



**Respuestas eléctricas inducidas por la angiotensina II en
astrocitos del cuerpo calloso de la rata postnatal, en cultivo.**

Marcelino Montiel Herrera

Instituto de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis que presenta el Ingeniero Bioquímico Marcelino Montiel Herrera, como
requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Campus Juriquilla, Querétaro, México.

Noviembre del 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

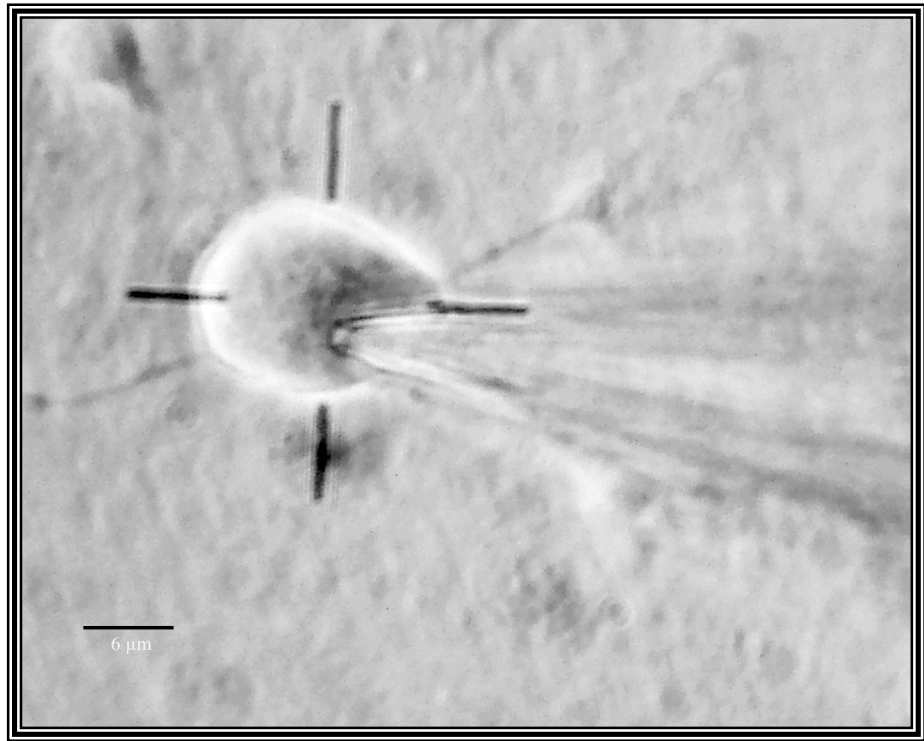
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**“Discovery consists of seeing
what everybody has seen, thinking
what nobody has thought”**

(Albert Szent-Györgyi)



Agradecimientos

A Dios y a mi Virgencita de Guadalupe, que nunca me han fallado y que me siguen guiando, a través de este espacio que día con día se expande y se me escapa de las manos, y al parecer, el fin es inevitable.

A mis padres y hermanos: Ana Angélica Herrera León y Marco Antonio Montiel Beaven, Angélica Suset y Marco Antonio; siempre en mis pensamientos y en mi corazón, hasta morir. ¡¡Siempre los extraño, me hacen mucha falta!!

A la música que tanto me ha enseñado; comprender el movimiento y sus alrededores, ser mi guía al explorar mi persona, mis sentimientos y estar conmigo en momentos de desespero experimental.

A Jim Morrison, Saúl Hernández, U2, Bob Dylan, Pink Floyd, EMF, Pearl Jam, Héroes del Silencio, Gianluca Grignani, Silvio Rodríguez, Led Zepellin, Skid row, Guns and Roses, Sepulture, the cranberries, Zoé y sobre todo al RECODO.

A los sentimientos que se han involucrado en mí de alguna manera, los cuales luchan contra mis demonios para tratar de hacerme humilde, honesto y un buen ciudadano.

A todos aquellos premios Nobel de Ciencia y de la Paz, por su presencia y por su aporte a la humanidad, que de alguna manera me inspiran para tratar de ser mejor cada día y me impulsan a ganar el mío.

A Aristóteles, Sir. Isaac Newton, Poisson, Gauss-Jordan, Albert Einstein, Albert Szent-Györgyi y todos aquellos grandes pensadores que han tenido la sensibilidad de comprender este medio que tan amablemente nos rodea en el tercer planeta desde el sol.

A mis amigos que siempre han estado ahí indiscutiblemente e incondicionalmente en tiempos de felicidad y dolor.

A mis compañeros de generación de la Maestría, Lorena, Ariel, Ulises, Nancy, Lyzette, Berenice, Omar, Salvador, Mónica y Jessica, por el apoyo académico y humano que me brindaron durante mi estancia en el posgrado.

A mis compañeros del laboratorio: Griselda, Miriam, Elizabeth, Daniel, Jorge, Ana María, Ulises, Ariel, Flor, Angélica, Irma, Marina, Leticia, Efrén, Berenice, Monserrat, Suzan, al Doc Colunga y a Miledi, por su apoyo, discusión de mi trabajo de investigación y sobre todo por su amistad y comprensión.

A los doctores, Aurea Orozco, Magdalena Giordano, Carmen Clapp, Gonzalo Martínez, Ataúlfo Martínez, Stefan Mihalescu y a Raúl Paredes por su amistad y buenos consejos académicos.

Al Dr. Ricardo Miledi por sus buenos consejos y discusión en la realización de este trabajo. Sin olvidar su apoyo y amistad.

Al Dr. José Jesús García Colunga, por ser más que un tutor de tesis, es decir, por brindarme su amistad, apoyo incondicional y sobre todo por su paciencia. Por ser un excelente Profesor y por ayudarme a caminar por el sendero de “hacer ciencia”.

A la Quim. Leonor Casanova Rico, al M. en C. Leopoldo González Santos, a la Ing. Elsa Nydia Hernández Rios, a la Psic. María de Lourdes Lara Ayala, a la Lic. Pilar Galarza Barrios, al Ing. Omar González Hernández y al MVZ. José Martín García Servín, por su incondicional apoyo académico para la elaboración de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Dirección General de Estudios de Posgrado y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme su apoyo en la realización de este trabajo.

Para ti mi amor, por estar aquí para mi, en tiempos de gloria y de desespero. Siempre en mi corazón, en mi razón, en mi espíritu y en toda mi vida sobre todas las cosas.

Índice General

	Pág.
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas	10
Resumen	Error! Bookmark not defined.
Introducción	Error! Bookmark not defined.
Sistema nervioso central, cuerpo caloso y células gliales	Error! Bookmark not defined.
Angiotensina II	Error! Bookmark not defined.
Receptores a angiotensina II	Error! Bookmark not defined.
Receptor AT₁	Error! Bookmark not defined.
Receptor AT₂	Error! Bookmark not defined.
Hipótesis	Error! Bookmark not defined.
Objetivo general	Error! Bookmark not defined.
• Objetivos específicos	Error! Bookmark not defined.
Justificación	Error! Bookmark not defined.
Materiales y métodos	Error! Bookmark not defined.
• Cultivos gliales	Error! Bookmark not defined.
• Inmunocitoquímica	Error! Bookmark not defined.
• Electrofisiología	Error! Bookmark not defined.
• Soluciones	Error! Bookmark not defined.
Resultados	Error! Bookmark not defined.
• Cultivos celulares	Error! Bookmark not defined.

• Inmunocitoquímica	Error! Bookmark not defined.
• Electrofisiología	Error! Bookmark not defined.
➤ Astrocitos del cuerpo calloso de ratas recién nacidas	Error! Bookmark not defined.
defined.	
➤ Ratas de tres semanas de edad	Error! Bookmark not defined.
Discusión	Error! Bookmark not defined.
Conclusiones	Error! Bookmark not defined.
Bibliografía	Error! Bookmark not defined.

Índice de Figuras

Figura	Título	Pág.
1	Cerebro de rata visto en un corte sagital	14
2	Micrografía electrónica que muestra una célula glial no diferenciada del cuerpo caloso de ratón de 6 días de edad	15
3	Micrografía electrónica que muestra características de un astrocito maduro	16
4	Estructura de la angiotensina II	18
5	Síntesis de la angiotensina II	20
6	Distribución de los receptores a AT ₁ y AT ₂ en el cerebro de la rata	24
7	Célula sujeta a fijación de voltaje	35
8	Células del cuerpo caloso de ratas recién nacidas al noveno día de cultivo	40
9	Células del cuerpo caloso de ratas recién nacidas al sexto día de cultivo	41
10	Células del cuerpo caloso de ratas recién nacidas al sexto día de cultivo	41
11	Células positivas a GFAP.....	42
12	Células confluentes del cuerpo caloso de ratas recién nacidas a los 50 días de cultivo.....	44

Figura	Título	Pág.
13	Corriente entrante inducida por la Ang II en un astrocito del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al sexto día de cultivo	45
14	Corriente iónica inducida por la Ang II en un astrocito del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al cuarto día de cultivo y su relación corriente-voltaje	46
15	Respuesta eléctrica inducida por la Ang II en un astrocito del cuerpo calloso al sexto día de cultivo	48
16	Corrientes iónicas generadas por rampas de voltaje a dos potenciales de equilibrio para el ion K ⁺	50
17	Corrientes de potasio sensibles a TEA generadas por rampas de voltaje.....	51
18	Corriente saliente inducida por la Ang II y el CGP-42112A en un astrocito del cuerpo calloso de ratas recién nacidas, al cuarto día de cultivo.....	52
19	Efectos del CGP-42112A sobre las corrientes entrantes evocadas por la Ang II, en un astrocito del cuerpo calloso de ratas recién nacidas, al quinto día de cultivo.....	53
20	Corrientes entrantes inducidas por el CGP-42112A y la Ang II, en un astrocito del cuerpo calloso de ratas de tres semanas de edad, al noveno día de cultivo.....	55

Índice de Tablas

Tabla	Título	Pág.
1	Distribución de los receptores AT ₁ y AT ₂ en el sistema nervioso central de los mamíferos.....	23

Resumen

En las células gliales, los eventos electrofisiológicos producidos por la angiotensina II (Ang II) han sido poco estudiados. Utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa, se encontró que 1 μ M Ang II o el agonista parcial del receptor AT₂, CGP-42112A (20 nM), indujeron corrientes eléctricas mediadas principalmente por la activación del receptor AT₂, en ~25% de las células cultivadas del cuerpo calloso (CC), tanto de ratas recién nacidas como de tres semanas de edad. Las células cultivadas dieron marca positiva (>90%) ante el ensayo inmunocitoquímico contra la proteína ácido-glio-fibrilar (GFAP), marcador específico para los astrocitos maduros. En los cultivos de astrocitos del CC de ratas recién nacidas, la Ang II generó en 47 de un total de 169 células, una corriente entrante promedio de 113 pA. Además, en siete de un total de 169 células, una corriente saliente promedio de 66 pA. El resto de las células no respondió. En los cultivos de astrocitos del CC de ratas de tres semanas de edad, la Ang II produjo en 11 de un total de 54 células, una corriente entrante promedio de 399 pA. El resto de las células no respondió. Utilizando un protocolo de rampas de voltaje que barría desde -120 a 80 mV en 1 s, la Ang II provocó una disminución en la conductancia de la membrana celular de los astrocitos del CC de ratas recién nacidas, debido a un bloqueo de las corrientes de potasio de rectificación tardía. Por otro lado, en los cultivos de astrocitos del CC de ratas de tres semanas de edad, la Ang II no generó un efecto claro, debido a que las respuestas producidas fueron muy variadas, inclusive en la misma célula. Con relación a los estudios farmacológicos, el CGP-42112A (15 nM) bloqueó las corrientes activadas por la Ang II en cinco astrocitos cultivados del CC de ratas recién nacidas. Además, el antagonista del receptor AT₁, ZD7511 (10 nM) no tuvo efectos sobre las respuestas generadas por la

Ang II en dos astrocitos del CC de ratas de tres semanas de edad. Este estudio muestra, que los cultivos de astrocitos del CC de ratas recién nacidas y de tres semanas de edad, expresan receptores funcionales para la Ang II del tipo AT₂; y por primera vez, las características eléctricas que produce la Ang II en los astrocitos del CC de la rata en dos etapas del desarrollo.

Introducción

El sistema nervioso central (SNC) está constituido de células gliales, neuronas y tejido conectivo, entre otros elementos. Cada componente desempeña una función biológica de acuerdo a las necesidades fisiológicas del organismo.

Las células gliales desarrollan múltiples funciones en el SNC, como la síntesis de mielina, control iónico extracelular, modulación sináptica y suministro de nutrientes a las neuronas, entre otros. Actualmente, las glías han dejado de considerarse como un mero componente de sostén neuronal, ya que se ha comprobado que realizan funciones protagónicas en la fisiología del SNC.

El estudio electrofisiológico de las células gliales durante el desarrollo ha sido abordado escasamente por pocos grupos de investigación. Por ende, esta tesis trata de ampliar la información actual, referente a las características electrofisiológicas de un tipo de célula glial, *el astrocito*, utilizando como modelo de estudio al CC y a la angiotensina II. El CC, contiene una cantidad considerable de células gliales (>90%) y es un tejido fácil de manipular. La angiotensina II, es un transmisor de carácter peptídico que activa específicamente a dos tipos de receptores: AT₁ y AT₂. Estos receptores tienen la particularidad de expresarse de manera diferencial en etapas tempranas y adultas del desarrollo. En consecuencia, ambas herramientas ayudarán a comprender las características electrofisiológicas de los astrocitos, en función del desarrollo. Es decir, conoceremos algunas características eléctricas que presentan los astrocitos durante el desarrollo de la rata, por la expresión diferencial de los receptores a angiotensina II.

Sistema nervioso central, cuerpo calloso y células gliales

El proceso de neurulación durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, da pie a la formación del tubo neural, el cual dará origen al cerebro y médula espinal (Wolpert *et al.*, 1998).

El cerebro de los mamíferos en general, está constituido, en sentido caudo-rostral, por el tallo cerebral, cerebro medio y cerebro anterior (Carpenter, 1994). Este último, está compuesto por el diencéfalo, ganglios basales y dos hemisferios cerebrales. Estos están divididos por una cisura interhemisférica, limitada por una lámina horizontal de sustancia blanca, conocida como el cuerpo calloso (CC) (Figura 1).

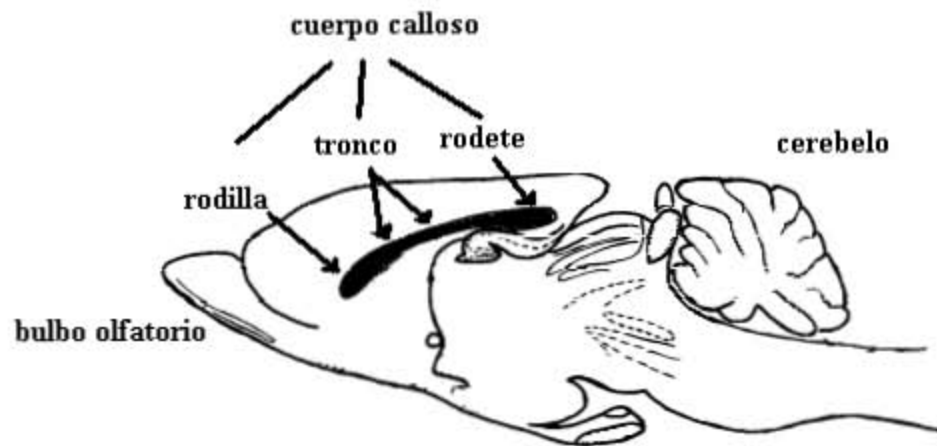


Figura 1. Cerebro de rata visto en un corte sagital. El esquema resalta en color negro al cuerpo calloso. Esta comisura está constituida por la rodilla, tronco y rodete, en una vista antero-posterior, respectivamente.

En los tetrápodos euplacentarios, el CC es la comisura más grande del cerebro y conecta áreas corticales homónimas de un hemisferio al otro. Las lesiones en esta comisura se relacionan a diversas patologías, como la falta de ilación de ideas en humanos y la modificación de la conducta de exploración en la rata (Sullivan *et al.*, 1993), entre otras.

El CC está compuesto por tres segmentos, la rodilla (genu), tronco (cuerpo) y rodete (esplenio), viéndose en cortes sagitales (ver Figura 1). Presenta más de 90% de células precursoras de glías desde los primeros días de desarrollo en los mamíferos (por ejemplo, en el ratón) (Sturrock, 1976, citado en Berger *et al.*, 1991; Bongarzone *et al.*, 1998), manteniendo estas características durante las primeras semanas de desarrollo (ver Figura 2), para después diferenciarse en células gliales.

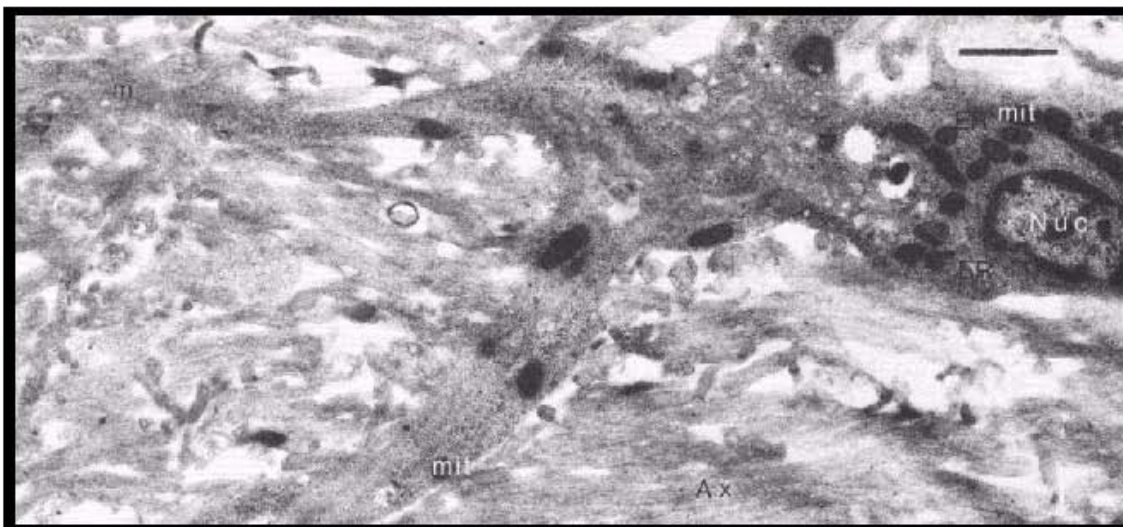


Figura 2. Micrografía electrónica que muestra una célula glial no diferenciada del cuerpo calloso de ratón de seis días de edad. Esta célula presenta abundantes mitocondrias (mit) y retículo endoplásmico rugoso (ER) en el pericarion celular, además de ribosomas libres y microtúbulos en las prolongaciones del soma. Ax, axones no mielinizados; Nuc, núcleo. Barra negra, 1 μm (micrografía modificada de Berger *et al.*, 1991).

Sin embargo, es importante mencionar, que en algunas células a partir del día 10 del desarrollo del ratón, se pueden observar en el citoplasma características que distinguen a los astrocitos maduros (ver Figura 3).

Las células gliales participan activamente en diversos eventos fisiológicos en el SNC, como en el procesamiento de la información, modulación sináptica, remoción de transmisores químicos y excesos de potasio extracelular, proliferación y diferenciación

celular (Kuffler *et al.*, 1966; Orkand *et al.*, 1966; Sontheimer *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1991; Kandel *et al.*, 1995; Bernstein *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2001), entre otros.

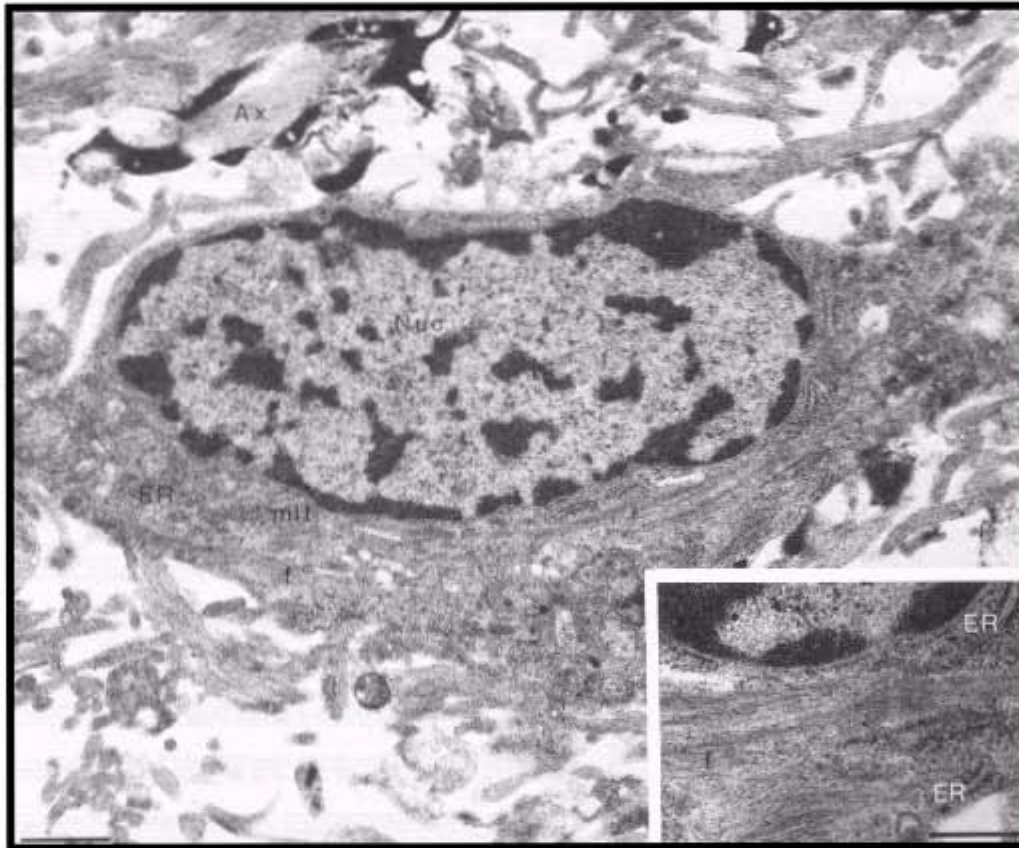


Figura 3. Micrografía electrónica que muestra características de un astrocito maduro. La célula presenta numerosos filamentos intermedios (f), cisternas cortas del retículo endoplásmico rugoso (ER) ribosomas libres y pocas mitocondrias (mit). Ax, axones, Nuc, núcleo. Barra negra a la izquierda de la micrografía: 1 µm. Nótese que en el recuadro son más evidentes los filamentos y las cisternas del retículo endoplásmico rugoso. Barra negra dentro del recuadro: 0.5 µm (micrografía modificada de Berger *et al.*, 1991).

Existen varios tipos de células gliales, como son los astrocitos, células de Bergman, células endimarias, microglías, células de Müller, oligodendrocitos, pituicitos y células de Schwann (Brodal, 1998). Todas ellas pertenecen al SNC, a excepción de las células de Schwann, que sintetizan la mielina en el sistema nervioso periférico.

El origen de las células gliales se da en las etapas tempranas del desarrollo, cuando las células precursoras de glía (glioblastos) se diferencian en astrocitos, células endimarias, microglía y oligodendrocitos. Es importante mencionar que los oligodendrocitos son responsables de la mielinización en el SNC.

Las características eléctricas y metabólicas de los astrocitos son poco conocidas durante el desarrollo de los organismos. Por ejemplo, se sabe que los astrocitos expresan un repertorio amplio de receptores a transmisores y canales iónicos (Ritchie, 1992). Tales como receptores a los ácidos γ -aminobutírico (GABA), glutámico y kaínico; péptidos como la sustancia P, bradicinina y angiotensina II (Ang II); aminas como la dopamina y serotonina; y ésteres de colina como la acetilcolina, entre otros (ver más adelante); canales de calcio, sodio y potasio activados por voltaje, canales activados por calcio y canales selectivos a aniones, entre otros (Bevan *et al.*, 1984; Gray *et al.*, 1984; MacVicar, 1984; Steinhäuser *et al.*, 1994; Walz, 2002). Sin embargo, poco es sabido acerca de las señales que inducen y regulan la expresión y distribución de receptores y canales iónicos durante el desarrollo (Dietzel, 1995), así como su localización en los diferentes tipos de células gliales. Por ejemplo, con la utilización de varias estrategias experimentales, como la electrofisiología, hibridación *in situ*, cultivos celulares, rebanadas de cerebro e inmunohistoquímica, entre otras, se ha podido detectar la presencia de receptores a transmisores químicos en las células gliales de diferentes especies como en bovino, humano, caracol, rata y ratón; transmisores como la Ang II, dopamina, ácido glutámico, histamina, GABA, norepinefrina, sustancia P, bradicinina, serotonina, acetilcolina, endotelinas, somatostatina y ATP (Hösli *et al.*, 1989; Müller *et al.*, 1992; Bernstein *et al.*, 1996; Montiel-Herrera *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que existe un cambio en las propiedades eléctricas de las células gliales del CC durante las primeras etapas del

desarrollo del ratón (Berger *et al.*, 1991). Por ejemplo, la Ang II induce un aumento en la concentración de calcio intracelular en las células gliales del CC del ratón en los primeros días de nacimiento, sin embargo, dicho evento no se presenta en la segunda semana de nacimiento (Bernstein *et al.*, 1996).

Angiotensina II

La angiotensina II (Ang II) es un octapéptido de ácido aspártico, arginina, valina, tirosina, isoleucina, histidina, prolina y fenilalanina (Figura 4). Es un péptido funcional asociado con el sistema cardiovascular y SNC. En ambos sistemas, la Ang II actúa regulando la presión arterial, homeostasis hidroelectrolítica y volumen sanguíneo, entre otros eventos fisiológicos (revisado en Berry *et al.*, 2001).

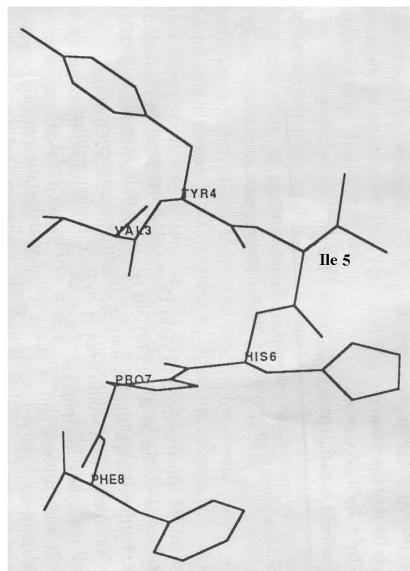


Figura 4. Estructura de la Ang II. El esquema muestra sólo el fragmento 3-8 de la Ang II (valina³, tirosina⁴, isoleucina⁵, histidina⁶, prolina⁷ y fenilalanina⁸), los cuales se han propuesto como responsables de la interacción con el receptor (Gutte, 1995). Esquema modificado de Gutte B, 1995.

La Ang II es sintetizada vía enzimática, por el sistema renina angiotensina de manera sistémica, y localmente por tejidos que poseen este sistema, como el sistema cardiovascular (revisado en Berry *et al.*, 2001 y Gard, 2002). El sistema produce varios

péptidos denominados angiotensinas, de las cuales la Ang II desempeña funciones fisiológicas, como las antes descritas.

La síntesis de Ang II ([Figura 5](#)) se lleva a cabo principalmente por una enzima denominada renina, la cual es puesta en circulación en el tejido sanguíneo, en respuesta a una caída de presión dentro de las arteriolas renales. Una vez liberada la renina, ésta rompe al angiotensinógeno (un tetradecapéptido) del hígado, para generar angiotensina I (Ang I). Esta última, puede ser sustrato de la enzima convertidora de angiotensina y de peptidasas. La primera, existe en el endotelio de la mayoría de las venas. La reacción enzimática que se lleva a cabo entre ésta y Ang I, se da principalmente en los pulmones, generando como producto de reacción a la Ang II. La segunda, que por lo general se encuentra distribuida por todo el organismo, puede generar una angiotensina de siete aminoácidos. Cabe señalar, que se han descrito vías enzimáticas alternas, por chimasas y quimotripsin-serinproteasas, las cuales pueden generar Ang II (revisado en [Berry *et al.*, 2001](#) y [Gard, 2002](#)). En este sentido, la Ang II puede ser metabolizada por peptidasas a distintas angiotensinas, como a angiotensina III (2-8), angiotensina (1-7), angiotensina (3-7) o angiotensina IV (3-8).

Con relación al SNC, la síntesis de Ang II aún no es clara. En el cerebro, componentes de la vía enzimática que produce Ang II, como la renina, angiotensinógeno y enzima convertidora de angiotensina, se han localizado principalmente en los astrocitos y plexo coroideo de tejidos circumventriculares (revisado en [Berry *et al.*, 2001](#) y [Gard, 2002](#)). Por ejemplo, [Tham *et al.* \(2001\)](#) por técnicas de inmunohistoquímica y microscopía de luz y electrónica, han localizado en el núcleo hipogloso de la rata (12° par craneal), la presencia de angiotensinógeno, Ang II y enzima convertidora de angiotensina en astrocitos y neuronas. Sugiriendo que este par craneal produce localmente Ang II.

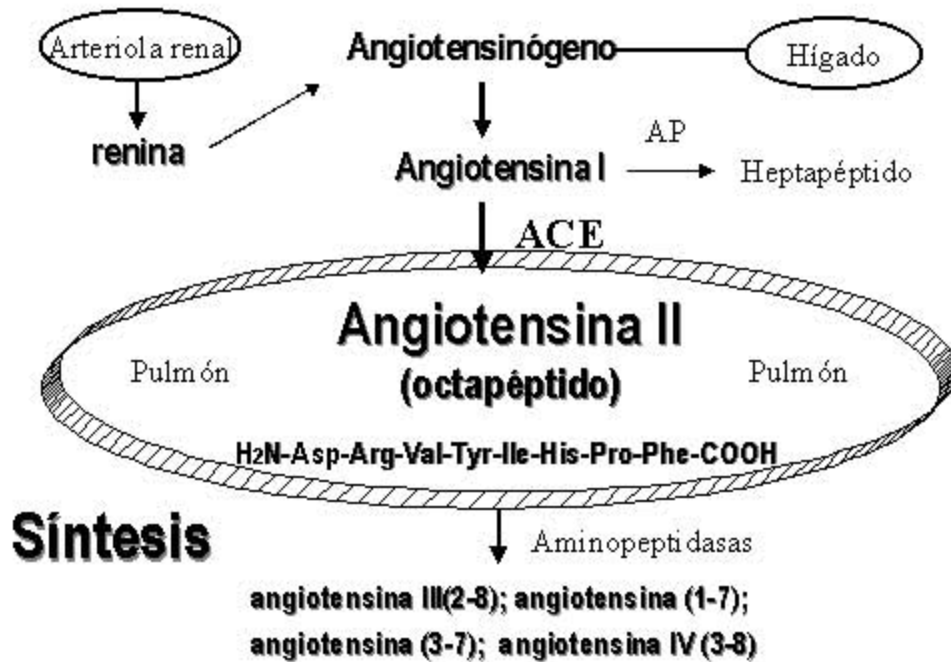


Figura 5. Síntesis de Ang II. Como se observa en el esquema, la producción de Ang II se lleva a cabo preferentemente en los pulmones. Nótese que de la Ang II se pueden generar diferentes angiotensinas. Abreviaciones: AP, aminopeptidasa; ACE, enzima convertidora de angiotensina.

En mamíferos como la rata, ratón, hámster, perro, mono y humano, la Ang II se ha localizado por radioligandos en la médula espinal, núcleo del tracto solitario, cerebro medio, cerebelo, hipotálamo, tálamo, área postrema, estriado, hipocampo y corteza cerebral (revisado en Gard, 2002). Es importante mencionar que la Ang II se ha localizado en vesículas sinápticas de neuronas que forman sinapsis con otras neuronas o que están en contacto con las venas de los órganos circumventriculares (revisado en Gard, 2002), sugiriendo un papel de neurotransmisor en el SNC. Sin embargo, la evidencia descrita hasta hoy, señala que la Ang II desempeña diferentes funciones dependiendo de su localización en el cerebro. En este sentido, la Ang II como transmisor aparentemente presenta varias funciones, ya que inyecciones intracerebroventriculares de Ang II, inducen un incremento de la presión arterial, compulsión de ingerir líquidos, alteraciones cognitivas, estimulación

de la secreción de la hormona antidiurética (arginin-vasopresina), facilitación de la secreción de la hormona adrenocorticotrópica y participación en la secreción de la hormona luteinizante (revisado en [Gard, 2002](#)).

Las concentraciones de Ang II en el cerebro de la rata, son alrededor de 50 fmoles/g de tejido, en un intervalo de 15 y 590 fmoles/g en corteza cerebral e hipotálamo, respectivamente. Dichas cantidades son mayores que las encontradas en plasma sanguíneo (17 fmoles/mL), a diferencia del angiotensinógeno, que se encuentra en cantidades iguales en hígado y cerebro (revisado en [Gard, 2002](#)).

Los datos electrofisiológicos obtenidos en cultivos celulares y rebanadas de cerebro, sugieren que la Ang II modifica diferentes tipos de conductancias iónicas, dependiendo del tipo y localización del receptor en el que actúa el péptido ([Ferguson et al., 2001](#)). Por ejemplo, la Ang II puede impactar las corrientes de tipo transitorio de potasio salientes y de rectificación tardía (ver más adelante). Las primeras pueden identificarse por su activación dependiente de voltaje, cinética rápida de inactivación y sensibilidad a bajas concentraciones de 4-aminopiridina. Las segundas aunque más variadas, pueden distinguirse por sus características farmacológicas y biofísicas.

En relación con las células gliales, sólo se ha descrito que la Ang II induce una despolarización en las membranas de los astrocitos de la médula espinal y tallo cerebral de la rata, en cultivo ([Hösli et al., 1989](#)). Sin embargo, nada es sabido acerca del tipo de corrientes que induce este octapéptido en las células gliales.

Receptores a angiotensina II

Todas aquellas angiotensinas producidas por el sistema renina angiotensina (ver [Figura 5](#)), son activas y realizan su función a través de receptores específicos (revisado en [Berry et al., 2001](#) y [Gard, 2002](#)).

Se han descrito cuatro receptores de angiotensinas: AT₁, AT₂, AT₃ y AT₄ (revisado en [Berry et al., 2001](#) y [Gard, 2002](#)). Son considerados como receptores metabotrópicos, ya que generalmente están acoplados a proteínas G y producen segundos mensajeros (ver más adelante).

La Ang II es el principal ligando de los receptores del tipo AT₁ y AT₂, ya que se ha descrito que la angiotensina (1-7) también puede activar al receptor AT₁. Estos receptores son los más estudiados actualmente, ya que se han definido con bases histoquímicas, electrofisiológicas, farmacológicas y de biología molecular. Por ejemplo, los receptores AT₁ y AT₂, se han localizado en órganos y tejidos de una amplia variedad de especies, como en el riñón, corazón, cerebelo, colículos cerebrales, nervio óptico, hipocampo, neocorteza cerebral y bulbo olfatorio, entre otros (ver [Tabla 1](#); [Figura 6](#)). Se conoce que la activación de los receptores de Ang II, produce cambios de corrientes y metabolismo en las células que los poseen (ver más adelante). Además los receptores de Ang II presentan propiedades farmacológicas diferentes en neuronas y células gliales en cultivo, así como en regiones subcorticales de la rata (revisado en [Gard, 2002](#)). Por secuenciación génica, se han podido caracterizar dos subtipos de receptores AT₁, el AT_{1a} y AT_{1b} (de [Gasparo et al., 2000](#)).

Receptor AT₁

El gen que codifica al receptor AT₁ está ubicado en el brazo largo del cromosoma 3 en humano y distribuido ampliamente en el sistema cardiovascular, renal y nervioso. En los roedores existen 2 isoformas, AT_{1a} y AT_{1b}, con más del 95% de homología. El subtipo AT_{1a} predomina en el cerebro y el AT_{1b} en la glándula pituitaria y corteza adrenal del adulto (Tonelli *et al.*, 2000). En la **Tabla 1** y **Figura 6** se muestra la distribución del receptor en el SNC de los mamíferos y de la rata, respectivamente.

Tabla 1. Distribución de los receptores AT₁ y AT₂ en el SNC de los mamíferos.

Estructura	AT ₁	AT ₂	Estructura	AT ₁	AT ₂
Amígdala	√	√	Locus coeruleus	√	√
Adenohipófisis	√		Núcleo preóptico medio	√	
Área postrema	√		Núcleo acumbens		
Caudado putamen	√	√	Núcleo del tracto olfatorio lateral	√	
Cerebelo	√	√	Núcleo del tracto solitario	√	
Corteza cerebral			Órgano vasculoso terminal lateral	√	
Geniculado lateral		√	Núcleo paraventricular	√	
Geniculado medial		√	Corteza piriforme	√	
Globo pálido		√	Septo		√
Habénula lateral	√	√	Órgano siubfornical	√	
Habénula medial	√	√	Colículo superior	√	
Hipocampo			Núcleo supraóptico	√	
Núcleo hipogloso		√	Tálamo		√
Colículo inferior		√	Área ventral tegmental		√
Núcleo olivar inferior	√	√			
Tracto olfatorio lateral					

Tabla modificada de Gard PR (2002). La “√” indica la presencia del receptor. SNC, sistema nervioso central.

El receptor AT₁ es una proteína constituida de 359 aminoácidos. Se ha propuesto que posee siete segmentos transmembranales y que está acoplado a proteínas G. Al interactuar el receptor con la Ang II, se produce un intercambio de GDP por GTP en la proteína que intercambia inosítidos de guanina, generando la activación del complejo αβγ

de dicha proteína, induciendo que ésta libere a la subunidad α y al complejo $\beta\gamma$, para producir eventos intracelulares vía segundos mensajeros (revisado en [Berry et al., 2001](#)). Cabe mencionar que el complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G, tiene la capacidad de modular a canales de calcio y potasio ([Dolphin, 2003](#)).

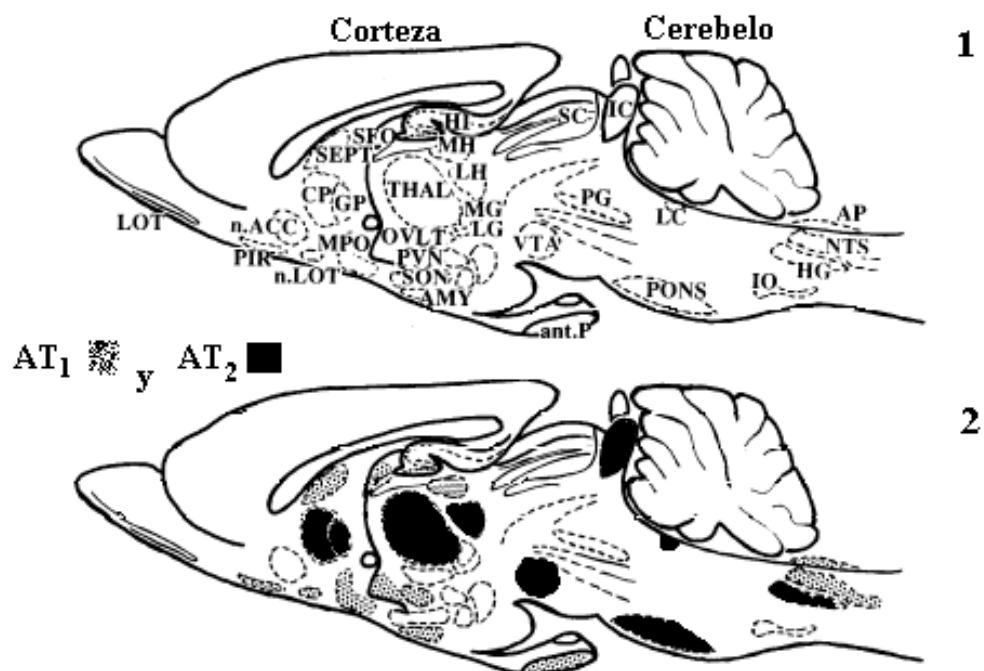


Figura 6. Distribución de los receptores AT_1 y AT_2 en el cerebro de la rata. En el esquema uno y dos, se muestran las regiones en donde se han localizado los receptores a angiotensina II. Abreviaciones: AMY, amígdala; AP, área postrema; Ant.P, adenohipófisis; CP, caudado putamen; GP, globo pálido; HG, núcleo hipogloso; HI, hipocampo; IC, colículo inferior; IO, núcleo olivar inferior; LOT, tracto olfatorio lateral; LG, geniculado lateral; LH, habénula lateral; LC, locus coeruleus; MG, geniculado medio; MH, habénula media; MPO, núcleo preóptico medial; n. LOT, núcleo del tracto olfatorio lateral; n. ACC, núcleo acumbens; NTS, núcleo del tracto solitario; OVLT, órgano vasculoso lateral terminal; PG, periacueducto; PVN, núcleo paraventricular; PIR, corteza piriforme; SEPT, septo; SFO, órgano subfornical; SC, colículo superior; SON, núcleo supraóptico; THAL, tálamo; VTA, área tegmental ventral. Esquemas modificados de [Wright y Harding \(1997\)](#).

Típicamente al activarse el receptor AT_1 por la Ang II, activa a la fosfolipasa C a través de la proteína Gq, la cual estimula la hidrólisis de inositol 1, 4, 5-trifosfato y diacilglicerol. El primero induce la liberación de calcio de los reservorios intracelulares

(por ejemplo de retículo endoplásmico liso); y el diacilglicerol estimula a la proteína cinasa C. Cabe mencionar que la activación del receptor AT₁, también puede estimular diferentes tipos de proteínas G, como a G_i y G_{11/13}, produciendo eventos diferentes en las células (revisado en [Berry *et al.*, 2001](#)).

El receptor AT₁ posee sitios de glicosilación en el amino terminal asparagina⁴ y en el segundo fragmento extracelular en aspártico¹⁷⁶ y asparagina¹⁸⁸. Se ha postulado que la internalización puede ser mediada por caveolas de membrana plasmática que involucra la fosforilación de residuos de serina³³² y treonina³³⁸ en el carbono terminal (revisado en [Berry *et al.*, 2001](#)).

El receptor AT₁ es el mediador de eventos fisiológicos como la modulación funcional cardiovascular, estimulación de liberación de aldosterona y proteínas, inducción de crecimiento celular e hipertrofia, retención de sodio, producción de especies reactivas de oxígeno y antiinflamación ([Sumners *et al.*, 1991](#); [Sumners *et al.*, 1994](#); revisado en [Berry *et al.*, 2001](#)), entre otros.

Los segundos mensajeros que se generan por la activación del receptor AT₁, pueden estimular la activación de enzimas como cinasas y fosfolipasas, y factores de transcripción, como el factor NF-κB, que participa en respuestas de inflamación (revisado en [Berry *et al.*, 2001](#)). Por ejemplo, al activar a enzimas que a su vez activan a cinasas como la Janus-2, encienden vías metabólicas que estimulan a factores de transcripción relacionados con la proliferación celular. En este sentido, proteínas importantes involucradas con la síntesis de proteínas (como p70^{S6K}), adhesión y estructura del citoesqueleto celular (como p125^{FAK}, p130^{CAS} y PI3K, entre otras), pueden ser sintetizadas en la célula por la activación del receptor, para promover la migración, proliferación,

cambios en el volumen y forma celular, entre otros eventos no menos importantes (revisado en [Berry et al., 2001](#)).

Dos aspectos que valen la pena describir porque están intrínsecamente relacionados, son la activación de fosfolipasas (fosfolipasa A₂, fosfolipasa Cβ, fosfolipasa Cγ y fosfolipasa D) y generación de especies reactivas de oxígeno, por la activación del receptor AT₁. Por ejemplo la fosfolipasa A₂, induce catabolismo de ácido araquidónico de fosfolípidos de membrana, los cuales tienen impacto en la regulación de la presión sanguínea y en la generación de metabolitos como prostaglandinas, estas últimas involucradas en eventos de inflamación. Además, el ácido araquidónico puede activar a la proteína cinasa C, la cual tiene el potencial de fosforilar a las subunidades fox de la NAD(P)H oxidasa (enzima de membrana plasmática), provocando su activación y dando como resultado la generación de especies reactivas de O₂⁻ (revisado en [Berry et al., 2001](#)).

En cultivos de astrocitos de médula oblongata y cerebelo de ratas neonatales, se ha mostrado que, a diferencia del hipotálamo y corteza, los receptores AT₁ están acoplados a la vía de señalización de la fosfolipasa C ([Tallant y Higson, 1997](#)). Dichos datos indican, que al menos en esas zonas del SNC de la rata, el receptor AT₁ está desencadenando diferentes vías de señalización. Cabe mencionar que [Wyse y Sernia \(1997\)](#), han mostrado que la expresión del receptor AT₁ en astrocitos hipotalámicos, está regulada por la hormona del crecimiento en función de la concentración y tiempo de exposición de la hormona, señalando claramente, que la presencia y efectos del receptor AT₁, varían dependiendo del tipo de tejido en que se localiza.

Las características electrofisiológicas que se han descrito por la activación del receptor AT₁ en el SNC, comprenden diferentes tipos de corrientes iónicas inducidas por la Ang II. Por ejemplo, en neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico de ratas

recién nacidas, la Ang II a través de la activación del receptor AT₁ disminuye ambas, la corriente saliente de potasio de tipo transitorio y de rectificación tardía (Zhu *et al.*, 1999; revisado en Ferguson *et al.*, 2001). Datos opuestos muestran que las corrientes de potasio de rectificación tardía, no son inhibidas en neuronas del núcleo paraventricular de ratas adultas (Li y Ferguson, 1996).

Por otro lado, se ha descrito que la Ang II induce un incremento de calcio intracelular mediado por la activación del receptor AT₁, ya que esto último promueve la producción de IP₃ y en consecuencia una liberación de calcio de los reservorios intracelulares al citosol (Matute *et al.*, 1994). Sin embargo, Gebke y colaboradores (1998) han indicado que la Ang II incrementa los niveles de calcio intracelular en neuronas y astrocitos de órganos circumventriculares, por medio de la apertura de canales de calcio de la membrana plasmática, los cuales permiten la entrada de calcio extracelular a las células. Dicha evidencia muestra diferentes vías de señalización del receptor AT₁, al menos en esta parte del cerebro de la rata.

Como se puede observar, los eventos eléctricos y de señalización mediados por la activación del receptor AT₁, son variados y están en función del nivel de desarrollo, tejido y del tipo celular.

Receptor AT₂

El gen que codifica al receptor AT₂ está ubicado en el cromosoma X y distribuido en el sistema cardiovascular, riñón y sistema nervioso en humanos y roedores (de Gasparo *et al.*, 2000). Es importante mencionar que la localización del receptor AT₂ es más abundante en fetos y neonatales. En la Tabla 1 y Figura 6 se muestra la distribución del receptor en el SNC de los mamíferos y de la rata, respectivamente.

El receptor AT₂ es una proteína constituida de 363 aminoácidos y posee una homología del 34% con el receptor AT₁. Se ha propuesto que posee siete segmentos transmembranales y que está acoplado a proteínas G (de Gasparo *et al.*, 2000). Por ejemplo, con la ayuda de técnicas de inmunoselección, se ha encontrado que el receptor está asociado a la subunidad α_{12} y α_{13} de proteínas G.

La literatura indica que el receptor AT₂ participa en la diferenciación celular, crecimiento vascular, vasodilatación, apoptosis y organogénesis. Además este receptor está involucrado en la regulación de la presión sanguínea y las funciones renales, así como en la modulación de la sed y en la actividad locomotriz (revisado en Berry *et al.*, 2001).

La función del receptor AT₂, relacionada con la capacidad de inhibir la proliferación y crecimiento celular, así como de inducir apoptosis, está asociada al potencial que tiene para activar a serín/treonín fosfatasas (como PP2A y ERK), las cuales desfosforilan a enzimas (como las MAPK cinasas) y proteínas (como la familia Bcl-2) involucradas con esos eventos celulares (revisado en Berry *et al.*, 2001).

La activación de este receptor también ha sido relacionada con la vasodilatación, a través de incrementar, los niveles de óxido nítrico y GMPc. Cabe mencionar que la bradicinina puede estimular a la óxido nítrico sintetasa (revisado en Berry *et al.*, 2001).

En general se conoce poco de las vías de señalización asociadas al receptor AT₂. Se sabe que en su mecanismo de acción comúnmente participan canales de calcio y potasio, la producción de ceramidas y la activación de enzimas como MAPK cinasas, fosfatasas y serín/treonín cinasas (revisado en Berry *et al.*, 2001 y Gard, 2002).

Las características electrofisiológicas del receptor AT₂ en el SNC han sido poco estudiadas. La activación del receptor potencia las corrientes salientes de potasio de tipo transitorio y rectificación tardía, las cuales aparentemente son reguladas por fosfolipasa A₂

y ácido araquidónico, a través de la activación de proteínas G del tipo G_i ó G_o (Zhu *et al.*, 2000; revisado en Ferguson *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha descrito que en cultivos neuronales de hipotálamo de ratas neonatales, la Ang II por medio del receptor AT_2 , incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas, debido a que produce un acortamiento en la duración de los potenciales de acción (Zhu *et al.*, 2001).

Es claro percibir que las características eléctricas y de señalización mediadas por la activación del receptor AT_2 , son poco conocidas y la información hasta hoy, describe básicamente la observada en la neurona. En contraste, las células gliales como los astrocitos, presentan receptores del tipo AT_2 y se conoce poco de las vías de señalización y tipo de corrientes que se activan por este receptor.

Hipótesis

La angiotensina II induce respuestas eléctricas en astrocitos del cuerpo calloso de la rata postnatal, mediadas por los receptores AT₁ y AT₂.

Objetivo general

- Caracterización del receptor a angiotensina II en cultivos de astrocitos del cuerpo calloso de la rata postnatal.

- **Objetivos específicos**

- Caracterización de las respuestas eléctricas inducidas por la angiotensina II en cultivos de astrocitos del cuerpo calloso de la rata postnatal.
- Determinar el día de cultivo en el cual se obtienen respuestas eléctricas a angiotensina II.
- Caracterizar qué tipo de receptor a angiotensina II está presente en los astrocitos cultivados, mediante el uso de sustancias específicas.
- Establecer qué tipo de canal iónico es responsable de la respuesta eléctrica inducida por la angiotensina II en el astrocito cultivado.

Justificación

Con base al marco teórico presentado, es notable que las corrientes eléctricas inducidas por la angiotensina II, dependen del:

1. Tipo de receptor.
2. Tipo celular.
3. Tejido en donde se expresa el receptor.
4. El grado de desarrollo del tejido.

Consideramos que es importante el estudio de los receptores a angiotensina II en el cuerpo calloso de la rata, debido al papel que la angiotensina II desempeña fisiológicamente en los mamíferos. Además, hay muy poca información con relación a nuestro objeto de estudio. Por lo tanto, la información que se genere de este trabajo, permitirá la caracterización del receptor a angiotensina II presente en el astrocito del cuerpo calloso de la rata postnatal, contribuyendo de esta manera, a entender el papel que desempeña la interacción angiotensina-receptor, en los astrocitos de esta región del sistema nervioso central.

Materiales y métodos

- **Cultivos gliales**

Los cultivos gliales (astrocitos) se realizaron de la siguiente manera. Ratas Wistar recién nacidas y de tres semanas de edad fueron decapitadas con una guillotina (Stoelting, EU) y rápidamente se les extrajo el cerebro (~1 min/rata). Éste se depositó en una solución fría (SF) (4-10 °C) compuesta de (en mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.17 MgSO₄, 5.6 glucosa, 25 NaHCO₃ a pH = 7, contenida en una caja de Petri estéril de 35 mm de diámetro. Después, bajo campana de flujo laminar (Industrias Alder, México), se obtuvo del cerebro aislado una rebanada que contenía el fragmento central del CC (FCCC). Dicha rebanada fue depositada en la SF en otra caja de Petri. El FCCC fue extraído mecánicamente con la utilización de material de disección. Una vez obtenido el FCCC se depositó en una caja de Petri con SF.

En un estereomicroscopio (Stemi 1000, Zeiss), el pequeño FCCC obtenido anteriormente, fue cortado en trozos más pequeños con agujas de insulina estériles. Los trozos de tejido fueron transferidos con una micropipeta Gilson (capacidad de 1 mL) a un tubo Eppendorf estéril, el cual contenía 1.5 mL de SF. Con una pipeta Pasteur estéril [previamente tratada con sigmacote (Sigma)], sumergida en la SF, los pequeños trozos se succionaron y arrojaron ~30 veces a la SF (con la finalidad de disgregar lo más posible las células presentes en dichos trozos de tejido). Después, una alícuota de 500 µL de SF (la cual contenía células disociadas en suspensión, <1000 células/mL), fue depositada sobre la superficie de un portaobjetos (previamente cuadrículado con una punta de diamante y tratado con poli-L-ornitina) contenido en una caja de Petri estéril. Después de 2 min de haber colocado la alícuota, se agregaron a la caja de Petri 2 mL del medio NB con la

siguiente composición: Medio Neurobasal con 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina 0.5 mM y suplemento G5 (que es un factor trófico específico para el crecimiento de astrocitos). El cultivo obtenido, se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de bióxido de carbono (CO₂). Transcurrido el primer día de cultivo, el medio anterior fue sustituido bajo campana de flujo laminar, por el medio NB-G5 libre de suero fetal bovino (con la misma composición del medio NB, a excepción del suero). El medio NB-G5 se cambió cada 4 días.

Para confirmar que las células cultivadas eran astrocitos, se realizó una técnica inmunocitoquímica (ver *Inmunocitoquímica*) contra la proteína ácido-glio-fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés), característica presente en astrocito maduro ([Bottenstein y Sato, 1985](#)).

- **Inmunocitoquímica**

El ensayo inmunocitoquímico se realizó contra GFAP o contra el receptor AT₁ en los cultivos celulares, como se describe a continuación:

Células cultivadas (CC), las cuales estaban adheridas en un portaobjetos (ver *Cultivos celulares*), se utilizaron vivas para el estudio inmunocitoquímico. Las CC se colocaron en una solución bloqueadora [SB: SRE (ver *Soluciones*) + 10% de suero de caballo] en una atmósfera húmeda por 45 min en la oscuridad. Después se les agregó el anticuerpo primario contra GFAP (anti-GFAP, DiaSorin, USA) o contra el receptor AT₁ (anti-AT₁ N-10, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido (1:150) en SB por toda la noche. Al otro día, las CC se sometieron a una serie de tres lavados con SRE por 9 min (cada lavado tuvo una duración de 3 min). En seguida, las CC se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (anti-IgG-ITF, Sigma, USA) o con cianometil indiocianina (anti-IgG-CY3) diluido (1:250 o 1:500, respectivamente) en SB por 1 h en la oscuridad,

para después lavarlas con SRE, como se describió anteriormente. A continuación, las CC se colocaron en un portaobjetos con SRE y se trasladaron al microscopio para observar los resultados y obtener las imágenes. Las CC fueron estudiadas bajo el microscopio de fluorescencia, para visualizar al isotiocianato de fluoresceína (488 nm) o cianometil indiocianina (550 nm) y determinar el número de células inmunoreactivas. De las imágenes obtenidas se estimó el porcentaje celular inmunoreactivo $\{[(\text{número de células totales} - \text{número de células no inmunoreactivas}) / (\text{número de células totales})] \times 100\}$. El ensayo se realizó tres veces.

- **Electrofisiología**

El equipo electrofisiológico consiste de un medio de perfusión para las soluciones extracelulares; una cámara de vidrio (capacidad de 200 μL) para la perfusión de las soluciones extracelulares; y electrónica (amplificador, osciloscopio, microscopio, cómputo, grabadora y cintas).

Con el fin de caracterizar el tipo de receptor a Ang II presente en los astrocitos cultivados, a continuación se describe cómo se registraron las corrientes iónicas inducidas por la Ang II.

Un fragmento del portaobjetos en el que se cultivaron las células, fue removido del cultivo celular (bajo campana de flujo laminar) en diferentes días de cultivo y se depositó en solución para registro electrofisiológico (SRE) contenida en una caja de Petri estéril (ver *Soluciones*). Dicho fragmento fue sumergido en la cámara de registro electrofisiológico, la cual estaba constantemente perfundida por SRE. Dado lo anterior, las células se registraron eléctricamente mediante la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa (Hamill *et al.*, 1981).

Brevemente: en un microscopio invertido (Olympus IX70, Japón), se colocó una pipeta llena de solución de registro intracelular (SRI) (ver *Soluciones*) en contacto con un electrodo de plata clorurado, sobre la superficie de la membrana plasmática de la célula que estaba siendo perfundida por la SRE (ver **Figura 7**), para llevar a cabo la fijación de voltaje. Esto último se logró aplicando sobre la membrana celular, una presión negativa a través de la pipeta de registro, con la intención de romper el área de membrana que estaba debajo de la pipeta de registro. De esta manera se consiguió acceso al interior de la célula y se fijó el voltaje transmembranal a -60 mV. Es importante señalar que un electrodo de referencia estaba sumergido en la SRE para que se cerrase el circuito eléctrico. Dado lo anterior, se procedió a registrar las corrientes iónicas inducidas por la Ang II, en diferentes días de cultivo celular.

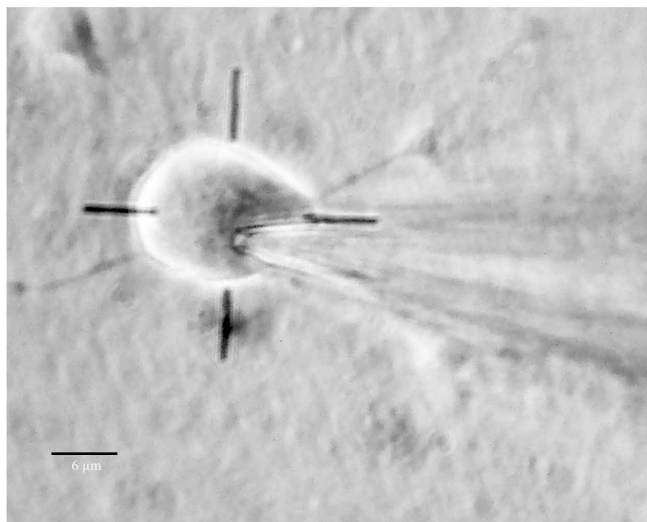


Figura 7. Célula sujeta a fijación del voltaje. Célula cultivada del cuerpo caloso de la rata, a la cual se le colocó en la superficie de la membrana plasmática, una pipeta de borosilicato con la intención de fijarle el voltaje transmembranal, para conocer sus características eléctricas y el tipo de receptor a Ang II que expresaba. Barra de calibración, 6 μ m.

Los protocolos de experimento consistieron en lo siguiente: **1)** la célula colocada en la cámara de registro, a la cual se le fijaba el voltaje, se bañaba constantemente con SRE y

ésta se cambiaba por SRE que contenía solubilizada a la sustancia de interés (Ang II, CGP-42112A ó ZD7511) por un tiempo determinado (ver *Resultados*). Si la célula respondía eléctricamente a la perfusión de la sustancia aplicada, se lavaba la solución anterior bañando a la célula con SRE. Después de un tiempo se aplicaba SRE + agonista y antagonista solubilizados, si la célula no presentaba una respuesta eléctrica, se lavaba la solución anterior bañando a la célula con SRE. Después de lavarse la solución, se aplicaba de nuevo la sustancia de interés (Ang II), para verificar si la respuesta había sido bloqueada por el antagonista; **2**) a las células se le aplicaban tres rampas de voltaje (ver más abajo las características de las rampas de voltaje), una antes de la aplicación de la Ang II, la segunda rampa durante la respuesta que inducía la Ang II y la última rampa, después de lavarse la respuesta. Con la finalidad de conocer qué tipo de iones participaban en la respuesta eléctrica inducida por la Ang II.

Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador Axopatch 200B conectado a una computadora que sirvió como generador de pulsos y rampas de voltaje. Las corrientes registradas se filtraron a 5 KHz y almacenaron en tiempo real, en cintas digitales utilizando una grabadora (Sony, DTC 790). Las señales se digitalizaron a 100 Hz usando un convertidor analógico digital 1200 (Axon Instruments), las cuales se analizaron con los programas de Axoscope 8.2, Origin 4.1 y Pclamp 8.2. La información generada sirvió para construir los registros de la corriente inducida en función del tiempo; y relación corriente-voltaje, para la determinación del ión responsable de la corriente inducida por Ang II. Además, se registró el potencial de reposo de la célula rápidamente después de tener acceso con la pipeta de registro al interior de la célula, y también la capacitancia de la membrana (Cm) celular.

El potencial de reposo de la célula, se obtiene después de romper la membrana celular para llevar a cabo la fijación de voltaje. Brevemente, se fija en cero la corriente en el osciloscopio, después de formar el parche y romper la membrana de la célula con la pipeta de registro, la corriente en el osciloscopio da un salto, generalmente en sentido positivo, y de esta manera, se fija gradualmente el voltaje transmembranal, hasta alcanzar de nuevo la corriente cero en el osciloscopio. Dado este evento, el amplificador indica el potencial de reposo de la célula.

Por otro lado, la C_m se obtiene de la ecuación que describe la relación que hay entre τ y la resistencia y capacitancia de la membrana celular ($\tau = RC_m$). En donde τ es la constante de tiempo de la membrana y representa el 63% de decaimiento del cambio de voltaje transmembranal y R, es la resistencia de la membrana. Brevemente: a través de un pulso de voltaje de 5 mV (generado por la computadora) aplicado a la célula que se le fija el voltaje, el equipo de registro eléctrico genera un valor para τ y R, de tal suerte que la razón de τ y R indica el valor de la C_m ($C_m = \tau/R$).

El potencial de inversión se determinó utilizando un protocolo de rampas de voltaje a partir de -60 mV (por la fijación de voltaje en la célula), que barría de -120 a 80 mV en 1 s. El protocolo se aplicó antes, durante y después de la perfusión de las soluciones de interés, antes mencionadas. La corriente neta inducida por la Ang II o el CGP-42112A (ver más adelante), se obtuvo de la resta de la corriente generada en presencia de la Ang II o el CGP-42112A y de la corriente inducida por la rampa control. Es importante hacer notar, que la pendiente de la curva de corriente generada por las rampas de voltaje, es igual a la conductancia de la membrana celular. Las sustancias de interés se perfundieron

solubilizadas en la SRE a un flujo de 4 mL/min. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con Origin 4.1 y representan la media \pm error estándar.

El antagonista ZD 7155 y el CGP-42112A, permitieron la caracterización del receptor expresado en el astrocito cultivado. Éstos presentan una alta afinidad por los receptores del tipo AT₁ y AT₂, respectivamente (Robertson, 1998). La concentración de la sustancia que inhibe el 50% de la respuesta (IC₅₀) es de 3.8 y 0.5 nM para ZD 7155 y CGP-42112A, respectivamente.

La técnica electrofisiológica brevemente descrita, permite el control de las soluciones que se perfunden a las células y las que contiene la SRI. En este sentido, el potencial de inversión de la corriente iónica inducida por la Ang II, sugiere qué tipo de ión es el responsable de la corriente observada, dado que se conocen los potenciales de equilibrio de K⁺, Na⁺, Cl⁻ y Ca²⁺ en el sistema, el cual es alrededor de -80, 80, cero y 150 mV, respectivamente.

- **Soluciones**

La SRE que baña a las células en la cámara de perfusión, estaba compuesta de (en mM): 150 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES y 10 glucosa. El pH se ajustó a 7.2 con NaOH.

Para los experimentos en que se modificó el potencial de inversión de potasio de -80 a -30 mV, se utilizó (en mM): 110 NaCl, 40 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 10 glucosa y el pH se ajustó a 7.2 con NaOH.

Para bloquear corrientes de potasio se utilizó la siguiente solución extracelular para bañar a las células (en mM): 130 NaCl, 20 Cl-TEA, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 10 glucosa y el pH se ajustó a 7.2 con NaOH.

Las pipetas de registro se construyeron con un estirador de capilares (Sutter Instruments P-97, USA), las cuales se llenaron con la SRI compuesta de (en mM): 140 KCl, 5 NaCl, 0.5 CaCl₂, 10 EGTA, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 3 ATP-Mg²⁺ y 0.4 GTP-Na⁺ (Berger *et al.*, 1991) y presentaron una resistencia de 4-6 MΩ. El pH se ajustó a 7.2 con KOH.

Resultados

- **Cultivos celulares**

Las células cultivadas presentaron una morfología muy diversa (ver [Figura 7, 8, 9 y 10](#)) y aunque por lo general proyectaban al menos dos prolongaciones del soma celular, éstos daban ramificaciones en todas direcciones ([Figura 9](#)).

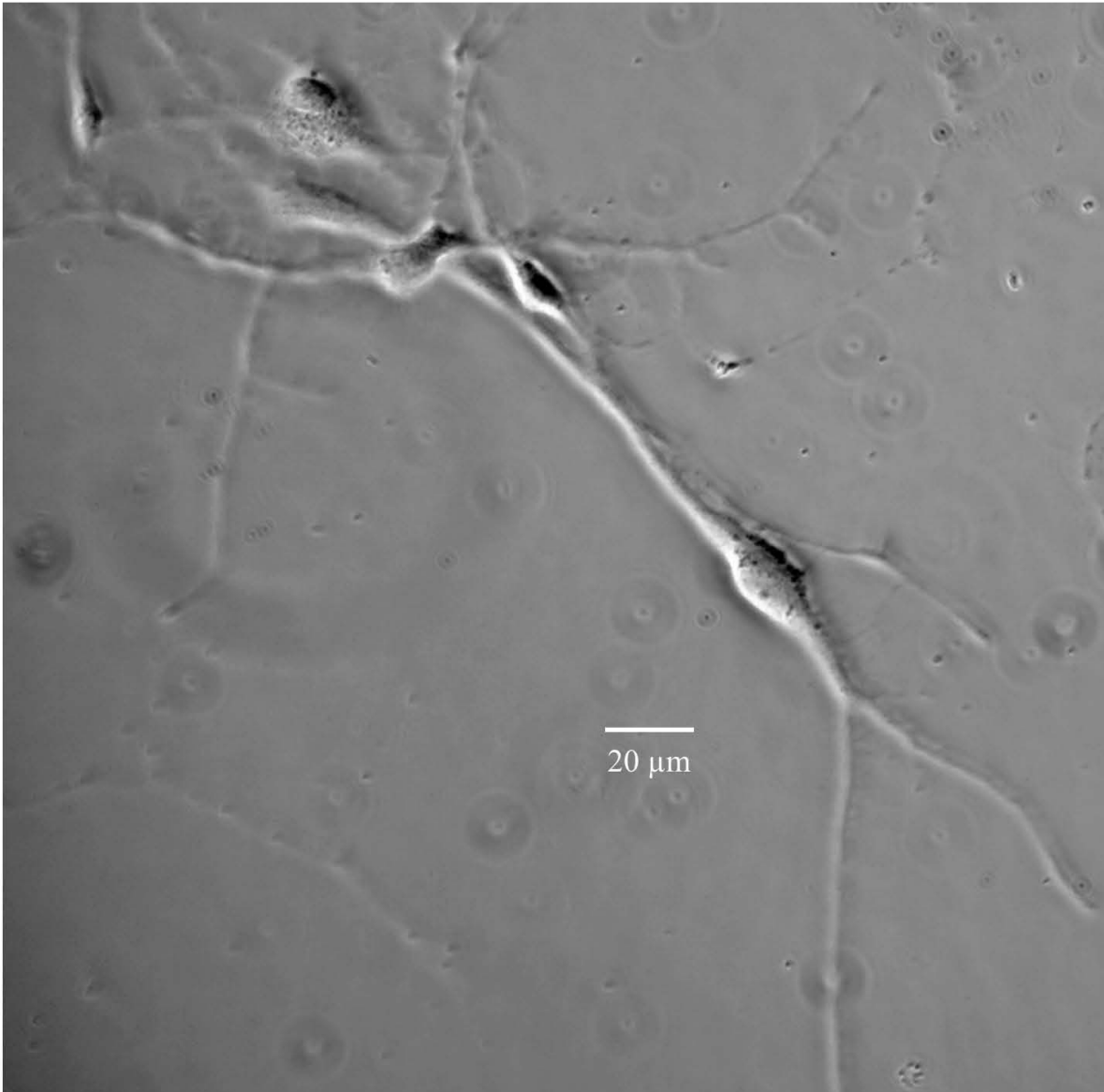


Figura 8. Células del cuerpo calloso de la rata recién nacida al noveno día de cultivo. Fotografía digital tomada en contraste de fases (CF, 40x) que muestra seis células vivas.



Figura 9. Células del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al sexto día de cultivo. La fotografía digital tomada en contraste de fases (CF, 40x) muestra dos células vivas que presentan al menos dos prolongaciones del soma celular (estructura con más brillo). Barra de calibración, 10 μm .

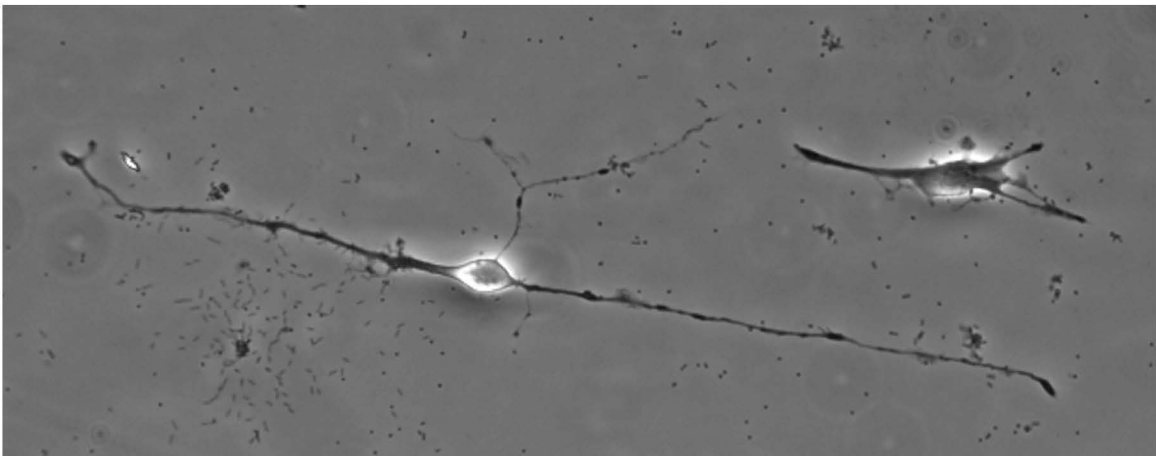


Figura 10. Células del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al sexto día de cultivo. La fotografía digital tomada en contraste de fases (CF, 20x) muestra dos células vivas que presentan al menos dos prolongaciones del soma celular (estructura con más brillo).

Para realizar los registros electrofisiológicos, a las células se les colocaba la pipeta de registro encima del soma celular (Figura 7).

- **Inmunocitoquímica**

Las células cultivadas dieron una marca positiva ante el ensayo inmunocitoquímico contra GFAP (>90% de las células) (ver Figura 11), confirmando la identidad de las células como astrocitos.

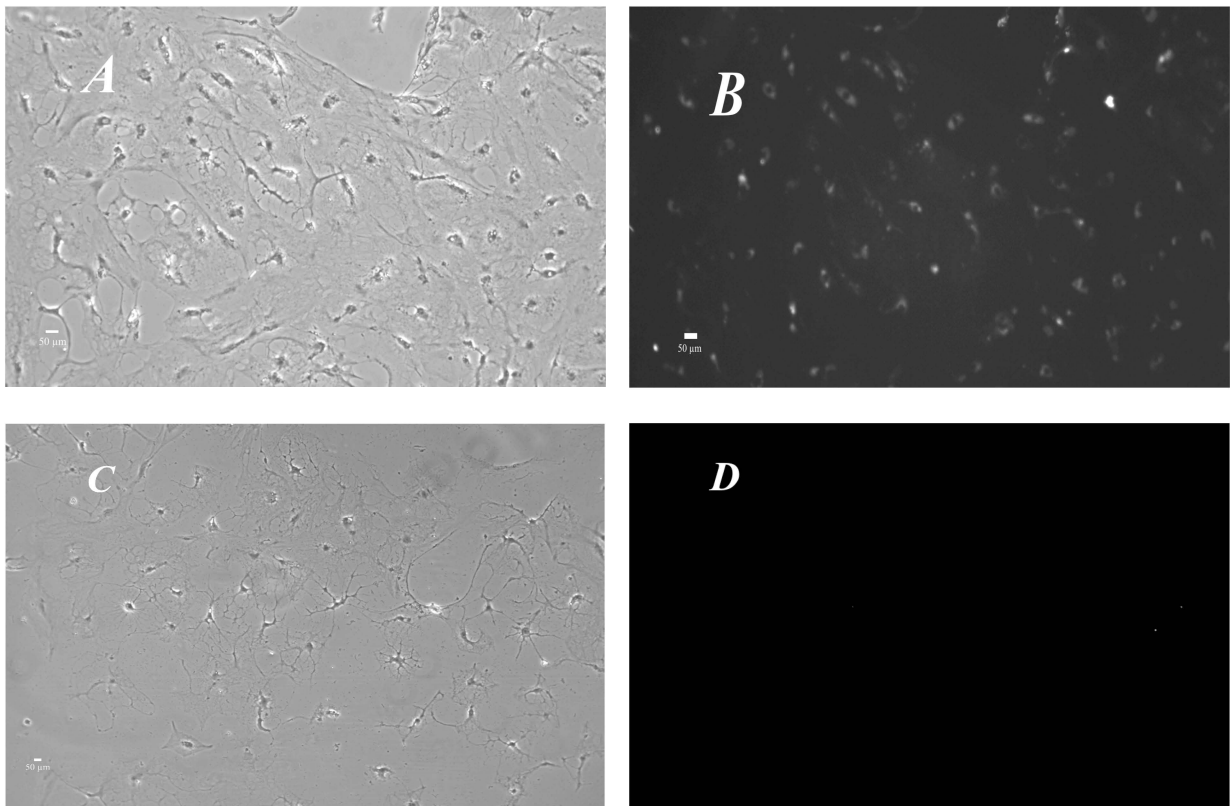


Figura 11. Células positivas a GFAP. En *A* se observa una fotografía digital tomada en contraste de fases (CF, 10x), a células confluentes del cuerpo calloso de la rata recién nacida al quincuagésimo día de cultivo. En *B* se observa la misma imagen que en *A*, mostrando la inmunoreacción positiva en la mayoría de las células cultivadas. *C* muestra el experimento control (CF, 10x) y *D*, células control, a las cuales no se les incubó con el anticuerpo primario y no dieron marca positiva ante el ensayo inmunocitoquímico. *A*, *B*, *C* y *D*, barra de calibración, 50 µm.

Dado que los resultados electrofisiológicos (ver más abajo: *Electrofisiología*) mostraron que las células cultivadas expresan receptores AT₂, se decidió realizar un ensayo inmunocitoquímico contra el receptor AT₁, para conocer si la proteína estaba siendo expresada por las células en cultivo, ya que Fogarty y Matute (2001) han descrito que las células del CC humano y bovino adultos, expresan el receptor AT₁. Sin embargo, la **Figura 12** muestra que las células cultivadas no mostraron una marca positiva ante el ensayo inmunocitoquímico contra el receptor AT₁ en ratas recién nacidas. Este resultado complementa a los resultados electrofisiológicos que indican la presencia del receptor AT₂ en las células del CC de la rata. Es importante mencionar que los cultivos del CC de ratas de tres semanas de edad no fueron inmunoreactivas al ensayo inmunocitoquímico contra el receptor AT₁.

- **Electrofisiología**

Los astrocitos se registraron del cuarto al décimo tercer día de cultivo, encontrándose que el porcentaje celular que respondió eléctricamente a la aplicación de Ang II, no dependió del día en que se realizó el registro [estadística no paramétrica, $\chi^2_{(8)}$, $\alpha = 0.001$].

- **Astrocitos del cuerpo caloso de ratas recién nacidas**

Los astrocitos presentaron una capacitancia promedio de 13 ± 1 pF de un intervalo de 2 a 35 pF (n = 37). Así como un potencial de reposo promedio de -44 ± 2 mV de un intervalo de -80 a -13 mV (n = 46).

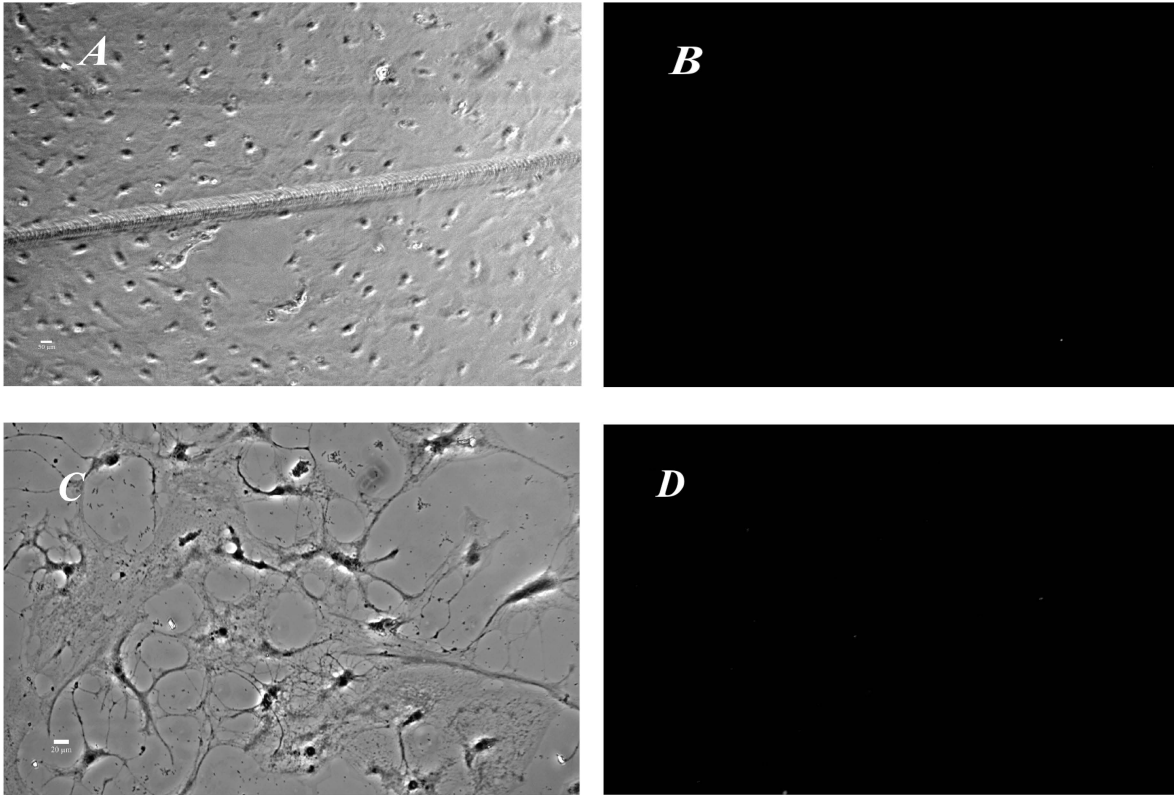


Figura 12. Células confluentes del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al quincuagésimo día de cultivo. *A*, fotografía digital tomada en contraste de fases (CF, 10x). *B*, misma imagen que en *A*, mostrando que las células no dieron una marca positiva contra el receptor AT₁. *C*, experimento control (CF, 10x) y *D*, células control, las cuales no se incubaron con el anticuerpo primario y no dieron una marca positiva ante el ensayo inmunocitoquímico. *A*, *B*, *C* y *D*, barra de calibración, 50 µm.

La aplicación de 1 µM Ang II a 169 células registradas eléctricamente, reveló que el 27.8% respondió con una corriente entrante de 113 ± 15 pA ($n = 47$) y sólo el 4.1%, con una corriente saliente de 66 ± 20 pA ($n = 7$). El resto de las células no respondió.

Las corrientes entrantes se presentaron con más frecuencia (47/169), encontrándose dos tipos: corrientes que decayeron (**Figura 13**) y corrientes que se mantuvieron (**Figura 14**) en presencia de la Ang II.

En la **Figura 13** se observa una corriente entrante de 150 pA inducida por la Ang II en un astrocito cultivado, que regresa a la corriente basal después de que la Ang II se retiró

de la cámara de perfusión. Sin embargo, nótese que la respuesta decae en presencia de la Ang II. Dicha respuesta indica que la Ang II activó a receptores de la membrana plasmática, que cambiaron la conductancia de la membrana celular por un tiempo de 35 s. Este evento se obtuvo en tres células registradas.

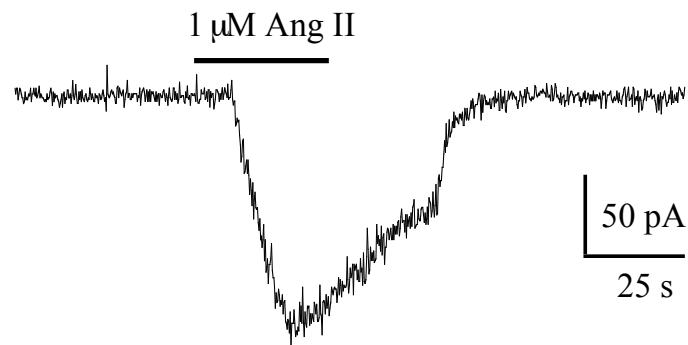


Figura 13. Corriente entrante inducida por la Ang II en un astrocito del cuerpo caloso de ratas recién nacidas al sexto día de cultivo. La barra indica el tiempo de aplicación de la Ang II.

En la **Figura 14** se muestra una respuesta eléctrica que evocó la Ang II (representativa de 12 células). En esta ocasión, la corriente entrante originada fue 250 pA y tardó 1.2 min en recuperar la línea basal. Nótese que la corriente se mantuvo mientras la Ang II estaba en el baño de perfusión.

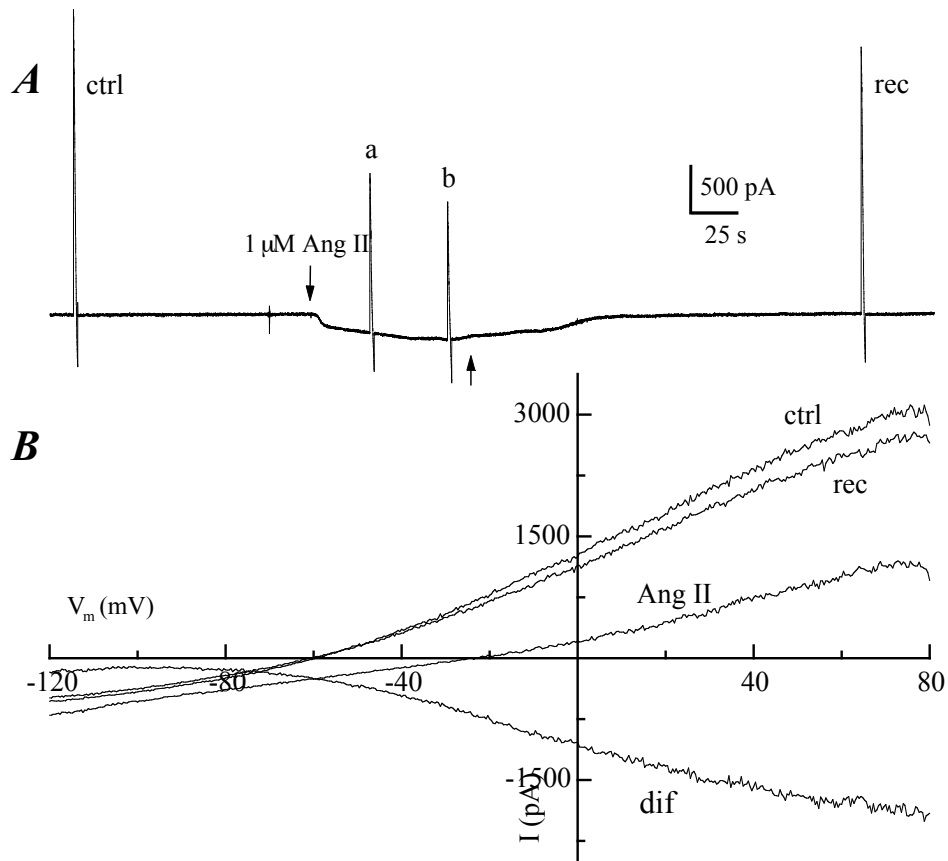


Figura 14. Corriente iónica inducida por Ang II en un astrocito del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al cuarto día de cultivo y relación corriente-voltaje. En **A**: las flechas hacia arriba y abajo indican el tiempo de aplicación y remoción de Ang II; **a** y **b**: rampas aplicadas durante la corriente generada por Ang II. En las Figuras donde se muestran rampas **ctrl**, **rec** y **dif**, significan: rampa control, rampa de recuperación y corriente neta, respectivamente. En **B**: las relaciones corriente-voltaje se obtuvieron de las rampas de voltaje aplicadas a los astrocitos; rampa control y de recuperación (**ctrl** y **rec**, respectivamente), las cuales se registraron en solución extracelular; rampa durante la corriente generada por la Ang II (**Ang II**). La corriente neta generada por la Ang II (**dif**) se obtuvo al substrar **ctrl** y **Ang II**.

La aplicación de rampas de voltaje en los astrocitos, reveló que la Ang II indujo en el 85% de las células ($n = 14$), una reducción en las magnitudes de las corrientes generadas por las rampas de voltaje y en consecuencia de esto, una disminución de la conductancia en

la membrana celular (Figura 14); mientras que en el resto de las células (15%), a ambas características las incrementó (Figura 15).

La disminución de la magnitud de las corrientes generadas por las rampas de voltaje se observa en la Figura 14B. La rampa control generó una corriente máxima de 3060 pA a un voltaje de 80 mV (Figura 14B, ctrl), mientras que durante la corriente entrante inducida por la Ang II, las rampas generaron corrientes de 1420 y 1135 pA (al mismo voltaje, 80 mV), alrededor de un 43% menores (diferencia entre el pico de la corriente control y el de Ang II) que aquella de la rampa control.

El análisis de las corrientes generadas por las rampas de voltaje mostró que la Ang II modificó el potencial de inversión de la corriente de -60 a -25 mV (Figura 14B, ctrl, Ang II), redujo la magnitud de las corrientes y en consecuencia la conductancia de la membrana celular (Figura 14B, ctrl, Ang II) y reveló que la corriente neta presentó una pendiente negativa que no invirtió en el intervalo de -120 a 80 mV (Figura 14B, dif).

En la Figura 15A se observa una corriente de 160 pA inducida por la Ang II. En este astrocito, la Ang II incrementó la magnitud de la corriente, ya que la rampa control generó una corriente máxima de 183 pA a 80 mV, mientras que durante la corriente activada por la Ang II, fue de 335 pA (90% más grande que la control).

El análisis de las corrientes generadas por las rampas de voltaje (Figura 15B), reveló que la Ang II no modificó el potencial de inversión de la corriente (permaneció en -60 mV), además incrementó la conductancia de la membrana celular y reveló que la corriente neta presentó tres tipos de conductancias, dos positivas en el intervalo de -100 a -30 mV y de cero a 60 mV, y una negativa en el intervalo de -30 a cero mV. Nótese que el astrocito mostró una recuperación parcial del 65% con respecto a la corriente control.

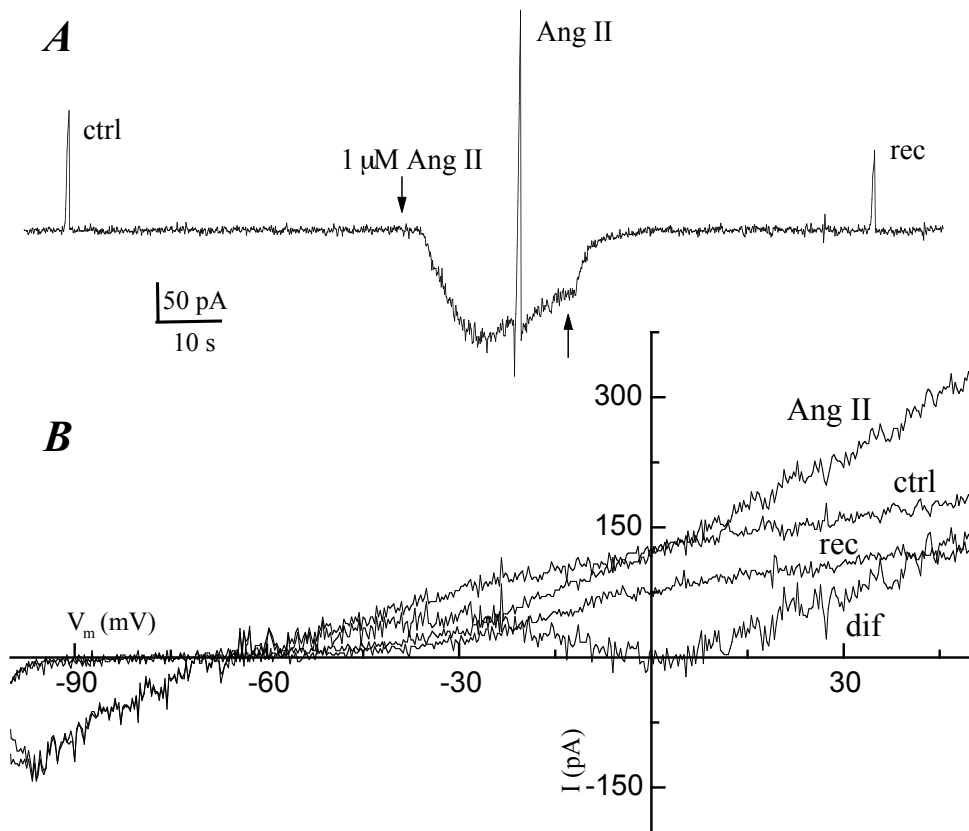


Figura 15. Respuesta eléctrica inducida por la Ang II en un astrocito del cuerpo calloso al sexto día de cultivo. En **A** y **B**: todo se realizó de manera semejante que en la **Figura 14**, excepto en **A**: **Ang II** indica la rampa aplicada durante la corriente generada por la Ang II y en **B**, las rampas de voltaje barrieron de -100 a 60 mV en 1 s.

Las condiciones experimentales no permitieron caracterizar a profundidad los efectos producidos por la Ang II en los astrocitos del CC de la rata recién nacida. Por lo tanto, se decidieron realizar dos experimentos para investigarlo: primero se redujo el gradiente químico del potasio para conocer si esta disminución, modificaba las corrientes generadas por las rampa de voltaje y segundo, se trató de mimetizar el efecto producido por la Ang II en los astrocitos con 20 mM TEA [bloqueador de canales de potasio (Hille,

2001)], ya que la literatura señala, que la Ang II modula la actividad de los canales de potasio de rectificación tardía (Zhu *et al.*, 1999; 200), efecto observado en los astrocitos cultivados (Figura 14B, ctrl).

En la Figura 16 se muestra que la modificación del gradiente químico del potasio, impacta la magnitud de la corriente generada por las rampas de voltaje, en el intervalo de -30 a 80 mV, reduciéndola (diferencia entre la corriente control y la generada en presencia de solución extracelular, 40 mM KCl) en un 25% (n = 5), ya que el cambio del potencial de equilibrio del potasio de -80 a -30 mV, produjo que la fuerza impulsora fuera menor para este ión. Además la Figura 17 muestra que el TEA redujo (diferencia entre la corriente control y la generada en presencia del TEA) 44% la magnitud de la corriente generada por las rampas de voltaje en el intervalo de -30 a 80 mV (n = 8). Señalando que en ambos experimentos, las rampas de voltaje activaron corrientes de potasio en los astrocitos cultivados del CC.

Las corrientes salientes fueron menos abundantes (n = 4) y por lo tanto, sólo se muestra un registro representativo (Figura 18). Cabe señalar que este experimento indicó la presencia del receptor AT₂ en el astrocito cultivado (ver más adelante).

Los resultados descritos anteriormente, dieron pauta para explorar si las respuestas eran inducidas por diferentes receptores de Ang II. Para ello, se utilizó CGP-42112A y el ZD7511 (es importante mencionar que el CGP42112A es considerado en la literatura, como agonista y antagonista de los receptores AT₂ y se mostrará más adelante, que en los resultados obtenidos en los astrocitos cultivados, esta sustancia indujo ambos efectos) (Robertson, 1998; revisado en Ferguson *et al.*, 2001).

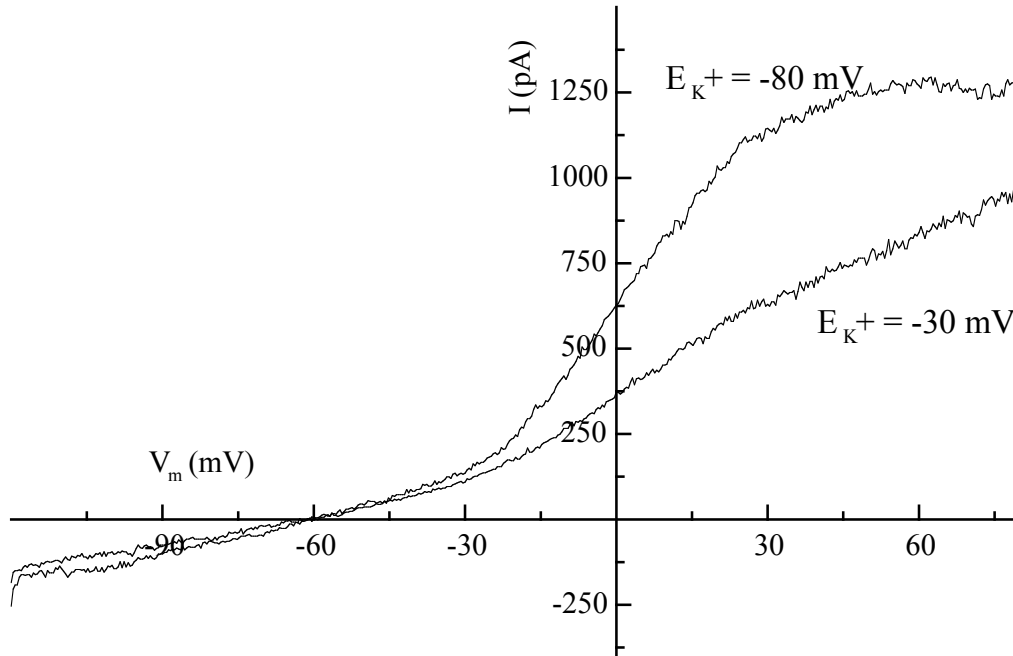


Figura 16. Corrientes iónicas generadas por rampas de voltaje a dos potenciales de equilibrio para el potasio. $E_{K^+} = -80$ mV y $E_{K^+} = -30$ mV, indican que el potencial de inversión de potasio está alrededor de -80 mV y -30 mV, respectivamente. El registro se realizó al sexto día de cultivo y es representativo de cinco astrocitos del cuerpo calloso de ratas recién nacidas.

Los astrocitos en cultivo del CC de la rata recién nacida expresaron el receptor AT_2 ($n = 7$). Es importante mencionar que las células no mostraron ningún efecto ante el antagonista ZD7511. En la **Figura 19** se muestra la presencia del receptor AT_2 . En este registro, la Ang II indujo corrientes entrantes de 47 y 57 pA (**Figura 19, A, C**). Sin embargo, la coaplicación de la Ang II y CGP-42112A, no generó respuesta (**Figura 19, B**). Después de lavarse, la aplicación de Ang II en la célula, generó el mismo tipo de respuesta primeramente inducida por la Ang II, la cual fue reducida inmediatamente por la coaplicación de Ang II y CGP-42112A (**Figura 19, D**). Nótese que la duración de la corriente dependió de la presencia de la Ang II. Este resultado sugiere fuertemente que la

corriente que generó la Ang II fue mediada por el receptor AT_2 , ya que el CGP-42112A bloqueó la respuesta.

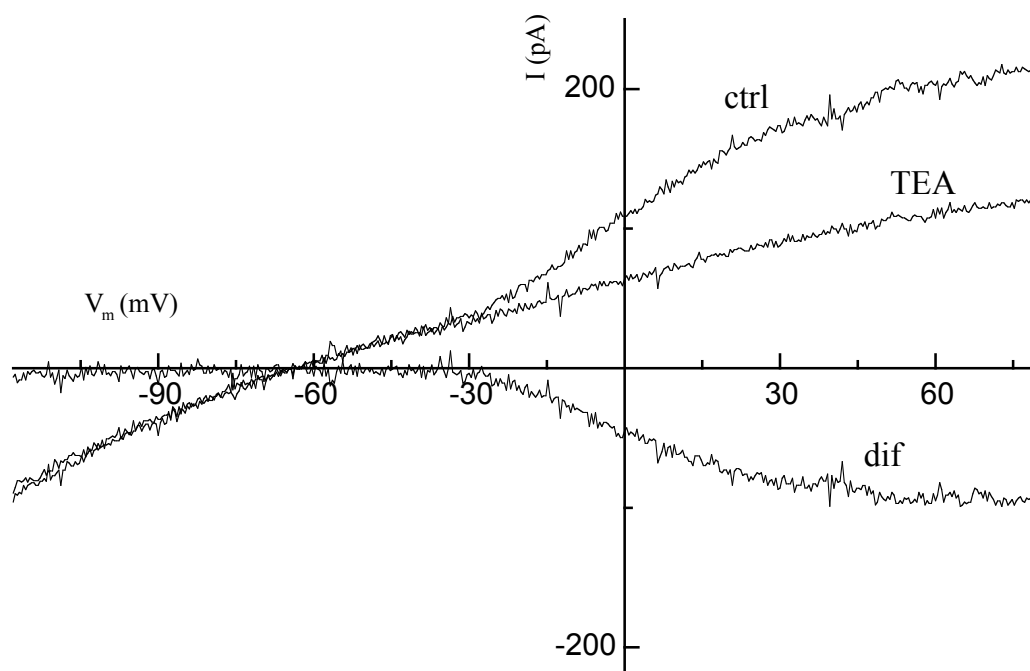


Figura 17. Corrientes de potasio sensibles a TEA generadas por rampas de voltaje. Las relaciones corriente-voltaje se generaron de la rampa control (ctrl) (evocada en el astrocito durante el baño con solución extracelular) y la rampa en presencia de TEA (TEA) (generada en el astrocito mientras se bañó con solución extracelular + 20 mM TEA). El registro se realizó al octavo día de cultivo y es representativo de ocho astrocitos cultivados del cuerpo caloso de la rata.

➤ **Ratas de tres semanas de edad**

Los astrocitos presentaron una capacitancia promedio de 11.8 ± 0.7 pF de un intervalo de 8 a 15.9 pF ($n = 5$). Así como un potencial de reposo promedio de -47 ± 2.8 mV de un intervalo de -62 a -15 mV ($n = 21$).

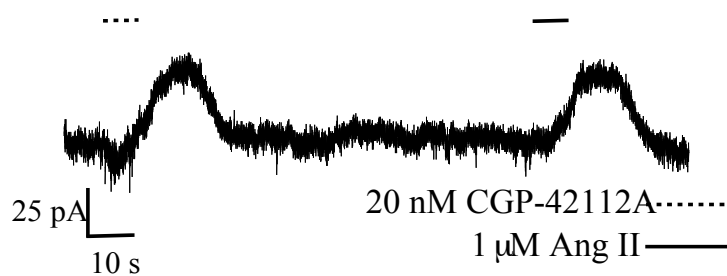


Figura 18. Corriente saliente inducida por la Ang II y el CGP-42112A en un astrocito del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al cuarto día de cultivo. El registro electrofisiológico muestra dos corrientes salientes inducidas por la aplicación de CGP-42112A (barra punteada) y Ang II (barra continua). Ambas sustancias evocaron una corriente de 37 pA.

La aplicación de 1 μM Ang II a 54 astrocitos, reveló que el 22.2% respondió con una corriente entrante de $399 \pm 213.6 \text{ pA}$ ($n = 12$) y sólo una célula respondió con una respuesta saliente de 90 pA. El resto celular no respondió.

Es importante mencionar que la magnitud de las corrientes inducidas por la Ang II, se mantuvo hasta que ésta se retiró de la cámara de perfusión.

Los astrocitos cultivados del CC de la rata de tres semanas de edad, expresaron receptores de Ang II, predominantemente del tipo AT_2 ($n = 2$) (Figura 20).

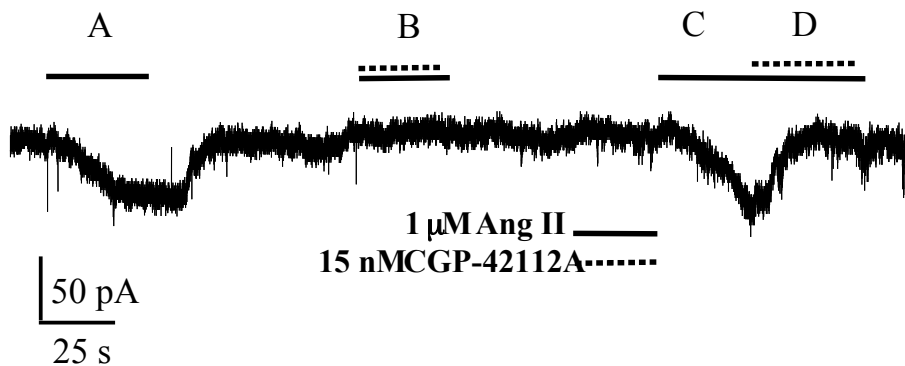


Figura 19. Efectos del CGP-42112A sobre las corrientes entrantes evocadas por la Ang II, en astrocitos del cuerpo calloso de ratas recién nacidas al quinto día de cultivo. La barra continua y punteada, indican el tiempo y la aplicación de Ang II y CGP-42112A, respectivamente.

En la **Figura 20** se muestra que el CGP-42112A indujo una corriente entrante de 400 pA (**Figura 20, C**). Asimismo, la coaplicación de la Ang II y ZD7511, evocaron una corriente de 800 pA (**Figura 20, D**) y dado que el ZD7511 no antagonizó la respuesta eléctrica, el registro indicó que los receptores AT₂ activaron la corriente entrante en el astrocito. Es importante mencionar que la coaplicación de la Ang II y el ZD7511 indujeron una mayor corriente que el CGP42112A (**Figura 20**), lo cual podría esperarse, ya que la concentración de Ang II usada fue 50 veces mayor que la del CGP-42112A. Además el análisis de las rampas de voltaje (**Figura 20**) reveló eventos semejantes a los obtenidos en

astrocitos en cultivo del CC de ratas recién nacidas. Es decir, la rampa control generó una corriente 5220 pA a 80 mV, mientras que en presencia de CGP-42112A, la corriente se redujo 6% (4920 pA al mismo voltaje) (Figura 20, ctrl, CGP-42112A). Nótese que durante la coaplicación de Ang II y ZD7511, la corriente incrementó 16% (6080 pA a 80 mV) (Figura 20, Ang II+ZD7511) comparada con aquella de la rampa control, sugiriendo distintos efectos inducidos por estas sustancias en la célula (n = 2).

El CGP-42112A al igual que la Ang II, modificó el potencial de inversión de la corriente control de -62 a -43 y -36 mV, respectivamente (Figura 20, ctrl, rec, CGP-42112A, Ang II+ZD7511). Nótese que la corriente control presentó tres potenciales de inversión, -116, -92 y -62 mV, así como la corriente de recuperación, -112, -101 y -62 mV).

La corriente generada en presencia del CGP-42112A, mostró una pendiente mayor de -120 a 20 mV, y una menor de 20 a 80 mV, comparada con la pendiente de la corriente control. Además, el CGP-42112A generó una corriente neta que presentó dos potenciales de inversión, -26 y 32 mV, como además dos tipos de conductancias, una positiva de -120 a 10 mV y una negativa de 10 a 80 mV (Figura 20, dif₁); mientras que la coaplicación de Ang II y ZD7511 sólo mostró una conductancia positiva de -120 a 80 mV (Figura 20, dif₂).

Los resultados descritos previamente, indicaron que los astrocitos cultivados del CC de la rata de tres semanas de edad, mostraron respuestas similares a las obtenidas en los astrocitos cultivados del CC de la rata recién nacida, sugiriendo que las respuestas fueron inducidas predominantemente por la activación de receptores del tipo AT₂ y además, que la magnitud de las corrientes obtenidas fueron mayores en los cultivos del CC de ratas de tres semanas de edad en comparación con las recién nacidas.

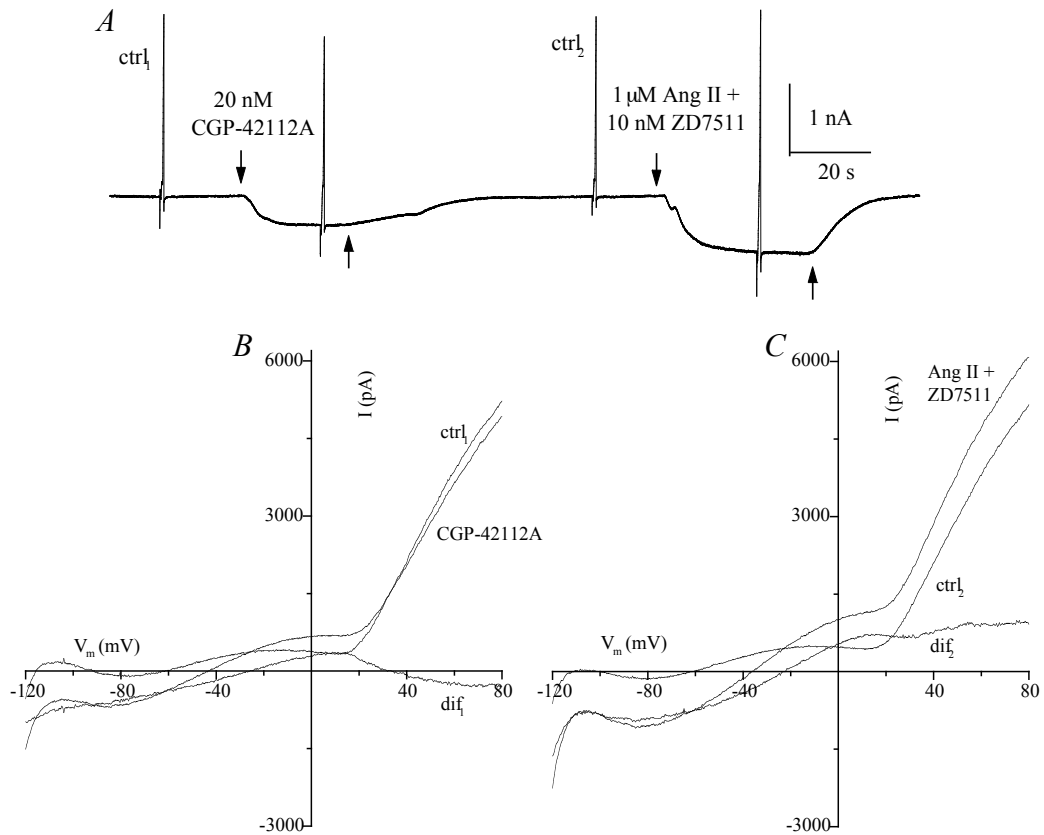


Figura 20. Corrientes entrantes inducidas por CGP-42112A y Ang II, en un astrocito del cuerpo calloso de la rata de tres semanas de edad, al noveno día de cultivo. En **A**: Las flechas hacia arriba y hacia abajo, indican el momento de la aplicación y remoción de las sustancias, respectivamente; $ctrl_1$ y $ctrl_2$, señalan rampas de voltaje control aplicadas durante el baño de solución extracelular. En **B**: relaciones corriente-voltaje obtenidas de las rampas $ctrl_1$ y **CGP-42112A**; dif_1 , efecto neto generado por el CGP-42112A. En **C**: relaciones corriente-voltaje obtenidas de las rampas $ctrl_2$ y **Ang II**; dif_2 , efecto neto generado por la Ang II.

Discusión

Las células cultivadas del CC de ratas recién nacidas y tres semanas de edad presentaron morfologías celulares típicas de astrocitos en cultivo (Bottenstein y Sato, 1985) y el ensayo inmunocitoquímico, reveló la identidad de las células como astrocitos.

Los astrocitos del CC de ratas recién nacidas y tres semanas de edad, mostraron una capacitancia de membrana menor que las obtenidas en los astrocitos presentes en rebanadas de corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y espina dorsal, ya que estos presentaron una capacitancia promedio, en diferentes estadios del desarrollo de la rata, de 34.3, 59, 24-36 y 39.6 pF, respectivamente (Bordey y Sontheimer, 2002). Sin embargo, el potencial de reposo de los astrocitos cultivados fue similar a aquél obtenido de células en rebanadas del cuerpo calloso del ratón (Berger *et al.*, 1991). Estas diferencias se podrían explicar por las diferentes características intrínsecas que existen entre las células en cultivo y las que están en una rebanada de cerebro (*e.g.* confluencias celulares). Además, el porcentaje celular (~20%) que respondió a la Ang II, fue similar al observado con técnicas que permiten visualizar incrementos de calcio intracelular, en células del CC del ratón postnatal (Bernstein *et al.*, 1996).

Las magnitudes de las corrientes entrantes inducidas por la Ang II en los astrocitos del CC de la rata, fueron similares a aquellas obtenidas de motoneuronas (-128 ± 31 pA) de la espina dorsal de la rata (ubicadas en la VIII y IX lámina de Rexed) (Oz y Renaud, 2001). Además en esas motoneuronas, la Ang II (diferencia entre el pico de corriente control y el inducido por la Ang II) indujo una reducción en la conductancia de la membrana celular menor, que aquella obtenida en los cultivos celulares del CC de la rata recién nacida (19.1 y 38%, respectivamente). De hecho, el mayor efecto inducido por la Ang II en los astrocitos

cultivados del CC de la rata, fue la reducción de corrientes de potasio y en consecuencia de esto, se observó una reducción en la conductancia de la membrana celular, probablemente debida a la activación de receptores AT₂ más que de receptores AT₁. Dado que los experimentos farmacológicos, sugieren que los astrocitos expresaron principalmente receptores AT₂. Este argumento se apoya en el antagonismo del CGP-42112A en cinco astrocitos cultivados del CC de ratas recién nacidas; además de que en los cultivos celulares de ratas de tres semanas de edad, esa misma sustancia fue capaz de inducir respuestas eléctricas (n = 2) y el ZD7511 no pudo bloquear las respuestas inducidas por la Ang II [se debe mencionar que existe una controversia en cuanto a los efectos del CGP-42112A, ya que algunas veces el compuesto actúa como agonista o antagonista (Roberson, 1998; Ferguson *et al.*, 2001); nótese que el CGP-42112A mostró ambos efectos en las células cultivadas].

La disminución de corrientes de potasio por la Ang II ha sido descrita anteriormente en neuronas del hipotálamo y tallo cerebral de la rata (Gelband *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2001). Además, los efectos netos inducidos por la Ang II en la conductancia de la membrana celular, son similares a los descritos en neuronas del cuerno ventral de la médula espinal de la rata (Oz y Renaud, 2001). Ambos efectos, la reducción de corrientes de potasio y la disminución en la conductancia de la membrana celular, han sido descritos como resultado de la activación del receptor AT₁ en varias regiones del SNC de la rata, como en el hipotálamo, en los núcleos paraventricular y supraóptico, en el órgano subfornical y en el tallo cerebral (Sumners y Gelband, 1998; Gelband *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2001). Indicando que la Ang II puede inducir eventos semejantes en astrocitos y neuronas, aparentemente a través de diferentes receptores, al menos en esas áreas del

cerebro, en comparación con los resultados obtenidos de los cultivos celulares del CC de la rata postnatal.

La activación de los receptores AT₂ estimula la actividad de la fosfolipasa A₂ y como consecuencia, se produce la liberación del ácido araquidónico y sus metabolitos (*e.g.* prostaglandinas) (Sumners y Gelband, 1998). Estos últimos son capaces de modular la actividad de canales de potasio de rectificación tardía, como en neuronas del tallo cerebral (Zhu *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha descrito que ese tipo de corriente disminuye en neuronas del hipotálamo, como consecuencia de la activación de los receptores AT₁ (Zhu *et al.*, 1999). Al parecer la activación de los receptores AT₂ en los astrocitos del CC de la rata, induce un efecto opuesto al producido en las neuronas del tallo cerebral, dado que disminuye las corrientes de potasio de rectificación tardía. Este tipo de respuesta es posible que se produzca por los metabolitos del ácido araquidónico, ya que se ha descrito la presencia de la fosfolipasa A₂ en astrocitos fibrosos del CC de ratón (Lautens *et al.*, 1998). Además, es posible que el bajo porcentaje celular de astrocitos que responde a la Ang II en el CC de la rata, esté relacionado con lo descrito en astrocitos del tallo cerebral del ratón (Lautens *et al.*, 1998). Ya que dicha evidencia señala que algunas fibras de los astrocitos, inmunoreactivas a la fosfolipasa A₂, rodean a bazos sanguíneos, circunstancia que podría estar sucediendo en el CC de la rata (Fogarty y Matute, 2001). De esta manera, los astrocitos que están en contacto con las venas en el CC, serían capaces de interactuar con la Ang II cerebral (Phillips *et al.*, 1993). Permitiendo que el receptor AT₂ (sin descartar al receptor AT₁) presente en los astrocitos, se active y se lleve a cabo una comunicación entre estas dos entidades celulares dentro de esta comisura. Aunque una mayor investigación es necesaria para comprobar dichas hipótesis y así conocer cual es el impacto fisiológico de los receptores de la Ang II en el CC, en el desarrollo de la rata.

Conclusiones

El presente trabajo mostró que los astrocitos en cultivo del CC de la rata, dieron marca positiva al anticuerpo anti-GFAP (>90 %), y que presentaron receptores para la Ang II del tipo AT₂ (n = 7). El principal efecto que indujo la Ang II en los astrocitos fue una reducción de las corrientes de potasio, la cual afectó la conductancia de la membrana celular, disminuyéndola. Sin embargo los registros señalaron que la Ang II indujo otro tipo de corrientes en los astrocitos del CC de la rata postnatal, que no pudieron ser caracterizados por el bajo porcentaje celular que respondió a la Ang II, además de la variabilidad de las respuestas en las células, sobre todo en los astrocitos cultivados del CC de la rata de tres semana de edad.

El trabajo de investigación generó información acerca de las características eléctricas que indujo la Ang II en los astrocitos del CC de la rata postnatal, sugiriendo que la Ang II debe de funcionar como un transmisor de información para los astrocitos en el CC de la rata, el cual produce que las células modifiquen la conductancia de la membrana celular, evitando el flujo de iones potasio. El significado de esto, del mensaje y cuál es la relevancia de lo antes mencionado en la fisiología de los astrocitos del CC de la rata y más aún, de las señales o mensajes que se generan en las células gliales y neuronales del CC hacia el SNC, quedan por investigarse.

Bibliografía

- Berger T, Schnitzer J y Kettenmann H. 1991. Developmental changes in the membrane current pattern, K⁺ buffer capacity, and morphology of glial cells in the corpus callosum slice. *J Neurosci* 11:3008-24.
- Bernstein M, Lyons SA, Möller T y Kettenmann H. 1996. Receptor-mediated calcium signaling in glial cells from mouse corpus callosum slices. *J Neurosci Res* 46:152-163.
- Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC y Johns DG. 2001. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H2337-65.
- Bevan S, Gray PTA y Ritchie JM. 1984. A calcium-activated cation-selective channel in rat cultured Schwann cells. *Proc R Soc Lond B* 222:349-355.
- Bongarzone, ER, Howard SG, Schonmann V y Campagnoni AT. 1998. Identification of the dopamine D₃ receptor in oligodendrocytes precursors: potential role in regulating differentiation and myelin formation. *J Neurosci* 18:5344-53.
- Bordey A y Sontheimer H. 2000. Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* 30:27-38.
- Bottenstein JE y Sato G. 1985. *Cell culture in the neuroscience*. Plenum Press, USA.
- Brodal P. 1998. *The central nervous system: structure and function*. Second edition, Oxford University press, USA. pp: 19-22.
- Carpenter MB. 1994. *Neuroanatomía*. 4^o Edición. Editorial médica panamericana.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW y Unger TH. 2000. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Reviews* 52:415-472.

- Dietzel I. 1995. Voltage-gated ion currents in embryogenesis. *Persp Develop Neurobio* 2:293-308.
- Dolphin AC. 2003. G-protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Reviews* 45:607-267.
- Ferguson AV, Washburn DLS y Latchford KJ. 2001. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Exp Biol Med* 226:85-96.
- Fogarty D y Matute C. 2001. Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 35:131-146.
- Gard PR. 2002. The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *Euro J Pharmacol* 438:1-14.
- Gebke E, Müller AR, Jurzak M y Gerstberger R. 1998. Angiotensin II-induced calcium signaling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85:509-520.
- Gelband CH, Warth JD, Mason HS, Zhu M, Moore JM, Kenyon JL, Horowitz B y Summers C. 1999. Angiotensin II type 1 receptor-mediated inhibition of K⁺ channel subunit Kv2.2 in brain stem and hypothalamic neurons. *Circ Res* 84:352-9.
- Gray PTA, Bevan S y Ritchie JM. 1984. High conductance anion-selective channels in rat cultured Schwann cells. *Proc R Soc Lond B* 221:395-409.
- Gutte B. 1995. *Peptides*. Academic Press. USA. pp: 231-234.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ. 1981. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cells free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.

- Hösli L, Hösli E, Heuss L y Rojas J. 1989. Electrophysiological evidence for receptors for vasoactive intestinal peptide and angiotensin II on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett* 102:217-22.
- Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. 1995. *Essentials of neural science and behavior*. Appleton & Lange. Stamford, Connecticut, USA.
- Kuffler SW, Nicholls JG y Orkand RK. 1966. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 768-787.
- Lautens LL, Chiou XG, Sharp JD, Scott Young III W, Sprague DL, Ross LS y Felder CC. 1998. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) distribution in murine brain and functional studies indicate that cPLA2 does not participate in muscarinic receptor-mediated signaling in neurons. *Brain Res* 809:18-30.
- Li Z y Ferguson AV. 1996. Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: modulation of IA by angiotensin II. *Neuroscience* 71:133-145.
- MacVicar BA. 1984. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.
- Matute C, Lakshmidivi P, Río C, Valcárcel C y Miledi R. 1994. Properties of angiotensin II in glial cells from the adult corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci* 91:3774-3778.
- Montiel-Herrera M, Reyes-Haro D, García-Colunga J y Miledi R. 2001. Respuestas de dopamina y angiotensina II en células gliales del CC de ratas recién nacidas. *Memorias del V Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo*. 24-26 de septiembre. Juriquilla, Querétaro, México.

- Müller T, Möller T, Berger T, Schnitzer J y Kettenmann H. 1992. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256:1563-66.
- Orkand RK, Nicholls JG y Kuffler SW. 1996. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.
- Oz M y Renaud L. 2002. Angiotensin AT1-receptors depolarize neonatal spinal motoneurons and other ventral horn neurons via two different conductances. *J Neurophysiol* 88:2857-2863.
- Pan S-J, Zhu M, Raizada MK, Sumners C y Gelband CH. 2001. Ang II-mediated inhibition of neuronal delayed rectifier K⁺ current: role of protein kinase C- α . *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C17-C23.
- Phillips MI, Speakman EA y Kimura B. 1993. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue rennin angiotensin systems. *Regul Pep* 43:1-20.
- Ritchie JM. 1992. Voltage-gated ion channels in Schwann cells and glia. *TINS* 15:345-351.
- Robertson MJ. 1998. Angiotensin antagonists. En: *Receptor-based drug design*. (eds) Leff P. *Drugs and the pharmaceutical science*. Marcel Decker, Inc. 89: 207-230.
- Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedrager B, Brejc K, Sixma TK y Geraerts WPM. 2001. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411: 261-68.
- Sontheimer H, Trotter J, Schachner M y Kettenmann H. 1989. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursors cells in culture. *Nueron* 2:1135-45.

- Steinhäuser C, Kressin K, Kuprijanova E, Weber M y Seifert G. 1994. Properties of voltage-activated Na⁺ and K⁺ currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices. *Pflügers Arch* 428:610-620.
- Sullivan RM, Parker BA y Szechtman H. 1993. Role of the corpus callosum in expression of behavioral asymmetries induced by a unilateral dopamine lesion of the substantia nigra in the rat. *Brain Res* 609:347-50.
- Sumners A, Tang W, Zelezna B y Raizada MK. 1991. Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neuron and astrocytes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 88:7567-71.
- Sumners C y Gelband CH. 1998. Neuronal ion channel signaling pathways: modulation by angiotensin II. *Cell signal* 10:303-311.
- Sumners C, Tang W, Paulding W y Raizada MK. 1994. Peptide receptors in astroglia: focus on angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *Glia* 11:110-16.
- Tallant EA y Higson J. 1997. Angiotensin II activates distinct signal transduction pathways in astrocytes isolated from neonatal rat brain. *Glia* 19:333-42.
- Tham M, Sim MK y Tang FR. 2001. Location of renin-angiotensin system components in the hypoglossal nucleus of the rat. *Regul Pept* 101:51-57.
- Tonelli L, Jöhren O, Hoe KL, Häuser W y Saavedra JM. 2000. Gerbil angiotensin II AT1 receptors are highly expressed in the hippocampus and cerebral cortex during postnatal development. *Neuroscience* 94:981-91.
- Walz W. 2002. Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* 41:1-10.
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P y Meyerowitz E. 1998. Principles of development. Oxford University Press, Inc. N.Y. USA.

- Wright JW y Harding JW. 1997. Important roles for angiotensina III and IV in the brain rennin-angiotensin system. *Brain Res Rev* 25:96-124.
- Wyse B y Sernia C. 1997. Growth hormone regulates AT-1a angiotensin receptors in astrocytes. *Endocrinology* 138:4176-80.
- Zhu M, Gelban CH, Posner P y Sumners C. 1999. Angiotensin II decreases neuronal delayed rectifier potassium current: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurophysiol* 82:1560-8.
- Zhu M, Natarajan R, Nadler JL, Moore JM, Gelban CH y Sumners C. 2000. Angiotensin II increases neuronal delayed rectifier K⁺ current: role of 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *J Neurophysiol* 84:2494-501.
- Zhu M, Sumners C, Gelban CH y Posner P. 2001. Chronotropic effect of angiotensin II via type 2 receptors in rat brain neurons. *J Physiol* 85:2177-83.

Conclusiones

El presente trabajo mostró que los astrocitos en cultivo del CC de la rata, dieron marca positiva al anticuerpo anti-GFAP (>90 %), y que presentaron receptores para la Ang II del tipo AT₂ (n = 7). El principal efecto que indujo la Ang II en los astrocitos fue una reducción de las corrientes de potasio, la cual afectó la conductancia de la membrana celular, disminuyéndola. Sin embargo los registros señalaron que la Ang II indujo otro tipo de corrientes en los astrocitos del CC de la rata postnatal, que no pudieron ser caracterizados por el bajo porcentaje celular que respondió a la Ang II, además de la variabilidad de las respuestas en las células, sobre todo en los astrocitos cultivados del CC de la rata de tres semana de edad.

El trabajo de investigación generó información acerca de las características eléctricas que indujo la Ang II en los astrocitos del CC de la rata postnatal, sugiriendo que la Ang II debe de funcionar como un transmisor de información para los astrocitos en el CC de la rata, el cual produce que las células modifiquen la conductancia de la membrana celular, evitando el flujo de iones potasio. El significado de esto, del mensaje y cuál es la relevancia de lo antes mencionado en la fisiología de los astrocitos del CC de la rata y más aún, de las señales o mensajes que se generan en las células gliales y neuronales del CC hacia el SNC, quedan por investigarse.

Bibliografía

- Berger T, Schnitzer J y Kettenmann H. 1991. Developmental changes in the membrane current pattern, K^+ buffer capacity, and morphology of glial cells in the corpus callosum slice. *J Neurosci* 11:3008-24.
- Bernstein M, Lyons SA, Möller T y Kettenmann H. 1996. Receptor-mediated calcium signaling in glial cells from mouse corpus callosum slices. *J Neurosci Res* 46:152-163.
- Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC y Johns DG. 2001. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H2337-65.
- Bevan S, Gray PTA y Ritchie JM. 1984. A calcium-activated cation-selective channel in rat cultured Schwann cells. *Proc R Soc Lond B* 222:349-355.
- Bongarzone, ER, Howard SG, Schonmann V y Campagnoni AT. 1998. Identification of the dopamine D_3 receptor in oligodendrocytes precursors: potential role in regulating differentiation and myelin formation. *J Neurosci* 18:5344-53.
- Bordey A y Sontheimer H. 2000. Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* 30:27-38.
- Bottenstein JE y Sato G. 1985. *Cell culture in the neuroscience*. Plenum Press, USA.
- Brodal P. 1998. *The central nervous system: structure and function*. Second edition, Oxford University press, USA. pp: 19-22.
- Carpenter MB. 1994. *Neuroanatomía*. 4º Edición. Editorial médica panamericana.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW y Unger TH. 2000. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Reviews* 52:415-472.

- Dietzel I. 1995. Voltage-gated ion currents in embryogenesis. *Persp Develop Neurobio* 2:293-308.
- Dolphin AC. 2003. G-protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Reviews* 45:607-267.
- Ferguson AV, Washburn DLS y Latchford KJ. 2001. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Exp Biol Med* 226:85-96.
- Fogarty D y Matute C. 2001. Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 35:131-146.
- Gard PR. 2002. The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *Euro J Pharmacol* 438:1-14.
- Gebke E, Müller AR, Jurzak M y Gerstberger R. 1998. Angiotensin II-induced calcium signaling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85:509-520.
- Gelband CH, Warth JD, Mason HS, Zhu M, Moore JM, Kenyon JL, Horowitz B y Summers C. 1999. Angiotensin II type 1 receptor-mediated inhibition of K⁺ channel subunit Kv2.2 in brain stem and hypothalamic neurons. *Circ Res* 84:352-9.
- Gray PTA, Bevan S y Ritchie JM. 1984. High conductance anion-selective channels in rat cultured Schwann cells. *Proc R Soc Lond B* 221:395-409.
- Gutte B. 1995. *Peptides*. Academic Press. USA. pp: 231-234.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ. 1981. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cells free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.

- Hösli L, Hösli E, Heuss L y Rojas J. 1989. Electrophysiological evidence for receptors for vasoactive intestinal peptide and angiotensin II on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett* 102:217-22.
- Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. 1995. *Essentials of neural science and behavior*. Appleton & Lange. Stamford, Connecticut, USA.
- Kuffler SW, Nicholls JG y Orkand RK. 1966. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 768-787.
- Lautens LL, Chiou XG, Sharp JD, Scott Young III W, Sprague DL, Ross LS y Felder CC. 1998. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) distribution in murine brain and functional studies indicate that cPLA2 does not participate in muscarinic receptor-mediated signaling in neurons. *Brain Res* 809:18-30.
- Li Z y Ferguson AV. 1996. Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: modulation of IA by angiotensin II. *Neuroscience* 71:133-145.
- MacVicar BA. 1984. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.
- Matute C, Lakshmidivi P, Río C, Valcárcel C y Miledi R. 1994. Properties of angiotensin II in glial cells from the adult corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci* 91:3774-3778.
- Montiel-Herrera M, Reyes-Haro D, García-Colunga J y Miledi R. 2001. Respuestas de dopamina y angiotensina II en células gliales del CC de ratas recién nacidas. *Memorias del V Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo*. 24-26 de septiembre. Juriquilla, Querétaro, México.

- Müller T, Möller T, Berger T, Schnitzer J y Kettenmann H. 1992. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256:1563-66.
- Orkand RK, Nicholls JG y Kuffler SW. 1996. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788-806.
- Oz M y Renaud L. 2002. Angiotensin AT1-receptors depolarize neonatal spinal motoneurons and other ventral horn neurons via two different conductances. *J Neurophysiol* 88:2857-2863.
- Pan S-J, Zhu M, Raizada MK, Sumners C y Gelband CH. 2001. Ang II-mediated inhibition of neuronal delayed rectifier K⁺ current: role of protein kinase C- α . *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C17-C23.
- Phillips MI, Speakman EA y Kimura B. 1993. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue rennin angiotensin systems. *Regul Pep* 43:1-20.
- Ritchie JM. 1992. Voltage-gated ion channels in Schwann cells and glia. *TINS* 15:345-351.
- Robertson MJ. 1998. Angiotensin antagonists. En: *Receptor-based drug design*. (eds) Leff P. *Drugs and the pharmaceutical science*. Marcel Decker, Inc. 89: 207-230.
- Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedrager B, Brejc K, Sixma TK y Geraerts WPM. 2001. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411: 261-68.
- Sontheimer H, Trotter J, Schachner M y Kettenmann H. 1989. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursors cells in culture. *Nueron* 2:1135-45.

- Steinhäuser C, Kressin K, Kuprijanova E, Weber M y Seifert G. 1994. Properties of voltage-activated Na⁺ and K⁺ currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices. *Pflügers Arch* 428:610-620.
- Sullivan RM, Parker BA y Szechtman H. 1993. Role of the corpus callosum in expression of behavioral asymmetries induced by a unilateral dopamine lesion of the substantia nigra in the rat. *Brain Res* 609:347-50.
- Sumners A, Tang W, Zelezna B y Raizada MK. 1991. Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neuron and astrocytes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 88:7567-71.
- Sumners C y Gelband CH. 1998. Neuronal ion channel signaling pathways: modulation by angiotensin II. *Cell signal* 10:303-311.
- Sumners C, Tang W, Paulding W y Raizada MK. 1994. Peptide receptors in astroglia: focus on angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *Glia* 11:110-16.
- Tallant EA y Higson J. 1997. Angiotensin II activates distinct signal transduction pathways in astrocytes isolated from neonatal rat brain. *Glia* 19:333-42.
- Tham M, Sim MK y Tang FR. 2001. Location of renin-angiotensin system components in the hypoglossal nucleus of the rat. *Regul Pept* 101:51-57.
- Tonelli L, Jöhren O, Hoe KL, Häuser W y Saavedra JM. 2000. Gerbil angiotensin II AT1 receptors are highly expressed in the hippocampus and cerebral cortex during postnatal development. *Neuroscience* 94:981-91.
- Walz W. 2002. Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* 41:1-10.
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P y Meyerowitz E. 1998. Principles of development. Oxford University Press, Inc. N.Y. USA.

- Wright JW y Harding JW. 1997. Important roles for angiotensina III and IV in the brain rennin-angiotensin system. *Brain Res Rev* 25:96-124.
- Wyse B y Sernia C. 1997. Growth hormone regulates AT-1a angiotensin receptors in astrocytes. *Endocrinology* 138:4176-80.
- Zhu M, Gelban CH, Posner P y Sumners C. 1999. Angiotensin II decreases neuronal delayed rectifier potassium current: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurophysiol* 82:1560-8.
- Zhu M, Natarajan R, Nadler JL, Moore JM, Gelban CH y Sumners C. 2000. Angiotensin II increases neuronal delayed rectifier K⁺ current: role of 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *J Neurophysiol* 84:2494-501.
- Zhu M, Sumners C, Gelban CH y Posner P. 2001. Chronotropic effect of angiotensin II via type 2 receptors in rat brain neurons. *J Physiol* 85:2177-83.