

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Molecular features of glycine-mediated
neurotransmission in rat brain**

Rita Isabel Pedro Aroeira

Doutoramento em Ciências Biomédicas
Especialidade em Neurociências

2014

Resumo:

A glicina, um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, actua através da ligação aos seus receptores de elevada afinidade localizados na membrana pós-sináptica, os receptores de glicina. Os receptores de glicina são canais pentaméricos, compostos por várias subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e β). A terminação da actividade sináptica mediada pela glicina ocorre através da remoção do neurotransmissor do espaço extracelular, e é mediada por dois transportadores de glicina, GlyT1 (*glycine transporter 1*) e GlyT2 (*glycine transporter 2*). É aceite pela comunidade científica que o GlyT1 é maioritariamente expresso em astrócitos enquanto o GlyT2 é predominantemente expresso em terminais glicinérgicos.

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) é uma neurotrofina que activa os seus receptores de elevada afinidade, denominados TrkB (*tropomyosin-related kinase B*), que inclui as isoformas completa (TrkB-FL - *TrkB full length*) e troncada (TrkB-T1/T2). Durante este trabalho, foram estudados os elementos principais da sinapse glicinérgica nos três componentes que constituem a sinapse tripartida no cérebro de rato. A localização do receptor de glicina e a sua composição ao nível das subunidades foram investigadas em neurónios pós-sinápticos, a expressão do GlyT2 foi avaliada em terminais de neurónios pré-sinápticos e a expressão e localização do GlyT1 e do GlyT2 foram analisadas em astrócitos.

Para avaliar se os transportadores de glicina são funcionais, foram realizadas experiências de recaptção da [^3H]glicina com inibidores selectivos, o Org-24598 e o ALX-1393, do GlyT1 e do GlyT2, respectivamente. Foi igualmente analisado o efeito do BDNF na recaptção de glicina mediada pelos seus transportadores em culturas primárias de astrócitos de córtex de rato e em terminais de neurónios pré-sinápticos. Além disso, as vias de sinalização envolvidas no efeito do BDNF foram avaliadas através de uma abordagem farmacológica.

Ensaio de imunofluorescência em fatias de cérebro mostraram a predominância do receptor de glicina extrasináptico e alterações na composição do receptor de glicina sináptico. A P7, os receptores pós-sinápticos são maioritariamente constituídos por subunidades $\alpha 2/\beta$. No hipocampo de um animal mais maduro (P21) o número de receptores de glicina sinápticos diminui e são compostos por subunidades $\alpha 1/\beta$. Deste

modo, os receptores de glicina extrasinápticos compostos pelas subunidades $\alpha 2/\alpha 3$ tornam-se predominantes.

Foi também demonstrado que os terminais de neurónios pré-sinápticos de hipocampo expressam o GlyT2. Experiências de PCR quantitativo indicam que os transcritos que codificam para o GlyT1 e o GlyT2 são expressos em culturas primárias de astrócitos sendo que, uma análise por imunofluorescência corrobora estes resultados, pois o GlyT1 e o GlyT2 foram também detectados em astrócitos, quer em culturas primárias quer em fatias de cérebro.

Através dos ensaios de recaptação da [^3H]glicina, foi demonstrado que o GlyT2 em terminais de neurónios pré-sinápticos, e ambos os transportadores (GlyT1 e GlyT2) em astrócitos, são funcionais.

Foi ainda descrito que o BDNF diminui a recaptação de glicina mediada pelos seus transportadores que, na presença de BDNF, apresentam valores semelhantes de K_m e uma diminuição no valor de V_{max} , tanto em astrócitos como em terminais de neurónios pré-sinápticos. Em astrócitos, o BDNF actua através da ligação aos seus receptores truncados TrkB-T1, promovendo a internalização do GlyT1 e do GlyT2 através de um mecanismo dependente de Rho-GTPases. Em terminais de neurónios pré-sinápticos, o efeito do BDNF ocorre devido à activação dos receptores TrkB-FL e das subsequentes vias de sinalização intracelulares, nomeadamente a PLC, a Akt e a MAPK, originando a inibição da inserção do GlyT2 na membrana plasmática.

Este trabalho confirma a existência de sinapses glicinérgicas no cérebro, pois foi mostrada a predominância do receptor de glicina nas regiões extrasinápticas, o que sugere que a glicina pode ser importante para a neurotransmissão tónica, assim como a presença de GlyT1 e GlyT2 em astrócitos e a expressão de GlyT2 nos neurónios pré-sinápticos. Foi ainda investigada a modelação dos transportadores de glicina pelo BDNF.

Em conclusão, este trabalho proporciona uma nova visão sobre a transmissão glicinérgica no cérebro.

Palavras-chave: glicina, receptor de glicina, transportadores de glicina, cérebro, BDNF, receptor TrkB.