

Universidad de Concepción

Escuela de Graduados

**Cambios en las propiedades del receptor de glicina durante
el desarrollo de neuronas espinales en cultivo. Efectos celulares
de la activación**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención

Biología Celular y Molecular



Juan Carlos Tapia Amaro

Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Fisiología

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Concepción – Chile

2002

IV Resumen

Evidencia experimental sugiere que el neurotransmisor inhibitorio glicina puede regular el crecimiento neurítico de neuronas embrionarias. Para evaluar esta hipótesis se propuso: 1) determinar cómo la activación del receptor de glicina en neuronas inmaduras afecta el crecimiento neurítico y el Ca^{+2} intracelular; 2) estudiar el patrón de expresión temporal de las subunidades del R_{glicina} en las neuronas y 3) estudiar la permeabilidad relativa del receptor de glicina a diferentes aniones durante el desarrollo *in vitro* de estas neuronas.

A través de técnicas inmunocitoquímicas, electrofisiológicas y fluorimétricas encontramos que: las neuronas de 5 DIV expresaron fundamentalmente R_{glicina} y $R\text{-GABA}_A$ pero no receptores del tipo NMDA y no-NMDA. La activación de R_{glicina} y $R\text{-GABA}_A$ fue responsable de la actividad sináptica y de los incrementos de Ca^{+2}_i presentes en estas neuronas. Interesantemente, la neurotransmisión glicinérgica reguló la excitabilidad de la GABAérgica a través de un mecanismo de corto circuito neuronal (disminución de la R_m). La incubación crónica con glicina ($\geq 100 \mu\text{M}$, 48 hr) promovió el crecimiento neurítico de las neuronas, el que fue resistente a estriquina. Registros electrofisiológicos mostraron que la desactivación ó la inhibición del R_{glicina} son responsables del efecto trófico. Coaplicación de TTX, nimodipino y bicuculina inhibieron este efecto mientras que APV y CNQX no tuvieron efecto. Por lo tanto, postulamos que la actividad sináptica GABAérgica, regulada por la glicinérgica, es responsable del crecimiento neurítico en neuronas espinales de 5 DIV.

Por otro lado, por medio de RT-PCR en neuronas espinales en cultivo encontramos que las subunidades del R_{glicina} presentaron un patrón de expresión

temporal. La subunidad α_2 fue expresada principalmente en neuronas de 5-7 DIV y no en neuronas >10 DIV. La mayor expresión de la subunidad α_1 fue encontrada en neuronas de >10 DIV. La subunidad β presentó un patrón similar al de la subunidad α_1 , mayor en neuronas de 10-14 y 18-21 DIV que en las de 5-7 DIV. En resumen, postulamos que el R_{glicina} en neuronas de 5-7 DIV está formado por subunidades $\alpha_2\beta$ mientras que en neuronas $\geq 10-14$ por las subunidades $\alpha_1\beta$.

Mostramos también en esta tesis que: 1) el E_{glicina} varió de acuerdo a la actividad del Cl^- extracelular en todas las etapas del desarrollo *in vitro*; 2) la permeabilidad de R_{glicina} a HCO_3^- relativa a Cl^- fue de 0.10 en todas las etapas del desarrollo 3) y el rango de permeabilidades relativas $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{propionato}^- > \text{acetato}^- > \text{HCO}_3^-$ no fue afectado por el desarrollo *in vitro*; 4) furosemida, inhibidor de KCC2, aumentó el E_{glicina} ($\sim +20$ mV) en neuronas ≥ 14 DIV y 5) el recambio del HEPES por HCO_3^- no afectó el E_{glicina} en neuronas inmaduras. De acuerdo con los resultados, postulamos que KCC2, y no cambios en la permeabilidad a HCO_3^- , sería responsable de la depolarización inducida por R_{glicina} en neuronas espinales embrionarias.

En conclusión, postulamos que la neurotransmisión glicinérgica, la primera en ser expresada en neuronas espinales en cultivo, regula la excitabilidad y el crecimiento neurítico en neuronas de 5 DIV.