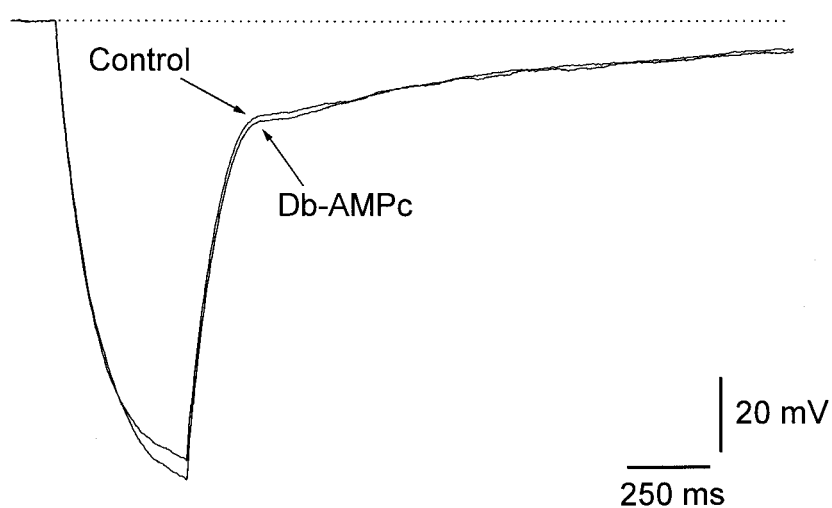


Fig. 34. Efecto de db-AMPc $500 \mu\text{M}$ sobre la VLV_m de un adipocito con $V_m = -30 \text{ mV}$, estimulado con pulsos de -0.2 nA .

La adición de IBMX $10 \mu\text{M}$ no produce ningún cambio en los procesos eléctricos activos del adipocito (Fig. 35 B). Cuando se utilizan conjuntamente IBMX y db-AMPc, a concentraciones de $10 \mu\text{M}$ y $500 \mu\text{M}$ respectivamente, se reducen, de forma reversible, tanto la amplitud de la VLV_m como su duración y los fenómenos eléctricos activos desencadenados por la aplicación de pulsos positivos de corriente (Figs. 35 y 36).

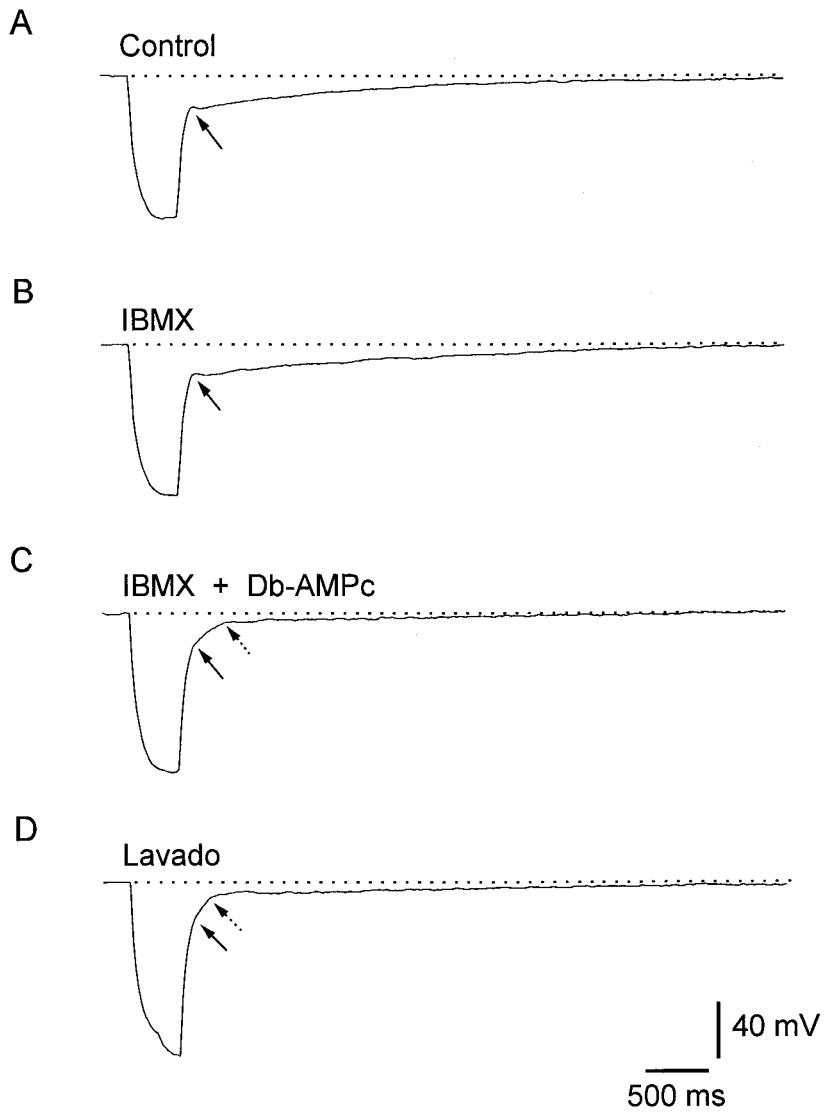


Fig. 35. Efecto de la adición conjunta de IBMX $10 \mu\text{M}$ y de db-AMPC $500 \mu\text{M}$ sobre la VLVm, en un adipocito con $V_m = -24.5 \text{ mV}$, estimulado con pulsos de -0.3 nA .

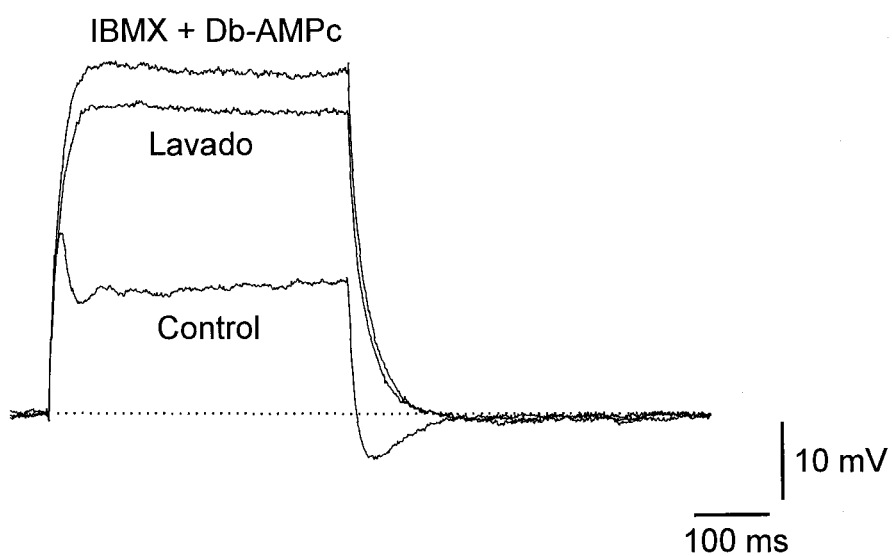


Fig. 36. Efecto de la adición conjunta de IBMX $10 \mu\text{M}$ y de db-AMPc $500 \mu\text{M}$ sobre la respuesta de voltaje a estímulos de $+0.55 \text{ nA}$, en un adipocito con $V_m = -26 \text{ mV}$.

Los datos estadísticos de los experimentos que exploraron el AMPc como mediador intracelular en el adipocito blanco se recogen en la Tabla XI.

Tabla XI
*Efectos de IBMX y db-AMPc
 sobre la amplitud y la duración de la VLVm
 (m ± e.e.)*

Control Sustancia Efecto en % del control P

db-AMPc 500 μM

(n = 4)

<i>Amplitud</i>	18.4 ± 1.9 mV	17.8 ± 2.9 mV	97.4 ± 13.3	0.831
<i>Duración</i>	11.9 ± 1.0 s	10.0 ± 2.8 s	85.4 ± 22.1	0.558

IBMX 10 μM

(n = 26)

<i>Amplitud</i>	18.1 ± 1.4 mV	16.5 ± 1.6 mV	92.1 ± 5.8	0.099
<i>Duración</i>	10.8 ± 1.2 s	11.3 ± 1.9 s	105.0 ± 14.8	0.715

db-AMPc 500 μM

más IBMX 10 μM

(n = 12)

<i>Amplitud</i>	20.2 ± 2.1 mV	9.0 ± 1.7 mV	49.7 ± 11.2	0.009
<i>Duración</i>	13.4 ± 2.5 s	3.2 ± 0.6 s	53.7 ± 22.7	0.003

DISCUSION

En trozos de tejido adiposo del epidídimo de rata hemos estudiado, con técnicas de registro intracelular y fijación de corriente, las propiedades eléctricas pasivas y activas del adipocito blanco. Con nuestros experimentos hemos demostrado que los adipocitos blancos son capaces de generar respuestas eléctricas activas de membrana a estímulos eléctricos; que estas respuestas pueden ser una consecuencia de la activación de canales iónicos, probablemente de K^+ ; y que algunas hormonas que regulan su metabolismo, a través del AMPc y del Ca^{2+} , podrían modular esas conductancias.

1. Propiedades pasivas

El valor obtenido para el V_m del adipocito blanco es del orden de -32.5 ± 11.4 mV ($m \pm d.e.$) y coincide básicamente con los publicados por otros autores que han utilizado microelectrodos para su medida. Biegelman y Hollander en 1962 y 1965 y también Miller y cols. en 1966 publicaron valores que oscilaban

entre -17 y -37 mV; Akiyama y cols. en 1990 obtuvieron un valor de -21 mV; Kamei y cols. en 1992 de -22 mV, y Stark y cols. en 1980 de -46 mV. Perry y Hales en 1969 calcularon, a partir de la distribución intra / extracelular de los iones Cl^- , un valor promedio del V_m en adipocitos blancos de -28.7 mV. Utilizando trifenilmetilfosfonio (TFMF), Cheng y cols. en 1981 encontraron un V_m de -58 mV.

Además, hemos calculado en los adipocitos la resistencia de entrada, la resistencia específica, la constante de tiempo y la capacidad eléctrica de la membrana, y hemos determinado el diámetro celular. Éste alcanza un valor de $82 \mu\text{m}$, acorde con el diámetro promedio de los adipocitos blancos.

A excepción del V_m , no existen antecedentes en la literatura sobre la cuantía del resto de los parámetros eléctricos pasivos en el adipocito blanco. Sólo se conocen algunos datos en el adipocito marrón. En estas células, Lucero y Pappone en 1989, con técnica de fijación de voltaje en patch clamp, midieron la resistencia de entrada y la específica, encontrando valores de $1.3 \pm 1.1 \text{ G}\Omega$ y de $30 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ respectivamente. Nuestros datos ($266.7 \pm 146.0 \text{ M}\Omega$ y $56.4 \text{ K}\Omega\text{cm}^2$), a pesar de las diferencias de tamaño celular y de la técnica de medida empleadas, se encuentran dentro de los medidos en el TAM. El hecho de que el adipocito blanco y marrón tengan una resistencia específica similar apoya la idea de que, al igual que ocurre en el TAM, en la membrana del adipocito blanco pudieran existir conductancias iónicas.

Sobre la base de los experimentos de distribución del TFMF, Vallano y cols. en 1983 y Davis y McDonald en 1990 encuentran que la membrana plasmática del adipocito presenta mejor permeabilidad para el Na^+ y el K^+ que para otros iones, y sugieren que el V_m del adipocito es básicamente un potencial de difusión de cationes. Kamei y Sugimoto en 1994, estudiando la

despolarización producida por la histamina en adipocitos aislados de cobaya, comprueban que esta despolarización es dependiente de la $[Na^+]_e$ y de la $[K^+]_e$, sugiriendo con ello que estos iones participan en la génesis del V_m del adipocito.

Nuestros datos demuestran que el V_m del adipocito depende de las variaciones de la $[K^+]_e$ y apoyan la idea de que el ión K^+ participa directamente en su génesis. Cuando disminuimos la concentración extracelular de K^+ desde 5 mM a 1.4 mM, la célula se hiperpolariza 11.6 ± 2.5 mV ($m \pm e.e.$, $n = 9$).

2. Bases iónicas de los fenómenos eléctricos activos

Con el presente trabajo hemos sido los primeros en demostrar la existencia en el adipocito blanco de respuestas eléctricas activas durante la aplicación de pulsos despolarizantes y tras la estimulación con pulsos hiperpolarizantes, y que estas respuestas se producen como consecuencia de cambios en las conductancias iónicas voltaje dependientes de su membrana.

Esta formulación se fundamenta en el análisis de los resultados de nuestros experimentos. Con nuestros datos hemos demostrado que la respuesta de voltaje que registramos en el adipocito tiene un componente activo. Que los fenómenos eléctricos activos obedecen a cambios en las conductancias de la membrana, porque su resistencia eléctrica cambia mientras se manifiestan los fenómenos eléctricos activos.

Por otro lado, el hecho de que los procesos eléctricos activos se desencadenen durante o tras la aplicación de pulsos de corriente, y que para ello

sea necesario que las células alcancen un cierto nivel de potencial, nos permiten concluir que la membrana de estas células poseen conductancias iónicas voltaje dependientes.

Basados en que las respuestas eléctricas inducidas por pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes puedan interpretarse como un intento de la célula para acercarse al potencial de equilibrio de K^+ , y puesto que durante la aplicación de los pulsos despolarizantes las conductancias iónicas que se activan tienden a repolarizar la célula y las que lo hacen tras la hiperpolarización retardan la recuperación del V_m , sospechamos que el ión K^+ , entre otros iones, puede participar en la génesis de los fenómenos eléctricos activos de estas células.

El análisis de los resultados obtenidos con los experimentos diseñados para estudiar los iones involucrados en las respuestas activas permiten concluir que el K^+ y el Ca^{2+} intervienen en estas manifestaciones eléctricas.

2. 1. Participación del potasio

Nuestra propuesta de que el K^+ participa, junto con otros iones, en la respuesta eléctrica activa del adipocito blanco se fundamenta en los siguientes argumentos:

1. Cuando incrementamos el gradiente intra / extracelular de K^+ , disminuyendo la $[K^+]_e$, la amplitud de la respuesta eléctrica activa aumenta. Este efecto no se debe al cambio de V_m , pues se compensa antes de la aplicación de los pulsos estimulantes. El aumento de los fenómenos eléctricos activos lo consideramos debido al incremento del gradiente

químico de K^+ , que fuerza la salida de este ión a través de canales de K^+ voltaje dependientes.

2. Cuando utilizamos bloqueantes de canales de K^+ , se produce una disminución de la respuesta eléctrica activa por la reducción de la salida de K^+ del adipocito que producen estas sustancias. Hay que señalar que con el TEA no hemos observado ninguna modificación. Este dato puede explicarse porque en nuestra preparación el bloqueante no difunda bien y no llegue a la célula explorada. Nuestro grupo ha comprobado, con técnica de patch-clamp y fijación de voltaje, que el TEA bloquea las corrientes de salida de K^+ en adipocitos cultivados (Ramírez-Ponce y cols., 1996). El débil efecto que produce el Cs^+ es posible entenderlo recordando que este ión produce su acción principalmente cuando se aplica en la cara citoplasmática de la membrana celular.

3. Otro hecho de interés es que la 4AP reduce sólo las manifestaciones eléctricas activas debidas a los cambios de conductancias a K^+ por estímulos hiperpolarizantes, pero no los provocados por los despolarizantes. Esto permite sugerir que canales de K^+ tipo K_A podrían estar involucrados en las conductancias activadas tras la hiperpolarización.

Los únicos antecedentes bibliográficos relacionados con la posible existencia de canales de K^+ en el adipocito blanco son los publicados por Koivisto y cols. en 1993, que proponen la existencia de canales catiónicos no selectivos en la membrana del adipocito blanco similares a los descritos en el adipocito marrón y que participarían en la regulación de sus flujos iónicos. También Pershadsingh y cols. en 1986 postulan que el adipocito blanco aislado del tejido adiposo del epidídimo de rata posee en su membrana un canal de K^+ dependiente Ca^{2+} , que está regulado por la calmodulina. Este canal, con la

misma selectividad para el Rb^+ que para el K^+ , media la captación de Rb^+ por el adipocito, su activación depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la calmodulina y se bloquea por el TEA.

2. 2. Participación del calcio

Las respuestas eléctricas activas registradas en nuestros experimentos son dependientes, al menos parcialmente, de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Cuando se perfunde con una solución sin Ca^{2+} y con Cl_2Co se reduce de forma reversible la amplitud de las conductancias de K^+ activadas por pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes. Con este protocolo, la adición de 4AP disminuye aún más la amplitud de las conductancias presentes en la VLVm, también de forma reversible.

Estos datos permiten asumir que en la génesis de los fenómenos eléctricos activos podrían intervenir también canales de K^+ voltaje y Ca^{2+} dependientes, $\text{K}(\text{Ca})$. La activación de estos canales por aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pudiera producirse como consecuencia de un incremento en el flujo de entrada de Ca^{2+} desde el exterior, a través de canales de Ca^{2+} , o de su movilización de los reservorios intracelulares.

Muy recientemente, nuestro grupo ha publicado un trabajo en el que demuestra la existencia de canales de K^+ voltaje dependiente en adipocitos blancos, diferenciados a partir de preadipocitos (Ramírez-Ponce y cols., 1996). En él demuestran que parte de la corriente se bloquea por Co^{2+} y sugieren que, aunque la acción del Co^{2+} pueda ser debida a la acción directa del bloqueante sobre los canales de K^+ , podría también explicarse por la existencia de una corriente $\text{K}(\text{Ca})$ similar a la encontrada en el TAM (Lucero y Papone, 1990).

Existen en la literatura aportaciones experimentales que apoyan la existencia de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática del adipocito blanco. Pershadsingh y cols. en 1989, cuando estudian los sistemas de transporte de Ca^{2+} en adipocitos aislados del epidídimo de rata, comprueban que despolarizando la célula al elevar la $[\text{K}^+]_e$ se produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que bloquean antagonistas de canales de Ca^{2+} como el diltiazem, por lo que concluyen que el adipocito podría disponer de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ni y cols. en 1994 publicaron un trabajo en el que estudiaban el efecto de la parathormona (PTH) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, concluyendo que la elevación del Ca^{2+} intracelular producido por la PTH se debe a la movilización del Ca^{2+} de los almacenes intracelulares del adipocito y a la activación de canales de Ca^{2+} por la PTH. Hardy y cols. en 1992 apoyan también la posible existencia de canales de Ca^{2+} en la membrana del adipocito al comprobar que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ y la adrenalina producen una elevación transitoria en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Gaur y cols., en dos trabajos publicados en 1996, demuestran que la hormona del crecimiento (GH) produce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que este efecto podría estar mediado por la existencia en la membrana del adipocito de canales de Ca^{2+} tipo L, cuyo número e integridad funcional pueden depender de la GH que los activaría al fosforilarlos con una PKC independiente de Ca^{2+} .

Koivisto y cols. en 1993 propusieron la existencia de un canal catiónico no selectivo en adipocitos blancos con características casi idénticas a las descritas en células adiposas marrones (Siemen y Reuhl, 1987). Con nuestros resultados puede concluirse que entre la población de canales de K^+ voltaje dependientes responsables de las respuestas eléctricas activas en el adipocito blanco podrían incluirse canales tipo K_A y $\text{K}(\text{Ca})$. Al igual que sucede en el TAM, en el que se han descrito varios tipos de canales con diferentes funciones fisiológicas (Ruß y cols., 1993; para una revisión ver Koivisto y cols., 1994), en adipocitos blancos podrían coexistir múltiples canales de K^+ con distinta función fisiológica.

3. ¿Son los mismos canales responsables de los cambios de conductancias provocados por la despolarización o la hiperpolarización del adipocito?

Llegados a este punto parece de interés conocer si las conductancias que se activan durante la despolarización son las mismas que las que lo hacen tras la hiperpolarización.

Para poder contestar esta pregunta, tendremos que comparar las características de ambas respuestas, diferenciando las comunes de las específicas.

Es necesario precisar en primer lugar, como característica común, que la activación de ambas conductancias se produce cuando la célula se despolariza, ya sea a partir del V_m , cuando aplicamos un pulso despolarizante, o desde un nivel de hiperpolarización desencadenado por un estímulo hiperpolarizante.

Otra característica que puede ser común a ambas conductancias es su curso temporal. En una primera aproximación, el curso temporal de ambas respuestas parece diferente, pues la de la hiperpolarización se reduce progresivamente a medida que aumenta el tiempo en que se activaron, mientras que la de la despolarización, por el contrario, se mantiene constante durante el tiempo que persiste el pulso de corriente estimulante. Un estudio más detenido permite concluir que tal diferencia podría no existir si se tiene en cuenta la distinta base de tiempo en que se registran ambos procesos. En efecto, las conductancias en hiperpolarización presentan un perfil que sugiere un proceso de inactivación progresiva dependiente de tiempo y que puede llegar a durar, en

algunas células, hasta 16 s. Las conductancias en despolarización sólo se registran mientras aplicamos el pulso de corriente, es decir 0.4 s. En este corto espacio de tiempo puede que no se detecten posibles procesos de inactivación de conductancias. Si prolongamos el tiempo de aplicación del estímulo y de registro, tal vez se podrían detectar cambios en la misma debidos a inactivación.

Las dos conductancias iónicas de K^+ dependen del V_m en que se encuentre la célula antes de su estimulación. Las conductancias que se activan durante la despolarización aumentan de amplitud cuando incrementamos el V_m inicial hiperpolarizando la célula con un DC-; y las que se producen tras la hiperpolarización se registran mejor cuando reducimos el valor del V_m inicial inyectando un DC+. En el primer caso, el incremento en el flujo de salida de K^+ mediado por las conductancias en despolarización no puede explicarse por el aumento del gradiente eléctrico transmembrana, desfavorable a la salida de K^+ , sino por un aumento en el número de canales que se activan. En el segundo caso, el aumento de la V_{LVm} puede estar relacionado con la elevación del gradiente eléctrico, favorable a la salida de K^+ , y no con el incremento en el número de canales que se activan. En ambos casos, las conductancias se activarían a un potencial transmembrana (-43.9 ± 11.1 mV) próximo al valor de V_m (-32.5 ± 11.4 mV).

En algunas células, el tiempo que tardan en desaparecer estas conductancias, una vez terminado el pulso despolarizante, parece ser más prolongado que la descarga capacitativa de la membrana, pues presentan una posthiperpolarización. Esta posthiperpolarización puede interpretarse como debida a que algunos canales iónicos de K^+ voltaje dependientes tardan algo más en cerrarse y permiten que la salida de K^+ continúe durante algún tiempo, después de finalizado el pulso.

Puesto que las diferencias entre las respuestas eléctricas durante la aplicación de pulsos despolarizantes y tras la aplicación de pulsos hiperpolarizantes, como acabamos de comentar, no justificarían la existencia de claras diferencias entre la población de canales que intervienen en cada una de las respuestas, únicamente el distinto comportamiento de las conductancias ante diferentes bloqueantes nos permite sugerir que mientras que en la VLVm pueden participar todos los canales propuestos, en la rectificación de la despolarización no intervendrían los canales tipo K_A .

4. Efecto de la insulina, la noradrenalina y el péptido intestinal vasoactivo sobre la actividad eléctrica del tejido adiposo blanco

4. 1. Insulina

Nosotros hemos podido comprobar que la insulina aumenta el V_m de la célula 24.4 ± 4.1 mV ($m \pm e.e.$). Biegelman y Hollander en 1962 estudiaron el efecto de la insulina sobre el V_m de los adipocitos blancos, encontrando que la adición de insulina al medio de perfusión hiperpolariza la célula hasta incluso en 30 mV, y que este efecto no se producía si previamente se añadía al líquido de perfusión anticuerpos anti-insulina (Biegelman y Hollander, 1965). La primera aproximación a la comprensión del mecanismo por el que la insulina hiperpolariza el adipocito se recoge en una publicación de Zierler y Ribanovitch en 1963. Estos autores estudiaron el flujo transcelular de K^+ "in vivo", demostrando que la

insulina produce en el tejido adiposo un aumento de la captación de K^+ que puede ser debido a un incremento en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , como postularon Perry y Hales en 1969, o a un aumento en la afinidad de la ATPasa al Na^+ . También estos autores sugieren que la acción de la insulina sobre el Vm podría deberse a su efecto metabólico antilipolítico. Al reducir la concentración de AG libres en el interior del adipocito, evita el bloqueo de la fosforilación oxidativa, aumenta las disponibilidades de ATP y favorece el funcionamiento de la bomba.

Además, hemos sido los primeros en demostrar que la insulina produce cambios en la respuesta eléctrica activa del adipocito, pues aumenta la amplitud ($180 \pm 21.9 \%$) y la duración ($611 \pm 239.2 \%$) de la VLVm. Este efecto podría explicarse por un aumento en la salida de K^+ , que se produzca como consecuencia de un incremento en el número de canales activos y/o de una elevación en el gradiente intra / extracelular de K^+ , debida a la estimulación de la ATPasa Na^+/K^+ dependiente. Aunque ambos mecanismos son posibles, el hecho de que estas células posean conductancias de K^+ voltaje dependientes, que tienen que estar activas para que la insulina produzca su efecto, apoya la interpretación de que la acción de la insulina sobre la actividad eléctrica del TAB se deba preferentemente al incremento en el número de canales de K^+ activos.

En otras células, como en los pericitos de los capilares de la retina (Berweck y cols., 1993), o en los fibroblastos de embrión de pollo (Repp y cols., 1995), la insulina también provoca una hiperpolarización, probablemente como consecuencia de la activación de canales de $K(Ca)$. Sabemos que el Ca^{2+} puede intervenir como mensajero intracelular de alguna de las acciones de la insulina en el adipocito y, por tanto, podría activar canales de K^+ . Estos datos permitirían explicar la hiperpolarización producida por la insulina, por incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la consecuente activación de canales del tipo $K(Ca)$.

4. 2. Noradrenalina

La NA despolariza 13.0 ± 2.7 mV ($m \pm e.e.$) el Vm del adipocito. Estos datos coinciden con los aportados por Vallano y cols. en 1983. Estos autores midieron los cambios en el Vm utilizando un colorante catiónico sensible a voltaje y demostraron que sustancias con actividad lipolítica como adrenalina, ACTH y AMPc despolarizan el adipocito blanco, interpretando estos hechos como consecuencia del incremento de la concentración intracelular de AG libre y de la reducción en la síntesis de ATP que ello conlleva, con la consiguiente disminución del ATP disponible para el funcionamiento de la ATPasa Na^+ y K^+ dependiente.

También la NA, en nuestra preparación de TAB, produce una disminución de la respuesta eléctrica activa de la membrana del adipocito a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes. En base a los diferentes tipos de canales que hemos defendido que pueden existir en la membrana plasmática del adipocito, el efecto de la NA sobre la respuesta eléctrica activa de estas células puede interpretarse como debidas al bloqueo parcial de los canales de K^+ descritos. En la literatura existen ejemplos de bloqueos de canales de K^+ por la NA. Muraki y cols. en 1994, estudiando con patch clamp las corrientes iónicas en células de músculo liso del uréter, comprobaron una acción bloqueante de la NA a una concentración $10 \mu\text{M}$, sobre los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} .

4. 3. Péptido intestinal vasoactivo

El VIP reduce las manifestaciones eléctricas activas sobre el TAB. Sabemos que el VIP ejerce una acción lipolítica y antiinsulínica mediada por un incremento de los niveles de AMPc, en adipocitos blancos (Green y cols., 1985).

En otros tejidos, además, modula canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} a través del AMPc (Lechleiter y cols., 1988). Todo ello sugiere que el efecto del VIP sobre las manifestaciones eléctricas activas del TAB podrían estar mediados por el AMPc.

5. Participación del AMPc en la actividad eléctrica del tejido adiposo blanco

El hecho de que cuando hemos tratado de incrementar la concentración intracelular de AMPc, con la adición de forskolin y con la adición de db-AMPc junto con el IBMX, hayamos registrado una disminución de la respuesta eléctrica activa del adipocito, a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes, y que la NA y el VIP, que ejercen su efecto sobre los adipocitos a través del AMPc, producen las mismas modificaciones en su respuesta eléctrica activa, indican que el AMPc puede modular las conductancias a K^+ que existen en la membrana plasmática de estas células.

Este posible papel del AMPc como modulador de algunos de los tipos de canales que hemos postulado que existen en la membrana plasmática del adipocito, se refuerza con algunos datos bibliográficos. Existen ejemplos en la literatura, referentes a otros tejidos, en los que el AMPc ejerce un efecto modulador sobre canales de K^+ . En neuronas del hipocampo produce una inhibición de las corrientes de K^+ tipo I_A (Deadwyler y cols., 1995). En células de la línea pituitaria GH (4) C(1), inactiva canales de K^+ voltaje-dependiente (Chung y Kaczmarek, 1995) y en un mutante de drosófila (éter-a-go-go), modula un canal permeable a K^+ y Ca^{2+} .

6. Papel funcional de la actividad eléctrica en el adipocito blanco

El análisis de nuestros resultados nos obliga a discutir el posible papel fisiológico de los canales que hemos propuesto en el tejido adiposo blanco. La comprobación de que hormonas que regulan el metabolismo celular en este tejido modifican también su respuesta eléctrica activa nos permite pensar en una posible participación de dichos canales en la función del adipocito.

En otras células no excitables pero metabólicamente activas, como en células endoteliales, hepatocitos y linfocitos, se han encontrado conductancias a K^+ dependientes de voltaje. En estas células, puesto que los canales de K^+ voltaje dependientes no sirven para regular su excitabilidad eléctrica, se ha especulado que estos canales pueden participar en los mecanismos celulares para amortiguar los cambios electroquímicos y osmóticos que pueden producirse como consecuencia de la actividad de las bombas iónicas electrogénicas de membrana y del metabolismo celular. En el metabolismo celular se produce un incremento de H^+ intracelulares y un aumento de partículas osmóticamente activas. La extrusión de las partículas osmóticamente activas y de los H^+ se hace con participación de otros iones. En estas condiciones, los canales de K^+ voltaje dependientes de estas células participarían de forma indirecta en su metabolismo, al mantener las células con un gradiente electroquímico y osmótico que aseguren la continuidad de su actividad metabólica.

Si admitimos que los canales de K^+ en el adipocito blanco sirven para mantener el gradiente electroquímico y osmótico dentro de un rango fisiológico, difícilmente podríamos explicar los cambios que inducen la insulina y la NA sobre la respuesta eléctrica de estas células, pues ambas hormonas incrementan, de

forma diferente, el metabolismo celular. Sin embargo, el hecho de que nuestros resultados no permitan entender el papel funcional de los canales de K^+ , no nos faculta para descartar esta interpretación, pues existen datos que así lo sugieren, como son que la insulina aumenta la actividad de la bomba Na^+/K^+ y del intercambiador Na^+/H^+ en el adipocito blanco, y que la NA disminuye la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa.

Una conclusión importante de nuestro trabajo es que las conductancias de K^+ , que proponemos que existen en la membrana del adipocito blanco, parecen estar moduladas por el AMPc. Teniendo en cuenta que éste es un mediador intracelular en la respuesta lipolítica y su nivel está regulado tanto por la NA, que lo incrementa, como por la insulina, que lo disminuye, podría argumentarse que aparte de su efecto regulador sobre el equilibrio electroquímico y osmótico, las conductancias a K^+ podrían participar también en el equilibrio lipogénesis / lipólisis en el adipocito.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos realizado un estudio de las propiedades eléctricas del tejido adiposo blanco del epidídimo de rata mediante técnica de registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente. Con los resultados obtenidos hemos alcanzado las siguientes conclusiones:

1. Hemos cuantificado las propiedades eléctricas pasivas, siendo el potencial de membrana en reposo de -32 mV, la resistencia de entrada de 267 M Ω , la constante de tiempo de 52 ms y la capacidad de la membrana de 215 pF. El diámetro celular promedio es 82 μ m y la resistencia específica es 56 k Ω cm².

2. Hemos demostrado que en la membrana de estas células se producen fenómenos eléctricos activos durante la aplicación de pulsos despolarizantes y tras la estimulación con pulsos hiperpolarizantes. Con pulsos positivos estos fenómenos se manifiestan como una rectificación de la respuesta de voltaje. Con pulsos negativos se registran como una vuelta lenta al potencial de membrana, VLVm.

3. Los fenómenos eléctricos activos son voltaje y tiempo dependientes.

4. Para V_{LVm} , el potencial de activación promedio es de -44 mV, y su duración media es de 8 s, pudiendo alcanzar en algunas células hasta 16 s.
5. Hemos demostrado que en los fenómenos eléctricos activos que se producen en la membrana plasmática del adipocito participan conductancias a K^+ .
6. Sugerimos que en las conductancias a K^+ voltaje dependientes pueden coexistir distintos canales de K^+ , como los K_A y los $K(Ca)$.
7. Hemos demostrado que la insulina hiperpolariza el adipocito e incrementa sus fenómenos eléctricos activos. Sugerimos una probable modulación de las conductancias a K^+ por esta hormona.
8. Hemos demostrado que la noradrenalina despolariza la célula y reduce la expresión de sus fenómenos eléctricos activos, tanto en despolarización como en hiperpolarización. Sugerimos una probable modulación de las conductancias a K^+ por esta hormona. El péptido intestinal vasoactivo reproduce el efecto de la noradrenalina sobre la respuesta activa en despolarización e hiperpolarización.
9. Hemos demostrado que en todas aquellas condiciones en las que se incrementa la concentración intracelular de AMPc, ya sea por la aplicación de hormonas, como la noradrenalina y el péptido intestinal vasoactivo, o mediante la adición de forskolín o dibutilil-AMPc más IBMX, se reducen los fenómenos eléctricos activos en el adipocito. Sugerimos que el AMPc puede participar en la modulación de las conductancias a K^+ , presentes en el tejido adiposo.
10. Proponemos que las conductancias de K^+ podrían intervenir en la regulación hormonal de la actividad metabólica del tejido adiposo blanco.

REFERENCIAS

Akiyama Y., Kamei C. y Tasaka K. (1990) Histamine lipolysis II: Effects of histamine and related compounds on membrane potentials of rat adipocytes. *Methods Find. Exptl. Clin. Pharmacol.*, **12 (7)**: 457-465.

Alvarez de Toledo G. (1985) Propiedades electrofisiológicas y conductancias iónicas en neuronas del septum in vitro. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

Alvarez de Toledo G. y López-Barneo J. (1988) Ionic basis of the differential neuronal activity of guinea-pig septal nucleus studied in vitro. *J. Physiol.*, **396**: 399-415.

Arch J., Ainsworth A.T., Cawthorne M.A., Piercy V., Sennit M.V., Thody V.E., Wilson C. y Wilson S. (1984) Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*, **309**: 163-165.

Arch J.R.S. (1989) The brown adipocyte β -adrenoceptor. *Proc. Nutr. Soc.*, **48**: 215-223.

Arsenis G. y Spencer B.A. (tech. assist.). (1995) Regulation of Na⁺/H⁺ exchange in rat adipocytes; effects of insulin. *Endocrin.*, **136 (5)**: 1920-1927.

Begin-Heick N. (1995) β 3-adrenergic activation of adenylyl cyclase in mouse white adipocytes: modulation by GTP and effect of obesity. *J. Cell Biochem.*, **58 (4)**: 464-473.

Begum N., Sussman K.E. y Draznin B. (1991) High levels of cytosolic free calcium inhibit dephosphorylation of insulin receptor and glycogen synthase. *Cell Calcium*, **12**: 423-430.

Beigelman P.M. y Hollander P.B. (1962) Effect of insulin upon resting electrical potential of adipose tissue. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **110**: 590-595.

Beigelman P.M. y Hollander P.B. (1964) Effects of hormones upon adipose tissue membrane electrical potentials. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **116**: 31-35.

Beigelman P.M. y Hollander P.B. (1965) Effect of insulin and insulin antibody upon rat adipose tissue membrane resting electrical potential (REP). *Acta Endocrinol.*, **50**: 648-656.

Bensadoun A. (1991) Lipoprotein lipase. *Annu. Rev. Nutr.*, **11**: 217-237.

Berweck S., Thieme H., Lepplewiehues A., Helbig H. y Wiederholt M. (1993) Insulin-induced hyperpolarization in retinal capillary pericytes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **34 (12)**: 3402-3407.

Birnbaumer L., Pohl S. y Rodbell M. (1969) Adenyl cyclase in fat cells. I. Properties and effects of adrenocorticotropin and fluorid. *J. Biol. Chem.*, **244 (13)**: 3468-3473.

Blanchette-Mackie E.J., Dwyer N.K., Barber T., Coxey R.A., Takeda T., Rondinone C.M., Theodorakis J.L., Greenberg A.S. y Londos C. (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J. Lipid Res.*, **36 (6)**: 1211-1226.

Bleitcher S.J. (1966) Potassium dependence of growth hormone activated lipolysis in vitro. *J. Clin. Invest.*, **45 (6)**: 988-991.

Boston B.A. y Cone R.D. (1966) Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinol.*, **137 (5)**: 2043-2050.

Cannon B. y Nedergaard J. (1985) Biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem.*, **20**: 110-164.

Carrasco J.L. (1989) El método estadístico en la investigación médica, 4ª ed. Editorial Ciencia 3, S.A., Madrid.

Castan I., Valet P., Larrouy D., Voisin T., Remaury A., Daviaud D., Laburthe M. y Lafontan M. (1993) Distribution of PYY receptors in human fat cells: an antilipolytic system alongside the α_2 -adrenergic system. *Am. J. Physiol.*, **265 (1/1)**: E74-E80.

Castan I., Valet P., Quideau N., Voisin T., Ambid L., Laburthe M., Lafontan M. y Carpenne C. (1994) Antilipolytic effects of α_2 -adrenergic agonists, neuropeptide Y, adenosine, and PGE1 in mammal adipocytes. *Am. J. Physiol.*, **266 (4/2)**: 1141-1147.

Castan I., Valet P., Voisin T., Quideau N., Laburthe M. y Lafontan M. (1992) Identification and functional studies of a specific peptide YY-preferring receptor in dog adipocytes. *Endocrinol.*, **131 (4)**: 1970-1976.

Cheng K., Groarke J., Osotimehin G., Haspel H.C. y Sonenberg M. (1981) Effects of insulin, catecholamines, and cyclic nucleotides on rat adipocyte membrane potential. *J. Biol. Chem.*, **256**: 649-655.

Chung S.W. y Kaczmarek L.K. (1995) Modulation of the inactivation of voltage-dependent potassium channels by cAMP. *J. Neurosci.*, **15 (5/2)**: 3927-3935.

Clausen T. (1969) The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues. V. Stimulating effect of ouabain, K⁺-free medium and insulin on efflux of 3-O-methylglucose from epididymal adipose tissue. *Biochem. Biophys. Acta*, **183**: 625-631.

Clausen T. (1970) Electrolytes and the hormonal control of organic metabolism in adipocytes. *Horm. Metab. Res. Suppl.*, **2**: 66-70.

Clausen T., Rodbell M. y Dunand P. (1969) The metabolism of isolated fat cells. VII. Sodium-linked, energy-dependent, and ouabain-sensitive potassium accumulation in ghosts. *J. Biol. Chem.*, **244**: 1252-1257.

Connolly E., Nanberg E. y Nedergaard J. (1986) Norepinephrine-induced Na⁺ influx in brown adipocytes is cyclic AMP-mediated. *J. Biol. Chem.*, **261**: 14377-14385.

Connor J.A. y Stevens C.F. (1971) Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. *J. Physiol.*, **213**: 1-20.

Dasso L., Connolly E. y Nedergaard J. (1990) α 1-adrenergic stimulation of Cl⁻ efflux in isolated brown adipocytes. *FEBS-Lett.*, **262**: 25-28.

Davis H.W. y McDonald J.M. (1990) Modulation of guanine nucleotide effects on the insulin receptor by MgCl₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171 (1)**: 53-59.

Deadwyler S.A., Hampson R.E., Mu J., Whyte A. y Childers S. (1995) Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **273 (2)**: 734-743.

Draznin B., Lewis D., Houlder N., Sherman N., Adamo M., Garvey W.T., LeRoith D. y Sussman K. (1989) Mechanism of insulin resistance induced by sustained levels of cytosolic free calcium in rat adipocytes. *Endocrinol.*, **125 (5)**: 2341-2349.

Emami S. y Perry M.C. (1986) Requirement for bivalent cations in the actions of insulin and sodium nitroprusside on metabolism in rat adipocytes. *FEBS Lett.*, **200 (1)**: 51-57.

Fain J.N. y García-Sáinz J.A. (1983) Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid Res.*, **24 (8)**: 945-966.

Foster D.O. y Frydman M.L. (1978) Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Canadian J. Physiol. Pharmacol.*, **56**: 110-122.

Garber S.S., Hoshi T. y Aldrich R.W. (1990) Interaction of forskolin with voltage-gated K⁺ channels in PC12 cells. *J. Neurosci.*, **10 (10)**: 3361-3368.

Gaur S., Yamaguchi H. y Goodman M. (1996a) Growth hormone regulates cytosolic free calcium in rat fat cells by maintaining L-type calcium channels. *Am. J. Physiol.*, **270 (Cell Physiol., 39)**: C1478-C1484.

Gaur S., Yamaguchi H. y Goodman M. (1996b) Growth hormone increases calcium uptake in rat fat cells by a mechanism dependent on protein kinase C. *Am. J. Physiol.*, **270 (Cell Physiol., 39)**: C1485-C1492.

Girardier L. y Schneider-Picard G. (1983) α y β adrenergic mediation of membrane potential changes and metabolism in rat brown adipose tissue. *J. Physiol.*, **335**: 629-641.

Girardier L., Seydoux J. y Clausen T. (1968) Membrane potential of brown adipose tissue. A suggested mechanism for the regulation of thermogenesis. *J. Gen. Physiol.*, **52**: 925-939.

Giudicelli Y., Dieudonne M.N., Lacasa D., Pasquier Y.N. y Pecquery R. (1993) Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **48 (1)**: 91-100.

Goewert R.R., Klaven N.B. y McDonald J.M. (1983) Direct effect of insulin on the binding of calmodulin to rat adipocyte plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **258 (16)**: 9995-9999.

Gourley D.R.H. y Bethea M.D. (1964) Insulin effect on adipose tissue sodium and potassium. *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, **115**: 821-823.

Grassby P.F., Arch J.R., Wilson C. y Broadley K.J. (1987) β -adrenoceptor sensitivity of brown and white adipocytes after chronic pretreatment of rats with reserpine. *Biochem. Pharmacol.*, **36 (1)**: 155-162.

Green A., Alvarez I.M. y Misbin R.I. (1985) Vasoactive intestinal peptide inhibits insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *Am. J. Physiol.*, **249 (6/1)**: E608-E613.

Greenberg A.S., Egan J.J., Weck S.A., Moos M.C.Jr., Londos C. y Kimmel A.R. (1993) Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90 (24)**: 12035-12039.

Hales C.N. (1967) Extracellular anions and the metabolism of adipose tissue in vitro. *Biochem. J.*, **105**: 27-31.

Hales C.N. (1970) Effect of local anaesthetics on the hormonal control of rat isolated fat cells. *Diabetologia*, **6**: 47-52.

Hales C.N., Chalmers T.M., Perry M.C. y Wade D.R. (1968) Investigations of the hormonal control of lipolysis. En: Protein and polypeptide hormone (M. Margoulies, Ed.), Part 2, pp. 432-443. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.

Hales C.N. y Perry M.C. (1970) The role of ions in the hormonal control of adipose tissue. *Horm. Metab. Res. Suppl.*, **2**: 63-65.

Hardy R.W., Ladenson J.H., Hruska K.A., Jiwa A.H. y McDonald J.M. (1992) The effects of extracellular calcium and epinephrine on cytosolic-free calcium in single rat adipocytes. *Endocrinol.*, **130 (6)**: 3694-3702.

Harris-Warrick R.M. (1989) Forskolin reduces a transient potassium current in lobster neurons by a cAMP-independent mechanism. *Brain Research*, **489**: 59-66.

Hille B. (1992) Ionic channels of excitable membrane, 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland-Massachusetts-USA.

Ho R.J. y Jeanrenaud B. (1967) Insulin-like action of ouabain. I. Effect of carbohydrate metabolism. *Biochem. Biophys. Acta*, **144**: 61-65.

Ho R.J., Jeanrenaud B., Posternak T. y Renold A.E. (1967) Insulin-like action of ouabain. II. Primary antilipolytic effect through inhibition of adenyl cyclase. *Biochem. Biophys. Acta*, **144**: 74-79.

Ho R.J., Jeanrenaud B. y Renold A.E. (1966) Ouabain sensitive fatty acid release from isolated fat cells. *Experientia*, **22**: 86-92.

Horwitz B.A. y Hamilton J. (1984) α -adrenergic-induced changes in hamster (Mesocricetus) brown adipocyte respiration and membrane potential. *Comparative Biochem. and Physiol.*, **78**: 99-104.

Horwitz B.A., Hamilton J., Lucero M.T. y Pappone P.A. (1989) Catecholamine-induced cation changes in activated brown adipocytes. En: Living in the Cold II (A. Malan and B. Canguilhem, Eds.), pp. 377-386. Paris: Colloque INSERM / London: John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge.

Izawa T. y Komabayashi T. (1994) Ca^{2+} and lipolysis in adipocytes from exercise-trained rats. *J. Applied Physiol.*, **77 (6)**: 2618-2624.

Izawa T., Mochizuki T., Komabayashi T., Suda K. y Tsuboi M. (1994) Increase in cytosolic free Ca^{2+} in corticotropin-stimulated white adipocytes. *Am. J. Physiol.*, **266 (Endocrinol. Metab., 29)**: E418-E426.

Joel C.D. (1965) The physiological role of brown adipose tissue. En: Handbook of Physiology, Section 5: Adipose Tissue (A.E. Renold and G.F. Cahill, Eds.), pp. 59-85. American Physiological Society, Washington.

Kamei C., Mukai T. y Tasaka K. (1992) Histamine-induced depolarization and the cyclic AMP-protein kinase A system in isolated guinea pig adipocytes. *Jpn. J. Pharmacol.*, **60**: 179-186.

Kamei C. y Sugimoto Y. (1994) The role of ions on histamine-induced depolarization in isolated guinea pig adipocytes. *Jpn. J. Pharmacol.*, **66 (4)**: 465-469.

Kelly K.L., Deeney J.T. y Corkey B.E. (1989) Cytosolic free calcium in adipocytes. Distinct mechanisms of regulation and effects on insulin actions. *J. Biol. Chem.*, **264 (22)**: 12754-12757.

Koivisto A., Dotzler E., Ruß U., Nedergaard J. y Siemen D. (1993) Nonselective cation channels in brown and white fat cells. En: Nonselective Cation Channels: Pharmacology, Physiology and Biophysics (D. Siemen and J. Hescheler, Eds.), pp. 201-211. Birkhäuser Verlag, Basel.

Koivisto A. y Nedergaard J. (1995) Modulation of calcium-activated non-selective cation channel activity by nitric oxide in rat brown adipose tissue. *J. Physiol.*, **486(1)**: 59-65.

Koivisto A., Ringer T., Ruß U., Nedergaard J. y Siemen D. (1994) Pharmacology and regulation of the ion channels of the brown adipocyte plasma membrane. En: Thermal Balance in Health and Disease - Advances in Pharmacological Sciences. Recent Basic Research and Clinical Progress (Z. Zeisberger, E. Schönbaum and P. Lomax, Eds.), pp. 103-108. Birkhäuser Verlag, Basel.

Krahenbuhl L. y Burgi U. (1987) Evidence that the effect of triiodothyronine on epinephrine-stimulated lipolysis in white adipose tissue is mediated via nuclear receptors. *Horm. Metab. Res. Suppl.*, **17**: 20-22.

Kuo J.F. y DeRenzo E.C. (1969) A comparison of the effects of lipolytic and antilipolytic agents on adenosine 3', 5'-monophosphate levels in adipose cells as determined by prior labeling with adenine-8-¹⁴C. *J. Biol. Chem.*, **224 (9)**: 2252-2257.

Kypson J., Triner L. y Nahas G.G. (1968) Effect of ouabain and K-free medium on activated lipolysis and epinephrine-stimulated glycogenolysis. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **159 (1)**: 8-11.

Lafontan M. y Berlan M. (1993) Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.*, **34 (7)**: 1057-1091.

Langin D., Portillo M.P., Saulnier-Blanche J.S. y Lafontan M. (1991) Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.*, **199** (3): 291-301.

Langin D., Tavernier G. y Lafontan M. (1995) Regulation of β 3-adrenoceptor expression in white fat cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **9** (2): 97-106.

Lechleiter J.D., Dartt D.A. y Brehm P. (1988) Vasoactive intestinal peptide activates Ca^{2+} -dependent K^+ channels through a cAMP pathway in mouse lacrimal cells. *Neuron*, **1**: 227-235.

Letarte J., Jeanrenaud B. y Renold A.E. (1969) Ionic effects on glucose transport and metabolism by isolated mouse fat cells incubated with and without insulin. II. Effect of replacement of K^+ and of ouabain. *Biochem. Biophys. Acta*, **183**: 357-365.

Letarte J. y Renold A.E. (1969) Ionic effects on glucose transport and metabolism by isolated mouse fat cells incubated with and without insulin. III. Effect of replacement of Na^+ . *Biochem. Biophys. Acta*, **183**: 366-374.

Londos C., Brasaemle D.L., Gruia-Gray J., Servetnick D.A., Schultz C.J., Levin D.M. y Kimmel A.R. (1995) Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem. Soc. Trans.*, **23** (3): 611-615.

López E., White J.E. y Engel F.L. (1959) Contrasting requirements for the lipolytic action of corticotropin and epinephrine on adipose tissue in vitro. *J. Biol. Chem.*, **234**: 2254-2259.

Lucero M.T. y Pappone P.A. (1989) Voltage-gated potassium channels in brown fat cells. *J. Gen. Physiol.*, **93**: 451-472.

Lucero M.T. y Pappone P.A. (1990) Membrane responses to norepinephrine in cultured brown fat cells. *J. Gen. Physiol.*, **95**: 523-544.

Lytton J., Lin J.C. y Guidotti G. (1985) Identification of two molecular forms of (Na⁺, K⁺)-ATPase in rat adipocytes. Relation to insulin stimulation of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **260 (2)**: 1177-1184.

Martín A. y Luna del Castillo J.D. (1994) Bioestadística para las ciencias de la salud, 4^a ed. Ediciones Norma S.A., Madrid.

Martin D.B. y Vagelos P.R. (1965) Fatty acid synthesis in adipose tissue. En: Handbook of Physiology, Section 5: Adipose Tissue (A.E. Renold and G.F. Cahill, Eds.), pp. 211-216. American Physiological Society, Washington.

McDonald J.M., Bruns D.E. y Jarett L. (1976) Ability of insulin to increase calcium binding by adipocyte plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73 (5)**: 1542-1546.

McGill D.L. (1991) Characterization of the adipocyte ghost (Na⁺,K⁺) pump - Insights into the insulin regulation of the adipocyte (Na⁺,K⁺) pump. *J. Biol. Chem.*, **266 (24)**: 15817-15823.

McGill D. y Guidotti G. (1991) Insulin stimulates both the α 1 and the α 2 isoforms of the rat adipocyte (Na⁺, K⁺) ATPase. Two mechanisms of stimulation. *J. Biol. Chem.*, **266 (24)**: 15824-15831.

Milligan G. y Saggerson E.D. (1990) Concurrent up-regulation of guanine-nucleotide-binding proteins Gi1 α , Gi2 α and Gi3 α in adipocytes of hypothyroid rats. *Biochem. J.*, **270 (3)**: 765-769.

Miller L.V., Schlosser G.H. y Beigelman P.M. (1966) Electrical potentials of isolated fat cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **112**: 375-376.

Modolell J.B. y Moore R.O. (1967) ATPase activities of rat epididymal adipose tissue. *Biochem. Biophys. Acta*, **135**: 319-322.

Mosinger B. (1968) Control mechanisms of lipid mobilization from adipose tissue. Academia Press, Prague.

Mosinger B. (1969) Lipolytic action of EDTA and catecholamines in intact and homogenized adipose tissue. *Life Sci.*, **8/11**: 137-143.

Mosinger B. (1970) Cations and lipolytic activity in rat adipose tissue. *Horm. Metab. Res. Suppl.*, **2**: 71-75.

Mosinger B., Braun T., Kujalová V. y Wenkeová J. (1962) Metabolism of adipose tissue mobilization of fat reserve. *Cs. Gastroenterol. a Vyziva*, **16**: 206-211.

Mosinger B. y Kujalová V. (1966a) Influence of potassium on lipomobilizing effect of catecholamines in vitro. *Cs. Physiol.*, **15**: 83-88.

Mosinger B. y Kujalová V. (1966b) Potassium-dependent lipomobilizing effect of adrenaline on incubated adipose tissue. *Biochem. Biophys. Acta*, **144**: 556-561.

Mosinger B. y Vaughan M. (1967a) Effect of electrolytes on epinephrine stimulated lipolysis in adipose tissue in vitro. *Biochem. Biophys. Acta*, **144**: 556-568.

Mosinger B. y Vaughan M. (1967b) The action of 3'-5'-adenosine monophosphate on lipolysis in rat adipose tissue. *Biochem. Biophys. Acta*, **144**: 569-575

Muraki K., Imaizumi Y. y Watanabe M. (1994) Effects of noradrenaline on membrane currents and action potential shape in smooth muscle cells from guinea-pig ureter. *J. Physiol.*, **481 (3)**: 617-627.

Nanberg E., Connolly E. y Nedergaard J. (1985) Presence of a Ca^{2+} -dependent K^+ -channel in brown adipocytes. Possible role in maintenance of α_1 -adrenergic stimulation. *Biochem. Biophys. Acta*, **844**: 42-49.

Ni Z., Smogorzewski M. y Massry S.G. (1994) Effects of parathyroid hormone on cytosolic calcium of rat adipocytes. *Endocrinol.*, **135 (5)**: 1837-1844.

Olansky L. (1996) Diabetes mellitus and glucose metabolism. En: *Essentials of Pathophysiology* (C.E. Kaufman and P.A. McKee, Eds.), pp. 239-248. Little, Brown and Company, Boston.

Pappone P.A. y Lee S.C. (1995) α -Adrenergic stimulation activates a calcium-sensitive chloride current in brown fat cells. *J. Gen. Physiol.*, **106**: 231-258.

Pappone P.A. y Lucero M.T. (1992) Potassium channel block does not affect metabolic responses of brown fat cells. *Am. J. Physiol.*, **262 (Cell Physiol., 31)**: C678-C681.

Pardell H., Cobo E. y Canela J. (1986) *Manual de bioestadística*. Masson, S.A., Barcelona.

Pecquery R., Dieudonne M.N., Cloix J.F., Leneveu M.C., Dausse J.P. y Giudicelli Y. (1995) Enhancement of the expression of the α_2 -adrenoreceptor protein and mRNA by a direct effect of androgens in white adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206 (1)**: 112-118.

Perry M.C. (1969) Studies on the hormonal regulation of metabolism in isolated fat cells. Ph. D. Thesis., University of Cambridge.

Perry M.C. y Hales C.N. (1967) The chloride permeability of isolated fat cells. *Biochem. J.*, **105**: 27-32.

Perry M.C. y Hales C.N. (1969) Rates of efflux and intracellular concentrations of potassium, sodium and chloride ions in isolated fat cells from the rat. *Biochem. J.*, **115**: 865-871.

Perry M.C. y Hales C.N. (1970) Factors affecting the permeability of isolated fat-cells from the rat to [⁴²K] potassium and [²⁶Cl] chloride ions. *Biochem. J.*, **117**: 615-621.

Pershadsingh H.A., Gale R.D., Delfert D.M. y McDonald J.M. (1986) A calmodulin dependent Ca²⁺-activated K⁺ channel in the adipocyte plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135 (3)**: 934-941.

Pershadsingh H.A. y McDonald J.M. (1979) Direct addition of insulin inhibits a high affinity Ca²⁺-ATPase in isolated adipocyte plasma membranes. *Nature*, **281**: 495-497.

Pershadsingh H.A., Lee L.Y. y Snowdowne K.W. (1989) Evidence for a sodium/calcium exchanger and voltage-dependent calcium channels in adipocytes. *FEBS Lett.*, **244 (1)**: 89-92.

Pershadsingh H.A., Shade D.L., Delfert D.M. y McDonald J.M. (1987) Chelation of intracellular calcium blocks insulin action in the adipocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 1025-1029.

Petersen O.H. y Wakui M. (1990) Oscillating intracellular Ca²⁺ signals evoked by activation of receptors linked to inositol lipid hydrolysis: mechanism of generation. *J. Membr. Biol.*, **118**: 93-105.

Ramírez-Ponce M.P., Mateos J.C., Carrión N. y Bellido J.A. (1996) Voltage-dependent potassium channels in white adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **223 (2)**: 250-256.

Repp H., Matzek A., Draheim H., Malettke N. y Dreyer F. (1995) Epidermal growth factor, platelet-derived growth factor AB, insulin, lysophosphatidic acid, and serum modulate K⁺ channel properties in chicken embryo fibroblasts. *Cell. Physiol. Biochem.*, **5 (3)**: 145-154.

Ruß U., Ringer T. y Siemen D. (1993) A voltage-dependent and a voltage-independent potassium channel in brown adipocytes of the rat. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1153 (2)**: 249-256.

Sabanov V. y Nedergaard J. (1995) Chloride channels in brown adipocyte plasma membranes: candidates for mediation of α_1 -adrenergic depolarization? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211 (2)**: 639-647.

Sacks D.B., Davis H.W., Crimmins D.L. y McDonlad J.M. (1992) Insulin-stimulated phosphorylation of calmodulin. *Biochem. J.*, **286 (1)**: 211-216.

Saggerson E.D. (1986) Sensitivity of adipocyte lipolysis to stimulatory and inhibitory agonists in hypotiroidism and starvation. *Biochem. J.*, **238 (2)**: 387-394.

Saggerson E.D. y Jamal Z. (1990) Differences in the properties of A1-type adenosine receptors in rat white and brown adipocytes. *Biochem. J.*, **269 (1)**: 157-161.

Saggerson E.D., Orford M., Chatzipanteli K. y Shepherd J. (1991) Diabetes decreases sensitivity of adipocyte lipolysis to inhibition by G_i-linked receptor agonists. *Cellul. Signall.*, **3 (6)**: 613-624.

Schimmel R.J. (1973) The influence of extracellular calcium ion on hormone-activated lipolysis. *Biochem. Biophys. Acta*, **326**: 272-278.

Schimmel R.J., McCarthy L. y McMahon K.K. (1983) α 1-adrenergic stimulation of hamster brown adipose respiration. *Am. J. Physiol.*, **244**: C362-C368.

Schneider-Picard G., Coles J.A. y Girardier L. (1985) α - and β -adrenergic mediation of changes in metabolism and Na^+/K^+ exchange in rat brown fat. *J. Gen. Physiol.*, **86**: 169-188.

Servetnick D.A., Brasaemle D.L., Gruia-Gray J., Kimmel A.R., Wolff J. y Londos C. (1995) Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J. Biol. Chem.*, **270 (28)**: 16970-16973.

Shapiro B. (1965) Triglyceride metabolism. En: Handbook of Physiology, Section 5: Adipose Tissue (A.E. Renold and G.F. Cahill, Eds.), pp. 217-223. American Physiological Society, Washington.

Siemen D. y Reuhl T. (1987) Non-selective cationic channel in primary cultured cells of brown adipose tissue. *Pflügers Arch.*, **408**: 534-536.

Skou J.C. (1965) Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol. Rev.* **45**: 596-617.

Stark R.J., Read P.D. y O'Doherty J. (1980) Insulin does not act by causing a change in membrane potential of intracellular free sodium and potassium concentration of adipocytes. *Diabetes*, **29**: 1040-1043.

- Tavernier G., Galitzky J., Valet P., Remaury A., Bouloumie A., Lafontan M. y Langin D.** (1995) Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine-induced lipolysis in rat adipocytes. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. and Metab.)*, **31** **268** (6/1): E1135-E1142.
- Taylor R.E.** (1959) Effect of procaine on electrical properties of squid axon membrane. *Am. J. Physiol.*, **169**: 1071-1077.
- Tebar F., Ramírez I. y Soley M.** (1993) Epidermal growth factor modulates the lipolytic action of catecholamines in rat adipocytes. Involvements of a Gi-protein. *J. Biol. Chem.*, **268** (23): 17199-17204.
- Torres-Márquez M.E., Romero-Avila M.T., González-Espinosa C. y García-Sáinz J.A.** (1992) Characterization of rat white fat cell α 1B-adrenoceptors. *Mol. Pharmacol.*, **42** (3): 403-406.
- Touabi M. y Jeanrenaud B.** (1970) Lipolysis and potassium accumulation in isolated fat cells. Effect of insulin and lipolytic agents. *Biochem. Biophys. Acta.* **202**: 486-495.
- Trayhurn P. y Nicholls D.G.** (1986) Brown Adipose Tissue (E. Arnold, Ed.), pp. 374-392, London.
- Uehara A., Habara Y. y Kuroshima A.** (1986) Effect of cold acclimation on glucagon receptors of rat white adipocytes. *Jpn. J. Physiol.*, **36** (5): 891-903.
- Vague J. y Fenasse R.** (1965) Comparative anatomy of adipose tissue. En: Handbook of Physiology, Section 5: Adipose Tissue (A.E. Renold and G.F. Cahill, Eds.), pp. 25-36. American Physiological Society, Washington.

Vallano M.L., Lee M.Y. y Sonenberg M. (1983) Hormones modulate adipocyte membrane potential ATP and lipolysis via free fatty acids. *Am. J. Physiol.*, **245** (*Endocrinol. Metab.*, **8**): E266-E272.

Valverde M.A., Díaz M., Sepúlveda F.V., Gill D.R., Hyde S.C. y Higgins C.F. (1992) Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature*, **355**: 830-833.

Weber A. y Siemen D. (1989) Permeability of the non-selective channel in brown adipocytes to small cations. *Pflügers Arch.*, **414**: 564-570.

Wickler S.J., Horwitz B.A., Flaim S.F. y LaNoue K.F. (1984) Isoproterenol-induced blood flow in rats acclimated to room temperature and cold. *Am. J. Physiol.*, **246**: R747-R752.

Williams J.A. y Matthews E.K. (1974a) Effects of ions and metabolic inhibitors on membrane potential of brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, **227**: 981-986.

Williams J.A. y Matthews E.K. (1974b) Membrane depolarization, cyclic AMP, and glycerol release by brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, **227**: 987-992.

Williamson J.R. y Lacy P.E. (1965) Structural aspects of adipose tissue: A summary. En: *Handbook of Physiology, Section 5: Adipose Tissue* (A. E. Renold and G. F. Cahill, Eds.), pp. 201-210. American Physiological Society, Washington.

Xu X., De Pergola G., Eriksson P.S., Fu L., Carlsson B., Yang S., Eden S. y Bjorntorp P.W. (1993) Postreceptor events involved in the up-regulation of the β -adrenergic receptor mediated lipolysis by testosterone in rat white adipocytes. *Endocrinol.*, **132** (4): 1651-1657.

Zbicz K.L. y Weight F.F. (1985) Transient voltage and calcium-dependent outward currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **53**: 1038-1058.

Ziegler R., Jobst W., Minne H. y Faulhaber J.D. (1980) Calciotropic hormones and lipolysis of human adipose tissue: role of extracellular calcium as conditioning but not regulating factor. *Endokrinologie*, **75 (1)**: 77-88.

Zierler K.L. y Rabinowitz D. (1963) Roles of insulin and growth hormone, based on studies of forearm metabolism in man. *Medicine*, **42**: 385-402.

Zierler K.L. y Rabinowitz D. (1964) Effect of very small concentrations of insulin on forearm metabolism. Persistence of its action on potassium and free fatty acids without its effect on glucose. *J. Clin. Invest.*, **43**: 950-962.