

10. Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia

CECILIO GIMÉNEZ
Y
FRANCISCO ZAFRA

RESUMEN

La esquizofrenia es una enfermedad compleja que afecta a alrededor del 1% de la población mundial y constituye una de las más importantes causas de discapacidad crónica. Aunque su etiología es desconocida, la enfermedad implica diversas anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas y se acepta que factores genéticos, bien solos o potenciados por factores ambientales y epigenéticos juegan un papel importante en su patogénesis. Desde el punto de vista clínico la enfermedad se caracteriza por la aparición de episodios temporales de una serie de síntomas que se clasifican en tres categorías: i) síntomas positivos, que incluyen alucinaciones, ilusiones o paranoia; ii) síntomas negativos, como el aislamiento social, la incapacidad para el afecto o la apatía; y, iii) síntomas cognitivos, como alteraciones en la atención, la memoria y las funciones ejecutivas. Numerosos estudios realizados durante los últimos 40 años han relacionado a alteraciones en la neurotransmisión mediada por aminas biógenas con la patología de las psicosis esquizofrénicas. La llamada «hipótesis dopaminérgica» se basaba en la observación de que fármacos efectivos en el tratamiento de la enfermedad, al menos de los síntomas positivos, son antagonistas de receptores dopaminérgicos. Además, algunos de los síntomas de la esquizofrenia pueden ser reproducidos por drogas como las anfetaminas, que actúan elevando el tono dopaminérgico. Datos experimentales más recientes también han implicado a la neurotransmisión glutamatérgica en la enfermedad, en lo que se conoce como «hipótesis de la hipofunción de los receptores de NMDA». Esta hipótesis deriva de la observación de que diversos antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA como la ketamina, la fenciclidina o el MK-801 mimetizan numerosos síntomas de la esquizofrenia en individuos adultos sanos y recrudescen los síntomas en individuos esquizofrénicos, tanto en lo que se refiere a los

síntomas positivos, como a los negativos y cognitivos. Esta hipótesis se ha visto reforzada por el descubrimiento de varios genes de susceptibilidad relacionados con las vías glutamatérgicas (*G72*, *NRG1*, *GRIA4*, *GRM3*, *GRM8*, *GRIN2D*, o *GRIN2A*). De cualquier forma, la hipótesis glutamatérgica y la dopaminérgica no son mutuamente excluyentes ya que, por ejemplo, la liberación de glutamato está regulada por receptores presinápticos de dopamina D2 en las vías corticolímbicas y corticoestriatales. De esta hipótesis se deriva que la elevación de los niveles de glutamato o de su coagonista glicina pueda ser beneficiosa en el tratamiento de la enfermedad. De hecho, en este momento hay varios compuestos en fase clínica de investigación que actúan sobre la neurotransmisión glutamatérgica, y más concretamente sobre el sitio de glicina del receptor de NMDA.

Palabras clave: Receptores NMDA. Glicina. Glutamato. Transportadores. Psicosis.

ABSTRACT

Glutamatergic hypothesis of schizophrenia

The schizophrenia is a complex disease that affects up to 1% of the population worldwide, and is one of the leading causes of chronic disability. While its etiology is currently unknown, it is accepted that genetic factors, either alone or in combination with environmental or epigenetic factors, play an important role in its pathogenesis. From a clinical point of view, this disease is characterized by the appearance of temporal episodes of a number of symptoms that are classified into three categories; i) positive symptoms, which include hallucinations, illusions and paranoia; ii) negative symptoms, like social isolation, inability for affection or apathy; and iii) cognitive symptoms, like alterations in attention, memory and executive functions. Many studies performed along the last 40 years have related alterations in biogenic amines neurotransmission with the pathology of schizophrenic psychosis. The so called «dopaminergic hypothesis» was based on the observation that some compounds that were effective in treatment of this disease, at least in positive symptoms, were blockers of the dopamine receptors. Moreover, some of the symptoms of schizophrenia are recapitulated by abuse drugs like amphetamines, which increase the dopaminergic tone. More recent experimental data also involve glutamatergic neurotransmission in schizophrenia through the so called «hypofunction of NMDA receptors hypothesis». This hypothesis derives from the observation that various

antagonists of the NMDA subtype of glutamate receptor, like ketamine, phencyclidine or MK801 mimics numerous symptoms of schizophrenia in healthy adult individuals and potentiates the symptoms in schizophrenic patients, either the positive, or negative and cognitive symptoms. This hypothesis has been reinforced by the discovery of several susceptibility genes that are related to the glutamatergic pathways (*G72*, *NRG1*, *GRIA4*, *GRM3*, *GRM8*, *GRIN2D*, o *GRIN2A*). Anyhow, the glutamatergic and dopaminergic hypotheses are not mutually exclusive since, for instance, glutamate release is controlled by presynaptic D2 dopamine receptors in corticolimbic and corticostriatal pathways. From the glutamatergic hypothesis derives that elevation in glutamate levels, or those of the obligate co-agonist glycine, might be beneficial for treatment of this illness. In fact, there are several compounds in clinical stages of research that act on glutamatergic neurotransmission, more concretely on the glycine binding site on the NMDA receptor.

Keywords: NMDA receptors. Glycine. Glutamate. Transporters. Psychosis.

INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad compleja que afecta a alrededor del 1% de la población mundial y constituye una de las más importantes causas de discapacidad crónica. Aunque su etiología es desconocida, la enfermedad implica diversas anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas y se acepta que factores genéticos, bien solos o potenciados por factores ambientales y epigenéticos juegan un papel importante en su patogénesis. Desde el punto de vista clínico la enfermedad se caracteriza por la aparición de episodios temporales de una serie de síntomas que se clasifican en tres categorías: i) síntomas positivos, que incluyen alucinaciones, ilusiones o paranoia; ii) síntomas negativos, como el aislamiento social, la incapacidad para el afecto o la apatía; y, iii) síntomas cognitivos, como alteraciones en la atención, la memoria y las funciones ejecutivas. Se puede decir que el coste personal para el enfermo y la carga para la familia, así como el coste económico para la sociedad es enorme (1, 2).

Numerosos estudios realizados durante los últimos 40 años relacionaron alteraciones de la neurotransmisión mediada por aminas biógenas con la patología de las psicosis esquizofrénicas. De hecho, el primer tratamiento efectivo en el tratamiento de la esquizofrenia se descubrió de manera fortuita a finales de los años cincuenta demostrándose con posterioridad la participación de receptores dopaminérgicos del tipo D2 en el mismo. La llamada «hipótesis dopaminérgica» ha prevalecido hasta hace muy poco y se basaba en la observación de

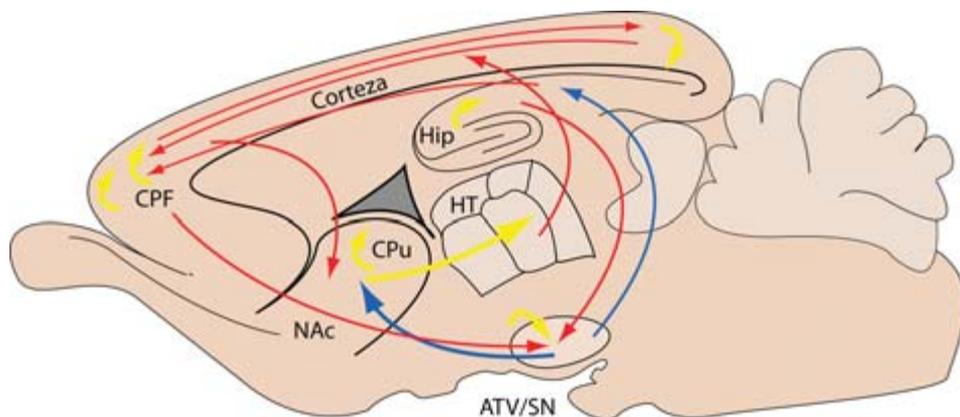


FIGURA 1. *Esquema de un corte sagital de cerebro de ratona en el que se indican las principales vías de neurotransmisión involucradas en psicosis. Líneas rojas, glutamatergicas; azules, dopaminérgicas; amarillas, gabaérgicas. ATV, área ventral tegmental; SN, sustancia nigra; HT, hipotálamo; NAc, núcleo accumbens; Cpu, cuerpo estriado; CPF, corteza prefrontal; Hip, hipocampo.*

que prácticamente todos los fármacos efectivos en el tratamiento de la enfermedad como el haloperidol (los llamados antipsicóticos «típicos»), o como la clozapina o la olanzapina (los llamados «atípicos»), son antagonistas de receptores dopaminérgicos D2 (Figura 1). Todo ello, junto con la observación de que agonistas dopaminérgicos indirectos como la cocaína o las anfetaminas, que actúan elevando el tono dopaminérgico, inducen algunos de los síntomas de la esquizofrenia, apoyaron la idea de que alteraciones en niveles de dopamina constituirían el agente causal de la enfermedad (3-5).

En un periodo de casi cuarenta años, numerosas compañías farmacéuticas han desarrollado compuestos que, actuando sobre receptores dopaminérgicos D2, actuaran como antipsicóticos. Sin embargo, todos estos fármacos presentan deficiencias en su acción en varios sentidos. Aproximadamente el 25% de los pacientes con esquizofrenia no experimentan mejoría alguna tras el tratamiento. Por otra parte, los antagonistas de los receptores D2 solamente son efectivos para el tratamiento de síntomas positivos de la enfermedad, mientras que los síntomas negativos y el déficit cognitivo permanecen. Más aún, los efectos secundarios derivados del tratamiento son muy numerosos e incluyen sedación, ganancia de peso, disfunción sexual y toda una gama de síntomas propios de enfermedades como la diabetes, el Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (revisiones en 6 y 7).

Todos los datos acumulados durante años de práctica clínica en el tratamiento de la esquizofrenia, junto con datos experimentales más recientes, llevaron al

convencimiento de que la hipótesis de la hiperfunción dopaminérgica constituía sólo una parte de la etiología de la enfermedad. Resumiendo observaciones de los últimos años cabe destacar las siguientes. Tal como se ha comentado anteriormente, estimulantes del sistema psicomotor como las anfetaminas y la cocaína, así como alucinógenos de la familia del ácido lisérgico eran bien conocidos por inducir estados de psicosis en humanos (síntomas positivos clásicos de la esquizofrenia). Por el contrario, se descubrió que la administración de antagonistas del receptor de glutamato del tipo NMDA (NMDARs) como fenilciclidina (PCP), dizocilpina (MK-801) o la ketamina, hacen aparecer de una forma asombrosamente mimética tanto síntomas positivos como negativos y cognitivos de la esquizofrenia. Estos datos, primariamente observados en animales, han sido repetidamente comprobados en grupos de humanos clínicamente controlados o en individuos consumidores de PCP como droga de abuso, los cuales presentan síntomas clínicamente indistinguibles de individuos esquizofrénicos. Por otro lado, y en sentido contrario, hay evidencias clínicas de que la administración a pacientes esquizofrénicos de co-agonistas de receptores NMDA les hacen mejorar, aunque de forma modesta, de muchos de los rasgos característicos de la enfermedad (8).

En los últimos años, evidencias experimentales como las reseñadas más arriba han llevado al convencimiento de que la neurotransmisión glutamatérgica está implicada en la enfermedad, en lo que actualmente se conoce como «hipótesis de la hipofunción de los receptores de NMDA» (9, 10). Esta hipótesis se ha visto reforzada por el descubrimiento de varios genes de susceptibilidad relacionados con las vías glutamatérgicas (*G72*, *NRG1*, *GRIA4*, *GRM3*, *GRM8*, *GRIN2D*, o *GRIN2A*) (11). De cualquier forma, la hipótesis glutamatérgica y la dopaminérgica no son mutuamente excluyentes ya que, por ejemplo, la liberación de glutamato está regulada por receptores presinápticos de dopamina D2 en las vías corticolímbicas y corticoestriatales. De esta hipótesis se deriva que la elevación de los niveles de glutamato y de su coagonista glicina (ver más abajo) puedan ser beneficiosos en el tratamiento de la enfermedad. De hecho, en este momento hay un número considerable de compuestos en fase clínica de investigación, que actúan sobre la neurotransmisión glutamatérgica, y más concretamente sobre el receptor metabotrópico GRM3 o sobre el sitio de unión de glicina al receptor de NMDA (12-15).

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El glutamato, aparte de constituir uno de los veinte aminoácidos proteínogénicos, es el neurotransmisor mayoritario en el sistema nervioso central de los mamíferos. Se puede afirmar que prácticamente todas las vías tálamo-

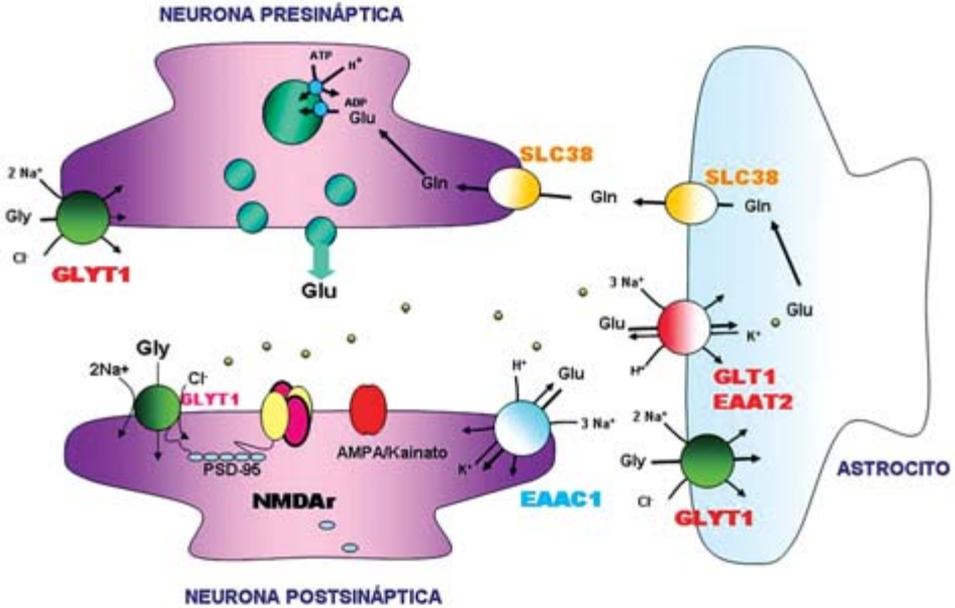


FIGURA 2. *Esquema de una sinapsis glutamatergica que incluye el ciclo glutamato-glutamina. GLT1, transportador de glutamato; GLYT1, transportador de glicina tipo 1; SLC38, transportador de glutamina. Se esquematizan los receptores de glutamato del tipo AMPA y NMDA.*

corticales, córtico-corticales y la mayoría de las aferentes de la corteza están mediadas por glutamato. Esto hace que alrededor del 60% de todas las neuronas del cerebro, incluyendo las piramidales de la corteza y las neuronas de relevo del tálamo, utilicen glutamato como neurotransmisor. El glutamato se acumula en el interior de las vesículas sinápticas de las neuronas glutamatergicas, donde puede alcanzar concentraciones por encima de 100 mM, y es liberado por las mismas en respuesta a despolarizaciones de la neurona mediante un sistema de exocitosis dependiente de calcio, o por reversión de alguno de sus transportadores. El glutamato ya liberado se recicla mediante la actuación de transportadores específicos y dependientes de sodio, que controlan además su concentración extracelular dentro de límites muy estrechos (Figura 2). Esta función de regulación de concentraciones adecuadas de glutamato extracelular es tan importante que consume aproximadamente dos tercios de toda la energía metabólica generada por el cerebro. Posteriormente, el glutamato interacciona con uno de los receptores postsinápticos o gliales cercanos al terminal nervioso completando la vía de señalización nerviosa rápida mediada por este neurotransmisor.

El glutamato ejerce su acción a través de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos, aunque la neurotransmisión glutamatérgica rápida está mediada por los primeros puesto que los receptores metabotrópicos, a través de su asociación con proteínas G, median efectos neuromoduladores a largo plazo. Receptores ionotrópicos de glutamato hay de tres clases: receptores AMPA (por ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolenpropionico), receptores de kainato, y receptores NMDA (por N-metil-D-aspartato). Todos ellos son proteínas multiméricas de membrana que, tras su unión a glutamato, responden abriendo un canal iónico induciendo así corrientes excitatorias postsinápticas. De todos ellos, los receptores de glutamato implicados en la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia son los receptores del tipo NMDA, y en ellos centraremos este capítulo. Más aún, estos receptores no sólo intervienen en la transmisión rápida de la señal eléctrica sino que, gracias a la permeabilidad a calcio, activan numerosas rutas de señalización intracelular esenciales en la activación de procesos de plasticidad neuronal, base de la memoria o el aprendizaje. La sobreestimulación de estos receptores está asociada al fenómeno de la excitotoxicidad, que conlleva la muerte de las neuronas y que está asociada a procesos patológicos como los observados en episodios isquémicos o neurodegenerativos (revisiones en 16, 17).

Receptores de glutamato NMDA

Los receptores de glutamato del tipo NMDA son proteínas de membrana muy complejas tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Los NMDARs son estructuras oligoméricas que forman un canal catiónico operado por ligando el cual permite la permeación de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Los NMDARs presentan una serie de propiedades que los hacen únicos entre los canales iónicos dependientes de ligando, como son su bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje y su alta permeabilidad a Ca^{2+} (16, 17).

Constituyen una familia en la que cada miembro está compuesto por varias subunidades (generalmente cuatro) de las cuales al menos una es del tipo NR1 y una o varias subunidades reguladoras del tipo NR2A-NR2D, lo que proporciona una gran diversidad de formas moleculares diferentes. Hasta el momento sólo se ha clonado un gen del tipo NR1 y cuatro del tipo NR2. Para que el receptor sea funcional, al menos debe estar formado por una subunidad del tipo NR1 y una del tipo NR2. Las subunidades del tipo NR1 son sintetizadas en exceso por las células nerviosas, y son retenidas en el retículo endoplasmático hasta que puedan ser ensambladas con unidades del tipo NR2. La isoforma NR2D constituye una forma de aparición temprana durante los primeros estadios del

desarrollo la cual va disminuyendo con la edad hasta alcanzar valores mínimos en el adulto. Las formas NR2A y NR2B son las predominantes en el cerebro mientras que la NR2C se encuentra principalmente en cerebelo. La diferente composición en subunidades proporciona características propias a cada forma del receptor, lo que se traduce en localizaciones regionales diferentes y en propiedades funcionales diferentes: tiempo de apertura del canal, variación en las propiedades de permeación, etc. (18, 19).

La complejidad funcional de los receptores NMDA a la que se aludía anteriormente, se manifiesta por el gran número de sitios de reconocimiento y unión a ligandos que poseen, así como por las interacciones alostéricas que las mismas provocan. Además del sitio de unión a glutamato, estos receptores contienen un sitio de unión a substratos endógenos como glicina y D-serina, aunque ninguno de los dos tiene la capacidad de abrir el canal en ausencia de glutamato. El sitio de unión a glicina regula, en presencia del co-agonista principal el glutamato, el tiempo de apertura del canal así como la velocidad de desensibilización del mismo. A pesar de que la glicina es necesaria, junto con el glutamato, para la activación de los NMDARs, durante mucho tiempo ha existido una polémica importante sobre el papel fisiológico de la misma en la sinapsis glutamatérgica. Esto se debió al hecho de que la afinidad del sitio de glicina es tan alta que muchos autores pensaron que estaría tónicamente saturado a las concentraciones de glicina habituales en la hendidura sináptica (10 μM) (20). Sin embargo, cálculos teóricos basados en las propiedades electrofisiológicas de los transportadores de glicina GLYT1 indicaban que estas proteínas podrían reducir la concentración de glicina en el emplazamiento local del NMDAR hasta una concentración de 1 μM o menos, es decir, hasta niveles no saturantes (21, 22). Esta posibilidad se ha visto reforzada por estudios funcionales recientes que muestran que el compuesto N-(3-4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil-sarcosina (NFPS), un inhibidor específico del transportador de glicina GLYT1, potencia las respuestas mediadas por NMDA tanto *in vitro* como *in vivo* (23, 24). A esta función de «aclaramiento» de los niveles de glicina también pueden contribuir, como se describirá más adelante, otros transportadores de aminoácidos neutros (SNATs) capaces de retirar glicina del espacio extracelular.

Los NMDARs contienen, además del sitio de unión a glicina, otros sitios reguladores que reconocen poliaminas, protones, Zn^{2+} y glutatión (entre otros agentes redox). El significado fisiológico, la interacción y coordinación de todos estos sitios reguladores no se conocen con detalle hasta el momento, pero da una idea de la complejidad de funcionamiento de estas proteínas, así como de su intervención en múltiples procesos. Otro aspecto muy interesante de estos receptores es que se bloquean por iones Mg^{2+} en un proceso dependiente de

voltaje. Esta singularidad hace que puedan funcionar en forma de «apagado» o «encendido» por simples cambios en el potencial de membrana. El Mg^{2+} se une a un sitio específico que se encuentra en el interior del poro iónico y cercano físicamente al sitio de unión de los antagonistas (bloqueantes) del canal (ketamina, fenilciclidina, dizocilpina). Como resultado de estas interacciones, es que los NMDARs son los únicos receptores sensibles a voltaje además de sensibles a ligando, lo que les sitúa en una «posición de privilegio» para, integrando señales múltiples, actuar en procesos de potenciación a largo plazo.

Los receptores de glutamato del tipo NMDA y AMPA funcionan de forma coordinada y se encuentran físicamente cercanos en las densidades postsinápticas. La activación de receptores AMPA proporcionan la despolarización primaria de la membrana necesaria para retirar el bloqueo por Mg^{2+} de los NMDARs y permitir así la entrada de Ca^{2+} en el interior celular. De hecho, antagonistas selectivos de los receptores AMPA podrían ser efectivos en situaciones como el ic-tus o la epilepsia donde las concentraciones extracelulares de glutamato son muy altas (superiores a 1-5 μM , que son las normales) actuando como excitotóxico (12). Un aspecto importante referente a este tipo de interacciones concertadas entre proteínas de las sinapsis es su imperiosa necesidad de posicionarse en el sitio adecuado y en el momento oportuno. Tanto los NMDARs como los de AMPA interaccionan con proteínas adaptadoras a través de las cuales se anclan en las densidades postsinápticas (PSD) a otras proteínas como quinasas, fosfatasa, transportadores y a receptores metabotrópicos de glutamato donde actúan formando grandes complejos macromoleculares de señalización (revisión en 25).

Los NMDARs se unen a PSD-95 (synapse-associated protein-90) y a SAP-102 (synapse associated protein-102) dos proteínas adaptadoras con dominios PDZ. La unión a través de proteínas de andamiaje interpuestas proporciona un entorno propicio para la actuación de estas proteínas en la función sináptica puesto que las fija y posiciona de una forma idónea para su función. Sin embargo, la propiedad de estos receptores para adherirse a proteínas de andamiaje molecular en las densidades postsinápticas no puede verse de una forma completamente estática. Hoy se sabe que estos macrocomplejos cambian de forma dinámica dependiendo del tipo celular y de las condiciones o en respuesta a estímulos sensoriales. En primer lugar, para que los receptores de membrana funcionen normalmente requieren una biogénesis y direccionamiento exacto a su destino en la sinapsis, en este caso a las densidades postsinápticas de neuronas glutamatérgicas, y de forma coordinada con proteínas asociadas como ocurre con receptores AMPA y NMDA. Por ejemplo, en sinapsis nacientes se sabe que las subunidades de NMDARs sintetizadas en el cuerpo celular recorren un largo camino a lo largo de los microtú-

bulos hasta su lugar de destino empaquetadas en vesículas que «reconocen» su localización final axodendrítica. Los receptores AMPA hacen un viaje similar, pero de forma más lenta y en vesículas diferentes. Las subunidades de estas proteínas, una vez sintetizadas, maduran en el retículo endoplasmático e interaccionan finalmente con SAP-102 en el Golgi y SEC8, una proteína del complejo del exocisto. Allí son empaquetadas en vesículas, las cuales son transportadas por los microtúbulos con el concurso de proteínas adaptadoras (LIN2, LIN7 y LIN10) mediante la kinesina17, una proteína motora móvil. Estos complejos se mueven de manera anterógrada y retrógrada hasta alcanzar sus destinos en las espinas dendríticas. Los últimos pasos en el tráfico del receptor hasta su inserción en la membrana están regulados por fosforilación dependiente de PKC y de PKA. A pesar de la intensa investigación sobre estos receptores en las últimas dos décadas, aún no se conocen bien el número, la composición en subunidades y su función tanto sináptica como extrasináptica (25).

Interacciones de los NMDARs con proteínas PDZ como PSD-95, y otras mencionadas anteriormente, se realiza con la intervención de motivos estructurales específicos que se encuentran en los largos extremos carboxilo de las subunidades NR2 localizados intracelularmente (26). La unión de los NMDARs con PSD-95 no sólo proporciona un sitio de anclaje, sino que hace variar las propiedades funcionales del canal: aumenta su apertura y disminuye su desensibilización tras respuestas continuadas.

El número y la composición en subunidades de los NMDARs en las sinapsis no sólo están regulados por la expresión génica y la síntesis proteica dependiente de estímulos, sino también mediante la regulación de su degradación a través del sistema del proteasoma dependiente de ubiquitina.

El resultado final es que estos receptores están sometidos a un tráfico intracelular muy dinámico hacia la membrana, desde la membrana o a su degradación. Por otra parte, se sabe que se mueven lateralmente cambiando así su localización e interacción con otras proteínas de membrana. Una interacción muy interesante de los receptores NMDA es su unión a receptores dopaminérgicos del tipo D1 a través de movimientos laterales de los dos receptores. Este tipo de interacciones, demostradas en células en cultivo, se han confirmado morfológicamente. En neuronas de estriado se ha demostrado la existencia de sinapsis complejas en la que una misma espina dendrítica es el blanco de una sinapsis asimétrica glutamatérgica y de una sinapsis simétrica dopaminérgica. Estas asociaciones son de un gran interés funcional y abren unas posibilidades enormes en cuanto a las implicaciones fisiopatológicas que puedan tener, aunque hasta el momento se desconocen en gran medida (27).

Receptores NMDA y esquizofrenia

Datos recientes obtenidos en estudios con animales de experimentación han llevado a la idea generalizada de que una hipofunción en los receptores NMDA está involucrada en la etiología de la esquizofrenia. Ratones con niveles de la subunidad NR1 ligeramente inferiores a los normales, y ratones KO de la subunidad NR2 muestran un comportamiento muy similar a síntomas clínicos de esquizofrenia que pueden ser atenuados mediante el tratamiento con antipsicóticos. Por otra parte, animales genéticamente modificados en el sitio de unión de glicina en NMDAR1 muestran alteraciones en procesos de potenciación a largo plazo (LTP) y de aprendizaje. Estos datos, junto con otros derivados de la clínica, son los que apoyan el papel de los receptores NMDA en esquizofrenia, y el convencimiento de que agentes capaces de potenciar la actividad de receptores NMDA pueden mejorar los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la enfermedad. Como se indicó anteriormente, esta hipótesis ni anula ni está en contraposición con la hipótesis de la hiperfunción dopaminérgica en esquizofrenia. De hecho hoy se sabe experimentalmente que una hipofunción en la actividad de receptores NMDA podría ser responsable de una situación hiperdopaminérgica. El flujo de dopamina aumenta tras el tratamiento con agentes antagonistas de NMDA y, por otra parte, agentes antipsicóticos atípicos revierten los efectos psicomiméticos producidos por PCP y ketamina (revisado en 9).

Los receptores NMDA, puesto que poseen tantos y tan variados sitios moduladores de regulación deberían ofrecer, al menos en teoría, muchas posibilidades de manipulación farmacológica. Sin embargo, todos los agonistas directos de los receptores sintetizados y ensayados hasta el momento, han resultado ser neurotóxicos o conllevan efectos indeseados paralelos muy importantes. Una vía indirecta de activación de los receptores NMDA parece ser más efectiva. Se trata de intervenir a través de sitios moduladores indirectos como el sitio de unión de aminos y, sobre todo, el sitio del co-agonista obligado glicina. A través de este mecanismo, los niveles de glutamato no se alteran o son regulados extracelularmente por sus transportadores. Los primeros ensayos clínicos administrando glicina a pacientes esquizofrénicos han dado resultados modestos, posiblemente debido a la baja penetración de la glicina, aunque indefectiblemente apoyan la hipótesis glutamatérgica de la enfermedad. Mucho más efectivos parecen ser las aproximaciones derivadas del aumento de niveles sinápticos de glicina mediante la inhibición de sus sistemas de recaptura, tal como se describirá más adelante.

Sistemas de transporte de glutamato

El glutamato es recapturado de las sinapsis glutamatérgicas por miembros de la familia génica SLC1, que está constituida por sistemas de transporte activo secundario acoplados al movimiento de los iones sodio y potasio. Se conocen cinco genes implicados en este proceso (denominados EAAT1 o GLAST, EAAT2 o GLT1, EAAT3, EAAT4 y EAAT5) (28). Algunos de ellos generan varias proteínas por mecanismos de procesamiento alternativo. Todos los transportadores de la familia poseen un alto nivel de conservación de la secuencia peptídica que sugiere una organización estructural común. De hecho, todos ellos podrían tener un origen común con un transportador de la arqueobacteria termófila *Pyrococcus horikoshii* denominado Glt_{ph} , y cuya estructura tridimensional ha sido desvelada por E. Gouaux y sus colaboradores (29) (Figura 3). El transportador tiene una organización homo-oligométrica (trimérica) en donde la asociación de las tres subunidades genera un espacio en forma de cuenco relleno de solvente y que penetra parcialmente en la membrana. En el fondo de este cuenco se localizan tres poros independientes de permeación para el glutamato y los iones asociados, un poro por cada subunidad. Una subunidad está constituida por ocho hélices transmembrana más dos horquillas helicoidales (HP1 y HP2, Figura 3), horquillas que penetran parcialmente en la membrana y que actúan a manera de compuertas, una desde el exterior y otra desde el interior. Sería el movimiento concertado de estas dos horquillas el que permitiría el acceso alternante al medio extracelular y al intracelular, de forma que se posibilita así la unión y el paso de glutamato y de los iones sodio y potasio a través de la membrana.

Cada uno de los cinco transportadores de mamíferos tiene una localización específica en el sistema nervioso, lo que es un claro indicio de que desarrollan funciones diferenciales. Tanto GLAST como GLT1 están ampliamente extendidos por las diversas regiones del cerebro, aunque la concentración de GLT1 es mayor en la corteza y el hipocampo, mientras que la de GLAST lo es en el cerebelo (30). Ambas son mayoritariamente proteínas gliales, aunque recientemente se ha demostrado que GLT1 también se expresa en algunas subpoblaciones de neuronas de la corteza cerebral (31). EAAT3 también tiene una expresión bastante extendida pero circunscrita a las neuronas, observándose especialmente en elementos postsinápticos (32). Los otros transportadores tienen distribuciones más restringidas, con EAAT4 en las células de Purkinje del cerebelo (33), y EAAT5 en la retina, en donde se encuentra tanto en los fotorreceptores (conos y bastones) como en los axones de las células bipolares (34). Con la excepción de EAAT5, se han generado ratones mutantes carentes de cada uno de estos genes,

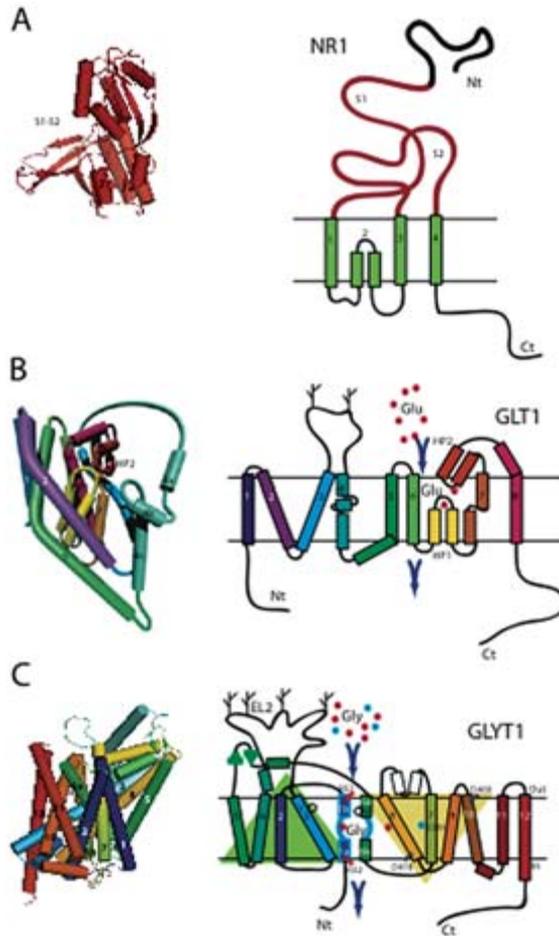


FIGURA 3. **Representación esquemática de las estructuras del receptor de NMDA y de los transportadores de glutamato y glicina.** A) Esquema de la estructura transmembrana de la subunidad NR1 del receptor de NMDA (panel izquierdo). La estructura tridimensional de los dominios extracelulares S1 y S2 ha sido resuelta mediante técnicas cristalográficas (panel derecho). B) Esquema de la estructura transmembrana del transportador de glutamato GLUT1 (panel izquierdo) en donde se indican los dominios transmembrana 1-8 y las horquillas reentrantes HP1 y HP2, que constituyen parte esencial del sitio de unión de glutamato y de los iones sodio. Esta estructura es hipotética y está basada en la estructura tridimensional del homólogo Glt (Ph) de la arqueobacteria *Pyrococcus horikoshii* (panel derecho). C) Esquema de la estructura transmembrana del transportador de glicina GLYT1 (panel izquierdo) en donde se indican los dominios transmembrana 1-12 con los principales residuos implicados en la translocación de glicina y de los iones sodio y cloruro, que se localizan principalmente en los segmentos transmembrana 1 y 6. La estructura pseudosimétrica de la molécula se remarca mediante los triángulos coloreados. Esta estructura es hipotética y está basada en la estructura tridimensional del transportador homólogo $LeuT_{Au}$ de la bacteria *Aquifex aeolicus* (panel derecho).

lo que ha permitido empezar a comprender las funciones específicas en las que está implicado cada transportador. De todos ellos, GLT1 representa la principal vía de terminación de la neurotransmisión glutamatérgica ya que da cuenta del 90% de la recaptura de glutamato en las regiones del cerebro anterior y, por tanto, juega un papel esencial en el control de la excitabilidad de las neuronas. Además de regular la transmisión de señales en las sinapsis, GLT1 mantiene los niveles de glutamato por debajo del umbral de toxicidad para las neuronas. Por ello, los ratones mutantes que carecían del gen GLT1 sufrían convulsiones epilépticas letales similares a las producidas por NMDA. Además, eran muy sensibles a lesiones corticales agudas y presentaban degeneración de las neuronas del hipocampo (35). De hecho, GLT1 se ha asociado al desarrollo o la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas humanas, como la esclerosis amiotrófica lateral (ALS), enfermedad en la que se observó una importante reducción de los niveles de este transportador, tanto en modelos animales como en pacientes (la forma humana se denomina EAAT2) (36). Por otra parte, los ratones deficientes en GLAST mostraban alteraciones en el desarrollo de las conexiones sinápticas establecidas por las fibras trepadoras en el cerebelo y, además, presentaban una elevada sensibilidad en el cerebelo a las lesiones excitotóxicas producidas tras una lesión aguda del mismo (37). También la eliminación de EAAT3 *in vivo* con oligonucleótidos antisentido generaba convulsiones epilépticas, mientras que la eliminación del gen por recombinación homóloga produjo neurodegeneración en los ratones (38, 39). Este último efecto fue atribuido a alteraciones en el metabolismo del glutatión, ya que EAAT3 no solo transporta glutamato sino también cisteína, necesaria para la síntesis de glutatión (39). La eliminación del gen EAAT4 afecta a las corrientes iónicas en las sinapsis entre las fibras trepadoras y las células de Purkinje (40) y produce un incremento en la actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato en estas sinapsis cerebelares (41). En resumen, estos trabajos revelan la importancia fisiológica de los transportadores de glutamato, y enfatizan la necesidad de conocer los mecanismos que regulan la expresión de sus respectivos genes y la actividad de la proteína con objeto de poder manipular farmacológicamente estos procesos. Aunque dichos mecanismos reguladores no están bien definidos, se han encontrado vías de señalización que afectan a la transcripción de los genes y otras que producen modificaciones posttraduccionales que modulan la actividad de los transportadores. Ejemplos de modificación de la transcripción los encontramos en GLT1 cuya expresión glial está sometida a regulación por factores proteicos liberados por las neuronas, un efecto que es mimetizado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), por PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) y por AMP cíclico. Estos tratamientos parecen actuar

sobre el promotor del gen y dependen de la fosfatidilinositol 3-quinasa y del factor de transcripción NF- κ B (42). De la misma manera, hay varios efectores que modulan la actividad de GLT1, como el ácido araquidónico, los radicales libres, las proteína quinasas A y C, las quinasas inducibles por suero y glucocorticoides (SGK1, SGK2, y SGK3) (43-45). Algunas de estas modificaciones actúan a través de cambios en el tráfico intracelular, bien hacia la membrana o desde la membrana, promoviendo la endocitosis y la degradación de la proteína (46, 47). También se conocen diversas proteínas que interactúan con los transportadores de glutamato determinando su ubicación precisa, como por ejemplo interacciones con proteínas con dominios PDZ. De hecho, todos los miembros de la familia SLC1, excepto una de las isoformas de GLT1 (GLT1a), presentan en sus extremos carboxilo el motivo peptídico necesario para interactuar con proteínas PDZ (48). Estas proteínas suelen actuar como andamiajes organizadores que ponen en contacto a las proteínas de la superficie celular con proteínas reguladoras intracelulares (26).

En cuanto a la relación de los transportadores de glutamato y la esquizofrenia, se ha observado que en el tálamo de pacientes esquizofrénicos hay una mayor expresión del mRNA para EAAT2 (y también para EAAT1), así como del mRNA y la inmunorreactividad en el córtex prefrontal de pacientes no tratados (49). Por otra parte, estudios clásicos habían puesto de manifiesto un efecto inhibitor del neuroléptico clorpromacina sobre el transporte de glutamato en tratamientos agudos. Además, el tratamiento con el fármaco antipsicótico clozapina produce una disminución de los niveles de EAAT2 en diferentes regiones del cerebro (50). También se han encontrado alteraciones en los niveles de mRNA para EAAT2 en individuos portadores de alelos del gen *GRM3* (receptor metabotrópico de glutamato-3) que predisponen a la esquizofrenia (51). Estos datos son compatibles con la idea de que una mayor actividad de los sistemas de transporte en los pacientes esquizofrénicos disminuye la disponibilidad de glutamato y por tanto la neurotransmisión glutamatérgica. No obstante, la relación puede ser más compleja, ya que también hay evidencias en sentido contrario: un ratón carente de GLAST, cuyos niveles de glutamato deberían estar incrementados, presenta comportamientos de tipo esquizoide, y que son prevenidos tanto por haloperidol como por antagonistas de los receptores de glutamato 2/3 (52). Este resultado, junto con otros en los que se ha observado una paradójica elevación de la actividad glutamatérgica en el cortex prefrontal tras el bloqueo de los NMDARs, podría interpretarse si dichos NMDARs estuvieran localizados en las interneuronas GABAérgicas. La pérdida de la inhibición GABAérgica incrementaría la liberación de glutamato.

REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE GLICINA EN LA SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS

Transportadores de glicina de alta afinidad

Las concentraciones de glicina en el SNC son reguladas principalmente por los miembros de la familia de transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio y de cloruro (familia SLC6), denominados GLYT1 y GLYT2, y que unen glicina con una alta afinidad (53). Probablemente otros transportadores de aminoácidos neutros, especialmente los de la familia SLC38, también podrían contribuir de manera significativa a los procesos de transporte de glicina, a pesar de tener una menor afinidad por la glicina que GLYT1 o GLYT2 (54).

GLYT1 y GLYT2 son dos glicoproteínas que comparten aproximadamente un 50% de identidad de secuencia y que se pueden distinguir farmacológicamente, ya que GLYT1 es inhibible por sarcosina (N-metilglicina) mientras que GLYT2 no lo es (55). Sobre esta base se generó una primera serie de compuestos derivados de la sarcosina que resultaron ser inhibidores específicos y de alta potencia para GLYT1, como el ya mencionado NFPS, el ORG24598, el NPTS, o el CP-802079. Posteriormente se han sintetizado otros inhibidores de GLYT1 no derivados de sarcosina como los Janssen WO19944596, Gliatech G-T6006, SKB WO2003055478, Glaxo 200505855478 o Merk WO2005046601, entre otros (56). También se han sintetizado inhibidores específicos de GLYT2, como ORG 25543, ALX 1393 o Janssen WO2005044810. La estructura de estas proteínas es todavía desconocida, al igual que lo es la de los otros transportadores de neurotransmisores de la misma familia, como son los de GABA (GAT1-3), los de aminas biógenas (DAT, NET y SERT) y otros (57). Sin embargo, recientemente E. Gouaux y colaboradores también han resuelto la estructura de un homólogo bacteriano (58). En concreto, la de un transportador de leucina del microorganismo *Aquifex aeolicus* denominado LeuT_{Aa}. Aunque la homología de secuencia de los miembros de SLC6 con LeuT_{Aa} es de aproximadamente de un 20-25%, esta es mayor en los dominios transmembrana y en los residuos que se presumen importantes para el proceso de translocación del aminoácido y los iones asociados (58) (Figura 3). De hecho, estos datos estructurales se están usando como referencia para el modelado de los transportadores eucarióticos y, consecuentemente, para el diseño de nuevos experimentos que aclaren las relaciones estructura-función en estas importantes proteínas. Brevemente, LeuT_{Aa} es una proteína homodimérica donde cada subunidad contiene 12 dominios transmembrana (TM). Los diez primeros contienen una repetición estructural interna, de forma que las mitades TM1-5 y TM6-10 se disponen simétricamente en torno

a un eje pseudobinario localizado en el plano de la membrana. Los residuos implicados en la unión del sustrato y de los iones asociados se localizan principalmente en la interfase entre estas dos mitades, en TM1 y TM6, que son alfa-hélices parcialmente desenrolladas en su zona central. Esta zona permanece ocluida por dos compuertas, una en la zona extracelular, constituida básicamente por un puente salino (Arg30/Asp404), y una en la cara citoplasmática, mantenida por otro par iónico (Arg5/Asp369). El modelo estructural predice que los sustratos y los iones se unen cuando la puerta externa está abierta y la interna cerrada. La unión de éstos promueve un cambio conformacional que cierra la puerta externa y abre la interna permitiendo la difusión del sustrato al citoplasma. La validez de esta estructura como base de la estructura de los transportadores eucarióticos se ha visto apoyada por experimentos como los que han permitido identificar los residuos de GLYT1 y GLYT2 responsables de la sensibilidad diferencial a sarcosina. En concreto está implicado un residuo del TM6 (Gly 305 de GLYT1 y su equivalente Ser481 de GLYT2) (59). Los datos de modelado por homología también revelan que el hueco en donde encaja la glicina es mucho más pequeño en GLYT1 o GLYT2 que en LeuT_{Aa} . Otros experimentos viene a corroborar la validez del modelo estructural son los que han permitido identificar los sitios de unión de los iones sodio y cloruro en diversos miembros de la familia SLC6 (60, 61).

GLYT1 y GLYT2 poseen una distribución en el SNC claramente diferencial, lo que es congruente con la función específica que desarrolla cada una de ellas. Ambas proteínas están enriquecidas en la médula espinal y el tallo cerebral, y aquí ambas participan en la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria, aunque con papeles diferenciados. Mientras que GLYT2 se expresa casi exclusivamente en los terminales presinápticos de la interneuronas que liberan glicina, GLYT1 lo hace en las células de glía que envuelven a estas sinapsis (62). Los datos obtenidos en ratones en los que se eliminaron selectivamente bien GLYT1 o bien GLYT2 indican que el primero es el encargado de retirar glicina de la hendidura sináptica hacia las células de glía, tras la liberación del neurotransmisor desde las neuronas presinápticas (63). La función de GLYT2, sin embargo, parece relacionada con el restablecimiento de los niveles de glicina en los terminales presinápticos, más que con la terminación de la neurotransmisión (64). Estos niveles de glicina en el citoplasma de los terminales son necesarios para que se vuelvan a rellenar las vesículas sinápticas a través de un transportador de baja afinidad que se localiza en dichas vesículas, y que se denomina VIAAT o GAT. Este transportador es compartido por glicina y GABA por lo que muchas terminales liberan ambos neurotransmisores inhibitorios (65). Aparte de su función en la neurotransmisión glicinérgica, GLYT1 también se expre-

sa en neuronas glutamatérgicas, concentrándose tanto en los terminales presinápticos como en las densidades postsinápticas (66). Como se ha mencionado más arriba, los datos farmacológicos apoyan que esta ubicación está relacionada con la neurotransmisión glutamatérgica. De hecho estos datos farmacológicos se han visto reforzados recientemente con el uso de animales genéticamente modificados. La función glutamatérgica no queda plenamente establecida hasta la segunda-tercera semana de vida en los ratones, por lo que no pudo estudiarse inicialmente en los ratones Glyt1^{-/-} por su muerte neonatal. Sin embargo, el ratón heterocigoto sí sobrevivió hasta la edad adulta, a pesar de poseer unos niveles de GLYT1 reducidos a la mitad. Estos ratones mostraron alteraciones en diversos tests farmacológicos, electrofisiológicos y de comportamiento compatibles con una disfunción del receptor de NMDA (67). De la misma manera, un ratón mutante condicional en el que GLYT1 se eliminó sólo en las neuronas del cerebro anterior mostraba alteraciones semejante al heterocigoto, y totalmente compatible con la saturación permanente en los mismos del sitio de unión de la glicina en el receptor de NMDA (68). Por otra parte, hay datos bioquímicos que apoyan la implicación de GLYT1 en la regulación de los receptores de NMDA ya que ambas proteínas coinmunoprecipitan, lo que indica una estrecha asociación física. Probablemente esta asociación se realiza a través de la proteínas andamiaje PSD-95, ya que tanto GLYT1 como algunas subunidades del receptor de NMDA interaccionan con los dominios PDZ de PSD-95 (69).

A pesar de que estos datos apoyan a GLYT1 como el principal regulador de la concentración de glicina en la vecindad de NMDAR, no se puede descartar que GLYT2 tenga también algún papel en las áreas en donde coexisten neuronas glicinérgicas y glutamatérgicas. De hecho se sabe que la glicina liberada desde estas neuronas puede alcanzar las sinapsis glutamatérgicas próximas por un proceso de difusión (*spill-over*), para lo que tendría que vencer de alguna manera la resistencia de los transportadores GLYT1 y GLYT2 interpuestos en el camino (70).

De la misma manera que para los transportadores de glutamato, los mecanismos reguladores de la expresión y actividad de estos transportadores no están bien definidos. Se conocen algunos factores de transcripción que afectan a la expresión de GLYT1, como los miembros de la familia HMGN3, que se expresan abundantemente en células de glía y en retina, en donde colocaliza con GLYT1 (71). Igualmente, el factor de transcripción Tsb-1 se une al menos *in vitro* al promotor del gen GLYT1 (72). En cuanto a efectores y vías de señalización que afecten a la actividad o al tráfico de GLYT1, esta proteína es inhibida

por ácido araquidónico, por zinc y por protones, efectores que también afectan a los receptores de NMDA, por lo que podrían intervenir en una regulación coordinada de ambas proteínas (73-75). Una de las vías de señalización que es activada, entre otros, por los receptores de NMDA, también afecta a GLYT1 a través de una modificación de su tráfico intracelular. La activación de PKC promueve la endocitosis de GLYT1, y esto podría incrementar los niveles de glicina en las sinapsis glutamatérgicas. Los procesos de tráfico GLYT1 también podrían ser afectados por proteínas que interactúan con este transportador, como las proteínas con dominios PDZ. Además, el transportador está sometido a procesos de tráfico asimétrico en células polarizadas que lo concentran en los sitios en donde es relevante desde un punto de vista funcional (76). De lo anteriormente expuesto se desprende que el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la llegada de GLYT1 a las sinapsis glutamatérgicas y su interacción con NMDAR (p. ej. tráfico intracelular, reciclaje en la superficie celular e inclusión en microdominios en los que reside NMDAR) pueden ser de gran interés en la comprensión de la regulación no sólo de GLYT1 sino también de NMDAR y, por tanto, de interés en el contexto de la esquizofrenia.

Todos los datos experimentales conocidos hasta el momento parecen indicar que la función de GLYT1 está estrechamente relacionada con la de NMDAR, por lo que no es sorprendente el que este transportador se haya convertido en una diana importante para el desarrollo de fármacos antiesquizofrénicos. La idea básica de estos estudios es la de incrementar la actividad del receptor de NMDA, disminuida en los pacientes esquizofrénicos, mediante el incremento de la concentración extracelular de glicina que ha de producirse tras la inhibición del transportador. De hecho, varios estudios preclínicos recientes con los inhibidores de GLYT1 NFPS y ORG 24598 apuntan en esa dirección (24). Además, un estudio clínico con el inhibidor de GLYT1 sarcosina ha revelado una mejora sustancial tanto de los síntomas positivos como de los negativos y cognitivos de los pacientes esquizofrénicos (77).

Papel de los transportadores de baja afinidad en la regulación de la concentración de glicina y en el ciclo glutamato-glutamina (Familia SLC38)

Estudios clásicos sobre transporte de aminoácidos sugieren la existencia de otros sistemas de transporte dependientes de Na^+ con capacidad para transportar glicina en las células nerviosas. Entre ellos se encuentra el denominado sistema A, un sistema de transporte con amplia especificidad de sustratos, ya que es capaz de transportar no sólo glicina sino también a otros aminoácidos como la alanina, la

glutamina, la prolina o la serina y al sustrato sintético ácido 2-metil amino isobutírico (MeAIB) (78). Este sistema de transporte podría jugar un papel importante en el aporte de glutamina a las neuronas como precursor de la síntesis de glutamato mediante el conocido como ciclo glutamato-glutamina entre células de glía y neuronas. En este ciclo la glutamina sintetizada en las células de glía a partir del glutamato recapturado por las mismas sería exportada al medio extracelular por otro sistema de transporte, denominado clásicamente sistema N, y finalmente la glutamina llegaría a las neuronas por la acción del sistema A (79). La naturaleza molecular de estos transportadores ha comenzado a resolverse recientemente con el clonaje de los miembros de una familia génica ahora denominada SLC38, y que incluye a transportadores tanto del sistema A como del sistema N. Cuatro de estos transportadores, denominados SNAT1, SNAT2, SNAT3 y SNAT5 (anteriormente denominados ATA1, ATA2, SN1 y SN2, respectivamente) están enriquecidos en sistema nervioso (78, 80). Dos de ellos (SNAT1 y SNAT2) corresponden al sistema A, mientras que los otros dos (SNAT3 y SNAT5) tienen las características del sistema N. Con respecto a la estructura de estos transportadores, poco se conoce. Los gráficos de hidrofobicidad predicen 11 segmentos transmembrana, con el extremo amino intracelular y el carboxilo extracelular. Puesto que poseen secuencias consenso de glicosilación, es probable que se trate de glicoproteínas aunque estos aspectos estructurales están por comprobar experimentalmente.

De estos transportadores, SNAT2 y SNAT5 son los que mayor afinidad presentan por glicina en ensayos *in vitro*, y por tanto podrían estar implicados en la regulación de los niveles extracelulares de este aminoácido, aparte del papel que pudieran tener en el transporte de glutamina. Los estudios de inmunohistoquímica indican que SNAT5 es una proteína glial altamente enriquecida en el entorno de las sinapsis glutamatérgicas, una localización compatible con la hipótesis de que SNAT5 participaría en el ciclo glutamato-glutamina mediante transferencia de la glutamina glial a las neuronas glutamatérgicas y/o con una función reguladora de los niveles de glicina en el entorno de la sinapsis glutamatérgica mediante eflujo de la misma desde las células gliales (81). En cuanto al otro transportador, SNAT2, localiza principalmente en las dendritas y axones de las neuronas glutamatérgicas (82). Además de esta localización neuronal, SNAT2 se encuentra en células de glía (especialmente en la glía limitans y pies chupadores de los astrocitos) y en el endotelio vascular, en donde podría contribuir al tráfico de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica (82). Es de destacar que, en tejidos diferentes al cerebro, SNAT2 está fuertemente regulado, tanto en la transcripción de su mRNA como en el tráfico intracelular de la proteína. Entre estos factores reguladores se encuentra la disponibilidad de sustratos, la osmolaridad del medio o las hormonas (insulina) (78).

Recientemente se ha establecido una importante conexión entre estos transportadores y la esquizofrenia, o más concretamente con el mecanismo de acción de un fármaco empleado en el tratamiento de los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad: la clozapina. La clozapina, además de su capacidad de unión a los receptores dopaminérgicos D2 y los de 5-HT2A, potencia la actividad de los receptores de NMDA. En este estudio se demostró que la clozapina inhibe específicamente el transporte de glicina a través del sistema A a concentraciones farmacológicas (12). Con anterioridad se había demostrado que la clozapina también inhibe a GLYT1, pero lo hace a concentraciones mayores de las farmacológicamente aceptables (83). El efecto sobre el sistema A explicaría el incremento en la actividad de NMDAR por el incremento en los niveles extracelulares de glicina (54). Sin embargo, los mecanismos moleculares de acción de esta droga sobre el sistema A no se han investigado. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares por los que actúan fármacos antipsicóticos como la clozapina sobre estos transportadores de baja afinidad podría ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas y al desarrollo de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través del Ministerio de Investigación Científica e Innovación (SAF2005-03185), la Comunidad Autónoma de Madrid (S2006/SAL-0253), y una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANDREASEN, N.C. (2000) Schizophrenia: fundamental questions. *Brain. Res. Rev.* 31: 106-112.
- (2) KARAYIORGOU, M. (2001) Genetic aspects of schizophrenia. *Clin. Neurosci. Res.* 1: 158-163.
- (3) CARLSSON, A. (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 1: 179-186.
- (4) JAVITT, D.C. (1987) Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J. Clin. Psychiatry.* 9: 12-35.
- (5) JAVITT, D.C. AND ZUKIN, S.R. (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry.* 148: 1301-1308.
- (6) JAVITT, D.C. (2007) Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int. Rev. Neurobiol.* 78: 69-108.

- (7) LINDSLEY, C.W.; SHIPE W.D.; WOLKENBERG, S.E.; THEBERGE, C.R.; WILLIAMS, D.L.; SUR C. AND KINNEY, G.G. (2006) Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr. Topics Med. Chem.* 6: 771-785.
- (8) WATIS, L.; CHEN, S.H.; CHUA, H.C.; CHONG, S.A. AND SIM, K. (2008) Glutamatergic abnormalities of the thalamus in schizophrenia: a systematic review. *J. Neural. Transm.* 115: 493-511.
- (9) MILLAN, M.J. (2005) N-methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacol.* 179: 30-53.
- (10) OLNEY, J.W.; NEWCOMER, J.W. AND FARBER, N.B. (1999) NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 33: 523-533.
- (11) MOGHADDAM, B. (2003) Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron.* 40: 881-884.
- (12) JAVITT, D.C. (2004) Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry.* 9: 984-997.
- (13) LECHNER, S.M. (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: inhibitors of glycine transport. *Curr. Op. Pharmacol.* 6: 75-81.
- (14) THOMSEN, C. (2006) Glycine transporter inhibitors as novel antipsychotics. *Drug Discovery: Therapeutic Strategies.* 3: 539-545.
- (15) SUR, C. AND KINNEY, G.G. (2007) Glycine transporter 1 inhibitors and modulation of NMDA receptor-mediated excitatory neurotransmission. *Curr. Drug Targ.* 8: 643-649.
- (16) MORI, H. AND MISHINA, M. (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology.* 34: 1219-1237.
- (17) DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D. AND TRAYNELIS, S.F. (1999) The glutamate receptors ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: 7-61.
- (18) ZUKIN, R.S. AND BENNET, M.V.L. (1995) Alternative spliced isoformas of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18: 306-313.
- (19) CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S. AND FARRANT, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 327-333.
- (20) WESTERGREN I.; NYSTROM, B.; HAMBERGER, A.; NORDBORG, C. AND JOHANSSON, B.B. (1994) Concentrations of amino acids in extracellular fluid after opening of the blood-brain barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate. *J. Neurochem.* 62:159-165.
- (21) BERGERON, R.; MEYER, T.M.; COYLE, J.T. AND GREEN R.W. (1998) Modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 15730-15734.

- (22) BERGER, A.J.; DIEUDONNE, S. AND ASCHER, P. (1998) Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *J. Neurophysiol.* 80: 3336-33340.
- (23) CHEN, L.; MUHLHAUSER, M. AND YANG, C.R. (2003) Glycine transporter 1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J. Neurophysiol.* 89: 691-703.
- (24) KINNEY, G.G.; SUR, C.; BURNO, M.; MALLORGA, P.J.; WILLIAMS, B.; FIGUEROA, D.J.; WITTMANN, M.; LEMAIRE, W. AND CONN, P.J. (2003) The glycine transporter type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine potentiates NMDA receptor-mediated responses in vivo and produces an antipsychotic profile in rodent behaviour. *J. Neurosci.* 23:7586-7591.
- (25) ZUKIN, R.S. AND LAU, C.G. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 413-426.
- (26) TOMITA, S.; NICOLL, R.A. AND BRETT, D.S. (2001) PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J. Cell. Biol.* 153: F19-24.
- (27) CEPEDA, C. AND LEVINE, M.S. (1998) Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev. Neurosci.* 20: 1-18.
- (28) KANAL, Y. AND HEDIGER, M.A. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447: 469-479.
- (29) YERNOOL, D.; BOUDKER, O.; JIN, Y. AND GOUAUX, E. (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature.* 431: 811-818.
- (30) LEHRE, K.P.; LEVY, L.M.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. AND DANBOLT, N.C. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15: 1835-1853.
- (31) CHEN, W.; MAHADOMRONGKUL, V.; BERGER, U.V.; BASSAN, M.; DESILVA, T.; TANAKA, K.; IRWIN, N.; AOKI, C. AND ROSENBERG, P.A. (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24: 1136-1148.
- (32) ROTHSTEIN, J.D.; MARTIN, L.; LEVEY, A.I.; DYKES-HOBERG, M.; JIN, L.; WU, D.; NASH, N. AND KUNCL, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron.* 13: 713-725.
- (33) FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J.D. AND MARTIN, L.J. (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17: 8363-8375.
- (34) WERSINGER, E.; SCHWAB, Y.; SAHEL, J. A.; RENDON, A.; POW, D.V.; PICAUD, S. AND ROUX, M.J. (2006) The glutamate transporter EAAT5 works as a presynaptic receptor in mouse rod bipolar cells. *J. Physiol.* 577: 221-234.

- (35) TANAKA, K.; WATASE, K.; MANABE, T.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, K.; IWAMA, H.; NISHIKAWA, T.; ICHIHARA, N.; KIKUCHI, T.; OKUYAMA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M. AND WADA, K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 276: 1699-1702.
- (36) BRISTOL, L.A. AND ROTHSTEIN, J.D. (1996) Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann. Neurol.* 39: 676-679.
- (37) WATASE, K.; HASHIMOTO, K.; KANO, M.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; INOUE, Y.; OKUYAMA, S.; SAKAGAWA, T.; OGAWA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M.; WADA, K. AND TANAKA, K. (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10: 976-988.
- (38) ROTHSTEIN, J.D.; DYKES-HOBERG, M.; PARDO, C.A.; BRISTOL, L.A.; JIN, L.; KUNCL, R.W.; KANAI, Y.; HEDIGER, M.A.; WANG, Y.; SCHIELKE, J.P. AND WELTY, D.F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 16: 675-686.
- (39) AOYAMA, K.; SUH, S.W.; HAMBY, A.M.; LIU, J.; CHAN, W.Y.; CHEN, Y. AND SWANSON, R.A. (2006) Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat. Neurosci.* 9: 119-26.
- (40) HUANG, Y.H.; DYKES-HOBERG, M.; TANAKA, K.; ROTHSTEIN, J.D. AND BERGLES, D.E. (2004) Climbing fibre activation of EAAT4 transporters and kainate receptors in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 24: 103-111.
- (41) NIKKUNI, O.; TAKAYASU, Y.; IINO, M.; TANAKA, K. AND OZAWA, S. (2007) Facilitated activation of metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells in glutamate transporter EAAT4-deficient mice. *Neurosci. Res.* 59: 296-303.
- (42) ROBINSON, M.B. (2006) Acute regulation of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on constitutive and regulated trafficking. *Handb. Exp. Pharmacol.* 175:251-275.
- (43) TROTT, D.; DANBOLT, N.C. AND VOLTERRA, A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 328-334.
- (44) KALANDADZE A.; WU Y. AND ROBINSON, M.B. (2002) Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J. Biol. Chem.* 277: 45741-45750.
- (45) BOEHMER, C.; PALMADA, M.; RAJAMANICKAM, J.; SCHNIEPP, R.; AMARA, S. AND LANG, F. (2006) Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J. Neurochem.* 97: 911-921.
- (46) SUSARLA, B.T. AND ROBINSON, M.B. (2008) Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochem. Int.* 52: 709-722.

- (47) GONZALEZ-GONZALEZ, I.M.; GARCIA-TARDON N.; GIMENEZ, C. AND ZAFRA, F. (2008) PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. *Glia* 56: 963-974.
- (48) GONZALEZ-GONZALEZ, I.M.; GARCIA-TARDON, N.; CUBELOS, B.; GIMENEZ, C. AND ZAFRA, F. (2008) The glutamate transporter GLT1b interacts with the scaffold protein PSD-95. *J. Neurochem.* 105: 1834-1848.
- (49) MATUTE, C.; MELONE, M.; VALLEJO-ILLARMENDI, A. AND CONTI, F. (2005) Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia.* 49: 451-455.
- (50) MELONE, M.; VITELLARO-ZUCCARELLO, L.; VALLEJO-ILLARRAMENDI, A.; PEREZ-SAMARTIN, A.; MATUTE, C.; COZZI, A.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; ROTHSTEIN, J.D. AND CONTI, F. (2001) The expression of glutamate transporter GLT-1 in the rat cerebral cortex is down-regulated by the antipsychotic drug clozapine. *Mol. Psychiatry.* 6: 380-386.
- (51) EGAN, M.F.; STRAUB, R.E.; GOLDBERG, T.E.; YAKUB, I.; CALLICOTT, J.H.; HARIRI, A.R.; MATTAY, V.S.; BERTOLINO, A.; HYDE, T.M.; SHANNON-WEICKERT, C.; AKIL, M.; CROOK, J.; VAKKALANKA, R.K.; BALKISSOON, R.; GIBBS, R.A.; KLEINMAN, J.E. AND WEINBERGER, D.R. (2004) Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 12604-12609.
- (52) HOMAYOUN, H. AND MOGHADDAM, B. (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 27: 11496-11500.
- (53) BETZ, H.; GOMEZA, J.; ARMSSEN, W.; SCHOLZE P. AND EULENBURG, V. (2006) Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 55-58.
- (54) JAVITT, D.C.; DUNCAN, L.; BALLA, A. AND SERSHEN, H. (2005) Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: implications for mechanisms of action. *Mol. Psychiatry.* 10: 275-287.
- (55) LIU Q.R.; LOPEZ-CORCUERA, B.; MANDIYAN, S.; NELSON, H. AND NELSON, N. (1993) Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J. Biol. Chem.* 268: 22802-22808.
- (56) LINDSLEY, C.W.; SHIPE, W.D.; WOLKENBERG, S.E.; THEBERGE, C.R.; WILLIAMS, D.L. JR.; SUR, C. AND KINNEY, G.G. (2006): Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 771-785.
- (57) CHEN, N.H.; REITH, M. E. AND QUICK, M.W. (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* 447: 519-531.

- (58) YAMASHITA, A.; SINGH, S.K.; KAWATE, T.; JIN, Y. AND GOUAUX, E. (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*. 437: 215-223.
- (59) VANDENBERG, R.J.; SHADDICK, K. AND JU, P. (2007) Molecular basis for substrate discrimination by glycine transporters. *J. Biol. Chem.* 282: 14447-14453.
- (60) ZOMOT, E.; BENDAHAN, A.; QUICK, M.; ZHAO, Y.; JAVITCH, J.A. AND KANNER, B.I. (2007) Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters. *Nature*. 449: 726-730.
- (61) FORREST, L.R.; TAVOULARI, S.; ZHANG, Y.W.; RUDNICK, G. AND HONIG, G B. (2007) Identification of a chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻-dependent transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 104: 12761-12766.
- (62) ZAFRA, F.; ARAGON, C.; OLIVARES, L.; DANBOLT, N.C.; GIMENEZ, C. AND STORM-MATHISEN, J. (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15: 3952-3969.
- (63) GOMEZA, J.; HULSMANN, S.; OHNO, K.; EULENBURG V.; SZOKE, K.; RICHTER, D. AND BETZ, H. (2003) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron*. 40: 785-796.
- (64) GOMEZA, J.; OHNO, K.; HULSMANN, S.; ARMSSEN, W.; EULENBURG V.; RICHTER, D.W.; LAUBE, B. AND BETZ, H. (2003) Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron*. 40: 797-806.
- (65) WOJCIK S.M.; KATSURABAYASHI, S.; GUILLEMIN, I.; FRIAUF, E.; ROSENMUND, C.; BROSE, N. AND RHEE, J.S. (2006) A shared vesicular carrier allows synaptic co-release of GABA and glycine. *Neuron*. 50: 575-587.
- (66) CUBELOS, B.; GIMENEZ, C. AND ZAFRA, F. (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb. Cortex*. 15: 448-459.
- (67) TSAI, G.; RALPH-WILLIAMS, R.J.; MARTINA, M.; BERGERSON, R.; BERGER-SWEENEY, J.; DUNHAM, K.S.; JIANG, Z.; CAINE, S.B. AND COYLE, J.T. (2004) Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 8485-8490.
- (68) YEE, B.K.; BALIC, E.; SINGER, P.; SCHWERDEL, C.; GRAMPP, T.; GABERNET, L.; KNUESSEL, I.; BENKE, D.; FELDON, J.; MOHLER, H. AND BOISON, N D. (2006) Disruption of glycine transporter 1 restricted to forebrain neurons is associated with a procognitive and antipsychotic phenotypic profile. *J. Neurosci.* 26: 3169-3181.
- (69) CUBELOS, B.; GONZALEZ-GONZALEZ, I.M.; GIMENEZ, C. AND ZAFRA, F. (2005) The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization. *J. Neurochem.* 95: 1047-1058.

- (70) AHMADI, S.; MUTH-SELBACH, U.; LAUTERBACH, A.; LIPFERT, P.; NEUHUBER, W.L. AND ZEILHOFER, H.U. (2003) Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science*. 300: 2094-2097.
- (71) WEST, K.L.; CASTELLINI, M.A.; DUNCAN, M.K. AND BUSTIN, M. (2004) Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol. Cell. Biol.* 24: 3747-3756.
- (72) WANG, T. F.; DING, C. N.; WANG, G. S.; LUO, S. C.; LIN, Y. L.; RUAN, Y.; HEVNER, R.; RUBENSTEIN, J.L. AND HSUEH, Y.P. (2004) Identification of Tbr-1/CASK complex target genes in neurons. *J. Neurochem.* 91: 1483-1492.
- (73) PEARLMAN, R.J.; AUBREY, K.R. AND VANDENBERG R.J. (2003) Arachidonic acid and anandamide have opposite modulatory actions at the glycine transporter, GLYT1a. *J. Neurochem.* 84: 592-601.
- (74) JU, P.; AUBREY, K.R. AND VANDENBERG, R.J. (2004) Zn²⁺ inhibits glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *J. Biol. Chem.* 279: 22983-22991.
- (75) AUBREY, K.R.; MITROVIC, A.D. AND VANDENBERG, R.J. (2000) Molecular basis for proton regulation of glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *Mol. Pharmacol.* 58: 129-135.
- (76) POYATOS, I.; RUBERTI, F.; MARTINEZ-MAZA, R.; GIMENEZ, C.; DOTTI, C.G. AND ZAFRA, F. (2000) Polarized distribution of glycine transporter isoforms in epithelial and neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 15: 99-111.
- (77) TSAI, G.; LANE, H.Y.; YANG, P.; CHONG, M.Y. AND LANGE, N. (2004) Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 55: 452-456.
- (78) MACKENZIE, B. AND ERICKSON, J.D. (2004) Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch.* 447: 784-795.
- (79) BROER, S. AND BROOKES, N. (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 77: 705-719.
- (80) CHAUDHRY, F.A.; SCHMITZ, D.; REIMER, R.J.; LARSSON, P.; GRAY, A.T.; NICOLL, R.; KAVANAUGH, M. AND EDWARDS, R.H. (2002) Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J. Neurosci.* 22: 62-72.
- (81) CUBELOS, B.; GONZALEZ-GONZALEZ, I.M.; GIMENEZ, C. AND ZAFRA, F. (2005) Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia.* 49: 230-244.
- (82) GONZALEZ-GONZALEZ, I.M.; CUBELOS, B.; GIMENEZ, C. AND ZAFRA, F. (2005) Immunohistochemical localization of the amino acid transporter SNAT2 in the rat brain. *Neuroscience.* 130: 61-73.

- (83) WILLIAMS, J.B.; MALLORGA, P.J.; JEFFREY CONN, P.; PETTIBONE, D.J. AND SUR, C. (2004) Effects of typical and atypical antipsychotics on human glycine transporters. *Schizophr. Res.* 71: 103-112.