

5. Fisiopatología de la neurotransmisión glicinérgica

CARMEN ARAGÓN RUEDA
Y
BEATRIZ LÓPEZ-CORCUERA

RESUMEN

El neurotransmisor glicina tiene un papel doble en el sistema nervioso central (SNC), como inhibidor en vías glicinérgicas y como activador del receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) en vías glutamatérgicas excitadoras. La señal inhibitora es transmitida a través del receptor ionotrópico de glicina sensible a estricnina (GlyR), que actúa como un canal de Cl⁻ hiperpolarizando la membrana postsináptica. La terminación de la neurotransmisión es llevada a cabo por la captura de la glicina a través de transportadores específicos dependientes de Na⁺ y Cl⁻, GLYT1 y GLYT2, localizados en la membrana plasmática de las terminales nerviosas y astrocitos próximos a la sinapsis. La generación de ratones deficientes en los genes de estos transportadores y el desarrollo de inhibidores específicos ha permitido establecer el papel que desempeñan *in vivo*. Los fenotipos de estos animales son homólogos a los síntomas de enfermedades humanas caracterizadas por alteraciones en la neurotransmisión glicinérgica. La hiperplexia hereditaria es una enfermedad neurológica producida por mutaciones en los genes de las subunidades α y β del receptor de glicina y proteínas asociadas. Estudios genéticos recientes han identificado mutaciones en el gen del transportador de glicina GLYT2 en pacientes de hiperplexia. La reciente resolución de la estructura tridimensional de un transportador bacteriano homólogo ha permitido avanzar en el conocimiento del mecanismo funcional de estas proteínas. Parece probable, y resulta esperanzador, que los recientes avances permitan desarrollar compuestos que actúen selectivamente sobre GLYT1 y GLYT2 interfiriendo con la neurotransmisión glicinérgica o glutamatérgica y tengan aplicaciones terapéuticas como antipsicóticos, antiepilépticos o analgésicos.

Palabras clave: Glicina. Sinapsis. Receptores. Transportadores. Hiperplexia.

ABSTRACT

Physiopathology of inhibitory glycinergic neurotransmission

Glycine neurotransmitter has a dual role in the central nervous system, as inhibitor in the glycinergic pathways and as a co-agonist at the excitatory NMDA glutamate receptor. Inhibitory signal is transmitted by activation of the strychnine-sensitive glycine receptor that increases the chloride conductance of the postsynaptic membrane. The synaptic glycine concentration is mainly controlled by two Na⁺ and Cl⁻-dependent transporters, GLYT1 and GLYT2 present at the plasma membrane of nerve terminals and glia. Our understanding of the physiological role of these transporters has recently been enlightened thanks to the development of specific inhibitors, and to the generation of mice defective in the corresponding genes. The symptoms observed in glycine transporter deficient mice are similar to those associated with human hereditary diseases that perturb the glycinergic neurotransmission. Hyperekplexia or startle disease is a mammalian neurological syndrome caused by mutations in genes for several postsynaptic proteins involved in glycinergic transmission as the glycine receptor $\alpha 1$ and β subunits, and related proteins. Recently, mutations in the gene encoding the presynaptic glycine transporter GLYT2 have been identified though genetic analysis of human patients of this disorder. In addition, the three-dimensional resolution of the structure of a bacterial homologue has shed light on the mechanisms of glycine transport. It looks hopeful that this knowledge will prove to be useful for the development of selective drugs for GLYT1 and GLYT2 with antipsychotic, antiepileptic or analgesic applications.

Keywords: Glycine. Synapsis. Receptors. Transporters. Hyperekplexia.

INTRODUCCIÓN

La glicina, el aminoácido proteinogénico más pequeño, desempeña numerosas funciones metabólicas importantes especialmente en el SNC de los mamíferos. Representa, junto con el GABA, uno de los dos transmisores inhibi-

Abreviaturas: AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; GABA, ácido gamma-aminobutírico; GCS, sistema de ruptura de glicina; GlyR, receptor de glicina; GLYT, transportador de glicina; HMGN3, grupo N3 de alta movilidad; IPSCs, corrientes postsinápticas espontáneas inhibitorias; NMDA, N-metil-D-aspartato; NSS, neurotransmitter sodium symporter; PSD95, densidad postsináptica 95; SLC6, solute carrier 6; SNARE, receptor de proteínas de anclaje del factor soluble sensible a N-etilmaleimida; SNC, sistema nervioso central; TM, membrana.

dores de la neurotransmisión rápida. La glicina es especialmente abundante en zonas caudales del SNC, como el tallo cerebral, la zona pontinocerebelosa y la médula espinal. En el tallo cerebral y la médula espinal, las interneuronas glicinérgicas controlan la generación de ritmos motores, la coordinación de respuestas reflejas espinales y el procesamiento de señales sensoriales y nociceptivas. Las interneuronas espinales glicinérgicas del tipo Ia median circuitos reflejos de inhibición recíproca, permitiendo de esta forma la relajación de músculos antagonistas y la contracción coordinada de músculos agonistas, mientras que las interneuronas de Renshaw regulan la excitabilidad de motoneuronas mediante la producción de señales inhibitorias recurrentes a través de un sistema de retroalimentación negativa (1). Por otra parte, la glicina es un importante neurotransmisor implicado en el procesamiento de la información auditiva en los núcleos cocleares, en el complejo de la oliva superior y en el colículo inferior donde interviene en la modulación de diversos circuitos neuronales (2). Un importante aspecto de las acciones de la glicina se refiere al procesamiento de la información visual: hay neuronas glicinérgicas inhibitorias involucradas en la modulación de los campos receptivos en la retina (3). Asimismo, la glicina está implicada en la supresión de las señales nociceptivas en la médula espinal (4). Un segundo papel de la glicina en el SNC, adicional al de neurotransmisor inhibitorio, es el de neuromodulador en vías glutamatérgicas excitadoras que utilizan el receptor de glutamato tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) del que la glicina es un activador necesario tanto para la unión del glutamato como para el reciclado del receptor en la membrana plasmática (5).

En una neurona glicinérgica inhibitoria (Figura 1), la despolarización producida por la llegada de un potencial de acción al terminal provoca la liberación de la glicina contenida en vesículas sinápticas mediante exocitosis dependiente de calcio (exocitosis regulada). Tras su liberación en el espacio sináptico, la glicina interacciona y activa receptores postsinápticos específicos (GlyRs) que pertenecen, al igual que los receptores de GABA_{A/C}, a la superfamilia de receptores pentaméricos cuyo paradigma es el receptor nicotínico de acetilcolina (6). La activación de GlyR determina la apertura de un canal en la proteína que provoca flujo de cloruro al citoplasma de la neurona postsináptica. La hiperpolarización resultante estabiliza el potencial de membrana alrededor del valor de reposo, alejándolo del de activación y, por lo tanto, inhibe a la neurona postsináptica (7). La acción neurotransmisora de la glicina finaliza cuando su concentración en la sinapsis disminuye y se recuperan los niveles anteriores a la estimulación. Los transportadores específicos (GLYTs) localizados en la membrana plasmática de las neuronas o de las células de glía adyacentes llevan a cabo esta fase final de la neurotransmisión al transportar glicina activamente ha-

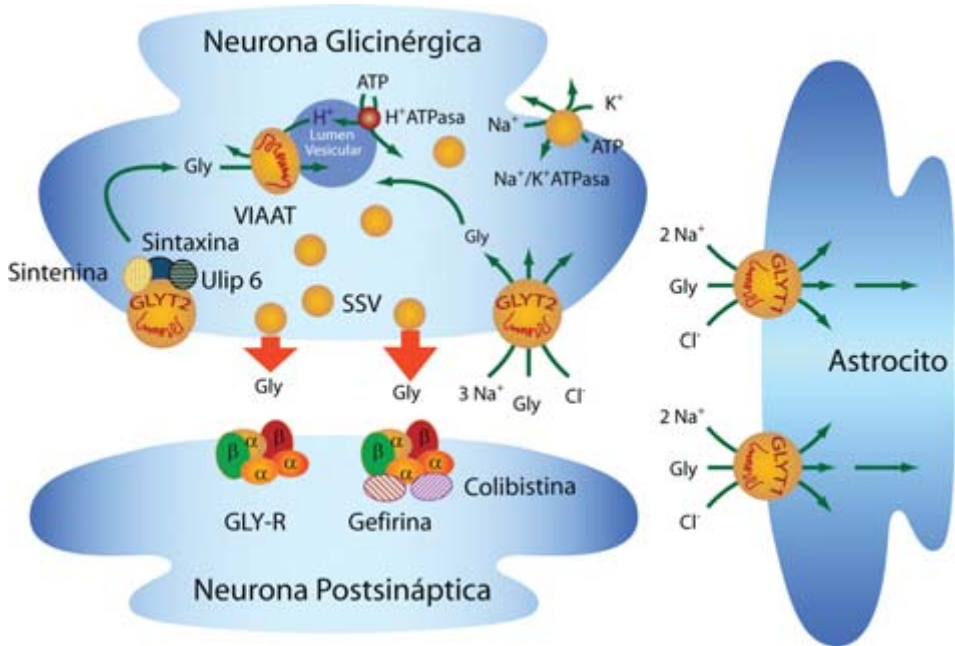


FIGURA 1. **Esquema de la sinapsis glicinérgica inhibitoria.** Se indican los siguientes elementos presinápticos: el transportador de glicina GLYT2 acoplado a $3Na^+$ y $1Cl^-$ y las proteínas asociadas sintenina, Ulip-6 y sintaxina1A; el transportador de glicina y GABA de vesículas sinápticas, VIAAT, y las bombas iónicas $H^+ATPasa$ de vesículas sinápticas (SSV) y $Na^+K^+ATPasa$ de membrana plasmática. GLYT1 es el transportador glial de glicina. En el elemento postsináptico se indican los receptores pentaméricos de glicina GlyR y las proteínas asociadas gefirina y colibistina.

cia el interior celular. El ciclo iniciado por la despolarización neuronal se completa con el relleno de las vesículas sinápticas con la glicina presente en el citoplasma de la terminal nerviosa, función que lleva a cabo el transportador vesicular, VIAAT/VGAT (8, 9). La glicina y el GABA comparten el mismo transportador vesicular, lo que permite que algunos terminales inhibitorios (mixtos) almacenen conjuntamente ambos neurotransmisores en las mismas vesículas desde donde serán liberados simultáneamente (10).

Los niveles de glicina en las células nerviosas son el resultado de la contribución relativa de la acumulación mediada por los transportadores, de su síntesis *de novo* y de su degradación. El metabolismo de la glicina en el SNC es considerablemente activo e implica dos rutas mitocondriales dependientes de piridoxal-5-fosfato. La síntesis *de novo* se produce gracias a la actividad catalí-

tica de la enzima «serina hidroximetiltransferasa o serina hidroximetilasa» que retira un fragmento hidroximetilo de la serina para generar glicina utilizando como aceptor el tetrahidrofolato. La degradación intracelular de la glicina es llevada a cabo por el llamado «sistema de degradación de glicina o descarboxilasa de glicina», (GCS), complejo multienzimático formado por cuatro actividades enzimáticas presentes en cuatro proteínas diferentes, la proteína P (una descarboxilasa dependiente de piridoxal-5-fosfato), la proteína H (una proteína de transferencia de hidrógeno que contiene lipoamida), la proteína T (una transferasa del grupo aminometilo dependiente de tetrahidrofolato) y la proteína L (una deshidrogenada dependiente de NAD⁺, que requiere FAD). El complejo está asociado a la membrana interna mitocondrial y, en el SNC, se localiza principalmente en las mitocondrias de los astrocitos. El sustrato de este complejo de degradación es la glicina incorporada al interior celular mediante transporte desde el exterior celular (11).

RECEPTOR DE GLICINA

La unión de la glicina a su receptor tipo GlyR genera corrientes producidas por la entrada de iones cloruro en la neurona postsináptica. Las corrientes sinápticas glicinérgicas median respuestas rápidas inhibitorias que siguen un perfil de tiempo complejo. Típicamente comienzan con una primera fase de respuesta postsináptica rápida debida a la apertura inminente y sincrónica de múltiples canales de cloruro por la unión de la glicina sináptica, seguida de una caída lenta y bifásica que corresponde a la inactivación y cierre asincrónico de los canales individuales y la retirada de glicina del espacio intersináptico a través de los transportadores (12, 13). Diversas evidencias han indicado que, en las sinapsis centrales, la retirada del neurotransmisor libre es muy rápida, más que la activación de los receptores, por lo que la unión de la glicina de nuevo al receptor no contribuye a la inhibición mantenida en una misma ronda de señalización (1).

Se puede decir que el receptor de glicina se encuentra entre los mejor conocidos hasta el momento gracias a numerosos estudios bioquímicos, electrofisiológicos, farmacológicos, inmunológicos, genéticos y de biología molecular (14,15). Una parte importante del éxito en el estudio de este receptor se debe a que su unión a la glicina es impedida por el alcaloide convulsivante estriquina, que se extrae del árbol *Strychnos nux vomica*, originario de la India. La estriquina es el antagonista más clásico del receptor y se une a él con gran afinidad reconociendo un epítipo casi solapante, aunque no coincidente, con el sitio de

unión de la glicina. Su disponibilidad constituye una valiosa herramienta experimental, aunque actualmente existen antagonistas derivados del ácido quinolínico de más reciente desarrollo (16).

Los GlyR tienen estructura pentamérica y están compuestos por dos tipos de subunidades, las α , funcionales, y las β , estructurales. La estequiometría establecida es de $3\alpha:2\beta$, aunque hay datos recientes que sugieren que la proporción de subunidades puede ser $2\alpha:3\beta$. Hasta el momento, se han identificado cuatro genes diferentes en vertebrados (denominados *Gla* 1-4) que codifican las cuatro subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) que muestran entre sí una elevada identidad de secuencia (más del 80%). Sin embargo, sólo se ha identificado un gen (*Glr β*) que codifica la subunidad β , de menor homología con las α (un 50% con $\alpha 1$). Se han descrito variantes α y β por procesamiento alternativo de sus mRNAs. Los diferentes genes tienen patrones de expresión temporal y regional muy definidos. Unida fuertemente a la subunidad β se encuentra la proteína gefirina cuya función es anclar el receptor al citoesqueleto subcortical a través de su unión a tubulina. La gefirina tiene un papel aglutinador de las moléculas de receptor en la membrana plasmática y se asocia también al receptor de GABA_A (16). Otras proteínas como colibistina, profilina, y RAFT1 también participan en el complejo andamiaje asociado con el GlyR (1). Cada una de las subunidades del GlyR está constituida por una cadena polipeptídica con cuatro dominios transmembrana con los extremos amino y carboxilo situados en la parte extracelular a modo de antenas. Se conocen con detalle los residuos de aminoácido involucrados en la unión a los ligandos glicina y estricnina que están situados en la región que precede al segmento M1 de las subunidades α . También se conocen los aminoácidos implicados en la interacción con subunidades adyacentes y la unión a un gran número de sustancias de interés como β -aminoácidos (taurina, β -alanina), anestésicos, alcoholes, esteroides, Zn²⁺, etc. En el bucle citoplásmico que une los segmentos M3 y M4 hay seis residuos cargados positivamente necesarios para la correcta topología de la subunidad $\alpha 1$. En el dominio M2 de las subunidades α , residen los determinantes moleculares responsables de la estricta especificidad aniónica del canal, (dos residuos de arginina), cuyo tamaño de poro es de 5.2 Å y que, al igual que los receptores GABA_{A/C}, presenta un orden de selectividad $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ siendo además bastante permeables a CO₃H⁻ (13).

Las sinapsis glicinérgicas son funcionalmente heterogéneas. El mayor determinante de esta variabilidad es la diversidad de subtipos de GlyR generados por diferentes combinaciones de subunidades, aunque esto también depende de

otros factores como morfología de la hendidura sináptica, nivel de agregación de receptores, localización, ... Los estudios *in vitro* de expresión heteróloga han demostrado que la composición de subunidades del receptor tiene una importante repercusión en propiedades funcionales y farmacológicas como la conductancia del canal, la cinética de activación y la sensibilidad a bloqueantes y moduladores (16). No obstante, el papel fisiológico de los distintos tipos de receptores no ha sido definitivamente establecido y constituye un área de intensa investigación. La subunidad β se expresa abundantemente en el SNC embrionario y postnatal. Los GlyRs que contienen la subunidad $\alpha 1$ son los más abundantes y se expresan ampliamente en médula espinal en estadio embrionario, postnatal y adulto, y además en tallo cerebral, colículos y retina de neonato y adulto. De hecho, la expresión del mRNA de la subunidad $\alpha 1$ solapa con el marcaje de [^3H] estriquina, lo que es coherente con un papel primordial en el control de la coordinación de las respuestas reflejas espinales del receptor con protámeros $\alpha 1$ y β . De las subunidades minoritarias $\alpha 3$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$, sólo está presente en médula espinal de adulto la $\alpha 3$, aunque en niveles moderados, así como en cerebelo y bulbo olfativo. La $\alpha 2$ se expresa abundantemente en la médula espinal en el estado embrionario y postnatal, pero no en adulto, en el que hay bajos niveles en hipocampo, corteza cerebral, tálamo y retina. La completa distribución de la $\alpha 4$ permanece elusiva debido a su escasez. Recientemente, se ha descrito que los GlyR con subunidades $\alpha 3$ están implicados selectivamente en la supresión nociceptiva espinal y pueden ser un blanco terapéutico en el tratamiento del dolor. Los GlyR $\alpha 3$ localizados en las dendritas de interneuronas de la sustancia gelatinosa donde las fibras aferentes nociceptivas hacen contacto sináptico, se activan reduciendo la generación de espigas y por tanto la señal nociceptiva. Durante la inflamación esta supresión se relaja por acción de la prostaglandina E que modula negativamente al receptor, generando hipersensibilidad a estímulos mecánicos y térmicos (4, 13). Sin embargo, en la retina de mamíferos donde la distribución de GlyR es muy amplia y la transmisión glicinérgica desempeña un papel crucial en el procesamiento de las señales luminosas (17), las diferencias en la composición de GlyRs se han asociado a un papel fisiológico concreto. Las diferentes subunidades α del receptor se distribuyen selectivamente en los distintos tipos neuronales de la retina (bipolares $\alpha 1$, ganglionares $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, amacrinas $\alpha 2$) y, puesto que presentan distintas velocidades de respuesta, determinan diferencias temporales que condicionan el orden en que las señales visuales llegan a los centros cerebrales superiores, permitiendo su interpretación (18, 19).

Al igual que otros receptores, los GlyRs se localizan preferentemente en las densidades postsinápticas y en menor medida en la membrana extrasináptica.

Aunque la neurotransmisión tiene lugar mayoritariamente en la sinapsis, los receptores localizados en la región extrasináptica pueden activarse por el neurotransmisor liberado de forma no vesicular o por el que accede por difusión procedente de las sinapsis adyacentes. Así, la activación de los GlyRs sinápticos por altas concentraciones de glicina liberada por exocitosis en la sinapsis provocará una inhibición «fásica» y la activación persistente de los receptores por niveles bajos de glicina en la zona extrasináptica provocará una inhibición mantenida «tónica» de los GlyRs. Parece que la inhibición tónica está mediada por GlyRs que difieren en composición molecular y propiedades de respuesta respecto a los sinápticos. Así, muchos moduladores tienen efectos diferenciales en receptores sinápticos o extrasinápticos. La estructura y papel de los GlyRs extrasinápticos en la mediación de procesos de importancia fisiológica, como el desarrollo, es objeto actual de estudio.

TRANSPORTADORES DE GLICINA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Distribución y función

La glicina liberada al espacio sináptico es retirada por transportadores específicos localizados en la membrana plasmática de las neuronas o de las células de glía adyacentes. Transportan glicina con alta afinidad (K_m de orden μM) por un mecanismo activo, electrogénico, acoplado al gradiente electroquímico de Na^+ y dependiente de Cl^- . La Na^+-K^+ -ATPasa genera y mantiene el gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática, lo que proporciona la energía necesaria para el transporte del neurotransmisor desde el espacio sináptico hacia el interior de los terminales nerviosos en contra de un gradiente de concentración de varios órdenes de magnitud. Existen dos variantes de transportadores de alta afinidad en el SNC de mamíferos llamados GLYT1 y GLYT2 producidos por genes diferentes (*Slc6a9* y *Slc6a5*) de los cuales, a su vez, existen varias isoformas generadas mediante procesamiento alternativo de los mensajeros, o por el uso de diferentes promotores (20). GLYT1 y GLYT2 son miembros de la familia de transportadores SLC6 o NSS que incluye a los transportadores de los neurotransmisores noradrenalina, dopamina, serotonina y GABA, así como a transportadores de sustancias no neurotransmisoras (osmolitos o aminoácidos). Se han identificado, además, homólogos «huérfanos» de los que se desconoce el sustrato, y algunos ortólogos bacterianos. Los transportadores de neurotransmisores de esta familia requieren el transporte de Cl^-

junto al Na^+ y el neurotransmisor, pero este requerimiento no es extensivo a los miembros procariotas.

GLYT1 y GLYT2 son proteínas homólogas que ostentan alrededor del 50% de identidad de secuencia. Sin embargo, desempeñan papeles complementarios en la neurotransmisión glicinérgica debido a que presentan relevantes diferencias en su función y distribución tanto regional como celular (20-22). GLYT2 reside principalmente en áreas caudales del SNC como la médula espinal, tallo cerebral y cerebelo donde se halla exclusivamente localizado en los axones y terminales de neuronas glicinérgicas. GLYT1 tiene una distribución más rostral y se concentra en los astrocitos que circundan y envuelven tanto las sinapsis glicinérgicas como las glutamatérgicas, encontrándose, además, en tejidos periféricos como el páncreas y el hígado (23-25).

Los estudios de silenciamiento génico han demostrado que GLYT1 y GLYT2 ejercen papeles complementarios en la transmisión inhibitoria mediada por glicina. GLYT1 es el principal responsable de la terminación de la señal y del mantenimiento de bajos niveles de glicina en las sinápsis, mientras que GLYT2 aumenta la eficacia de la neurotransmisión manteniendo el suministro de glicina al interior del terminal, lo que permite el relleno de las vesículas sinápticas por el transportador vesicular que tiene baja afinidad por el neurotransmisor (K_m del orden mM, (21, 26, 27)). Aunque la localización mayoritaria de GLYT1 es glial, recientemente se ha detectado su presencia en neuronas glutamatérgicas donde se asocia a receptores de glutamato del tipo NMDA (28, 29). Esta distribución resulta idónea para que, mediante regulación de las concentraciones sinápticas de glicina, GLYT1 neuronal ejerza el control de la glicina que se une al receptor NMDA, en tanto que, GLYT1 glial y, en menor medida GLYT2 en el caso de sinapsis inhibitorias, colaboran en el mantenimiento de niveles extracelulares submicromolares de glicina.

Los papeles fisiológicos diferenciales de las dos isoformas GLYT1 y GLYT2 se basan en propiedades termodinámicas únicas (Figura 2). GLYT1 cataliza el cotransporte de sodio/cloruro/glicina con una estequiometría de 2:1:1, mientras que GLYT2 transporta un ion sodio adicional, mostrando una estequiometría de 3:1:1 (30, 31). De este modo, se asegura el transporte vectorial de glicina hacia el terminal ya que la fuerza motriz para el transporte en contra de gradiente de concentración del sustrato es dos órdenes de magnitud mayor en el caso de GLYT2 que en el de GLYT1. Esta característica conlleva que la isoforma neuronal tenga una severa limitación para llevar a cabo el transporte reverso, mientras que GLYT1 puede responder a las necesidades fisiológicas importando o exportando glicina, dependiendo del entorno químico (32).

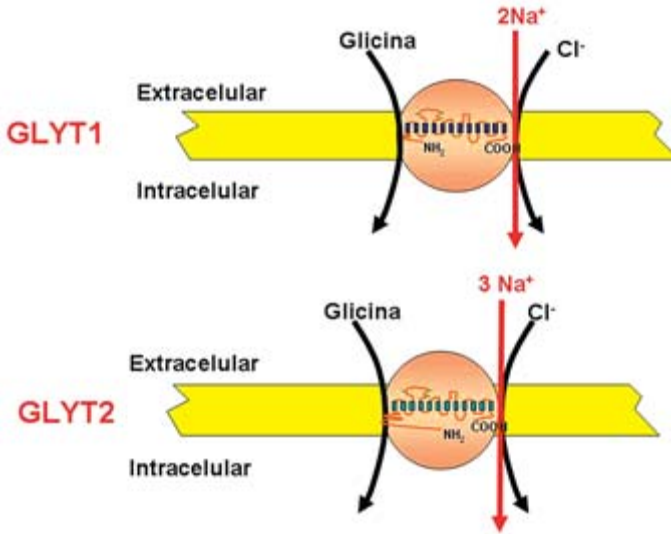


FIGURA 2. *Diferente estequiometría respecto a los iones sodio de los transportadores de glicina.* GLYT1 y GLYT2 transportan glicina por un mecanismo de simporte con Na⁺ y Cl⁻. GLYT2 presenta un mayor acoplamiento al gradiente electroquímico de sodio que GLYT1 debido a que cotransporta 3Na⁺ por molécula de glicina y ciclo de translocación, mientras que GLYT1 sólo requiere 2Na⁺.

Relación entre la estructura y la función

Como el resto de transportadores de la familia SLC6/NSS, GLYT1 y GLYT2 son proteínas politópicas con 12 dominios transmembrana (TM) y extremos amino y carboxilo localizados en el interior celular. El segundo bucle extracelular de los GLYT_s contiene cuatro residuos de asparragina unidos a cadenas de oligosacárido (33, 34). La estructura tridimensional de estos transportadores ha sido revelada por homología con una proteína homóloga bacteriana, el transportador de leucina de *Aquifex aeolicus* (LeuT_{Aa}), cuya estructura cristalina ha sido establecida a una resolución de 1.65 Å (35). Esta elevada resolución, infrecuente entre las proteínas de membrana, ha proporcionado numerosas claves para desentrañar las bases estructurales del funcionamiento de los transportadores de la familia SLC6/NSS. Aunque el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de LeuT_{Aa} en relación con sus homólogos de eucariotas es escasa (20-25%), sin embargo aumenta considerablemente en las secuencias de las hélices α TM donde residen los sitios de unión a sustratos e iones. La secuencia de las regiones más hidrofílicas, extremos amino y carboxilo terminales así como los

bucles extra e intracelulares que conectan los segmentos TM, son las de menor nivel de conservación.

El plegamiento de LeuT_{Aa} constituye una estructura novedosa, no conocida hasta la fecha, aunque con posterioridad se han publicado plegamientos estructuralmente homólogos en dos familias de transportadores no relacionados con los SLC6/NSS, lo que sugiere que representa un patrón estructural más general (36, 37). Las primeras diez hélices α TM constituyen el núcleo de la proteína en el que se reconocen dos mitades que contienen dos elementos estructurales repetitivos con topología invertida (TM1-5 y TM6-10) que pueden superponerse por rotación de uno de ellos respecto al plano de la membrana. La interfase entre estas dos repeticiones o mitades contiene el sitio de unión al sustrato y dos iones sodio (Na1 y Na2). El bolsillo de unión está formado por residuos de los TM1 y TM6 que, dispuestos de modo antiparalelo, tienen interrumpida la estructura α -helicoidal en su porción central, así como residuos de los TM3, TM7 y TM8. El grupo carboxilo del sustrato está en contacto directo con el ión sodio en Na1, lo que proporciona una base estructural muy adecuada para explicar el acoplamiento iónico del movimiento del sustrato durante el cotransporte. Dos residuos aromáticos (Tyr108 y Phe253) estabilizan un par iónico entre los residuos Arg30-Asp404, que actúa a modo de compuerta externa y, en el lado citoplasmático, el par Arg5-Asp369 forman la compuerta interna. En la estructura cristalizada, ambas compuertas aparecen cerradas. Algunos de los residuos que forman el bolsillo de unión de LeuT_{Aa} se habían identificado en estudios funcionales previos con mutantes de neurotransportadores, lo que demuestra que la estructura es relevante para otros miembros de la familia SLC6/NSS. Tal es el caso de la Tyr108 del TM3, conservada en toda la familia, cuyo grupo hidroxilo interacciona con el carboxilo de la leucina y cuya implicación en la unión del sustrato y actividad de transporte había sido descrita para los transportadores GAT-1, SERT y GLYT2 (38-40). Los determinantes de la especificidad de sustrato parecen residir en las cadenas laterales de los residuos de TM3, TM6 y TM8 que rodean la región no polar de la leucina en LeuT_{Aa}. En GLYT1 y GLYT2 estos residuos son sustituidos por aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas que podrían acomodar mejor a la glicina de menor tamaño (35). El modelo de LeuT_{Aa} ha demostrado su utilidad para los GLYTs ya que ha permitido identificar un residuo del TM6 como único responsable de la diferente sensibilidad de estos transportadores al inhibidor competitivo, sarcosina (N-metilglicina). La presencia de una serina (Ser481) en el sitio de unión al sustrato de GLYT2 impide la interacción de esta isoforma con sarcosina, de mayor tamaño que la glicina. Sin embargo, GLYT1 que en la posición equivalente tiene un residuo de glicina (Gly403), más pequeño, puede no sólo unir la sarcosi-

na sino incluso transportarla (41). Sin embargo, aunque el sitio de unión a glicina puede ser modelado por homología con la estructura bacteriana y los residuos implicados en la coordinación de sodio en los sitios Na1 y Na2 parecen estar conservados entre los transportadores SLC6/NSS, la explicación de estequiometrías alternativas a la 2:1:1 mostradas por algunos componentes de la familia como GLYT2 o SERT, es un aspecto que aun está por resolver (42).

Los transportadores eucariotas SLC6/NSS son funcionalmente dependientes de Cl⁻ para el transporte de sodio y el sustrato, propiedad que está ausente en LeuT_{Aa} y demás miembros bacterianos. La reciente identificación del sitio de cloruro ha confirmado la hipótesis de que el papel funcional del anión es llevado a cabo por aminoácidos con carga negativa (Glu290 en LeuT_{Aa}) en aquellos miembros SLC6 que no lo requieren durante el transporte (43, 44). El sitio propuesto está formado por residuos de TM2, TM6 y TM7 y está a tan sólo 5 Å del sitio Na1, proximidad que justifica el estrecho acoplamiento iónico. El intercambio de glutamato por serina en la posición 290 de LeuT_{Aa} genera mutantes bacterianos dependientes de cloruro y, el cambio recíproco en la posición homóloga en GAT1 y SERT, produce mutantes cuyo transporte es independiente del anión. Se ha sugerido que el papel del cloruro es estabilizar la unión del sodio y compensar las múltiples cargas positivas del complejo de translocación, por lo que es requerido en las etapas iniciales del ciclo de transporte (43, 44).

Mecanismo funcional: modelo de acceso alternante

Está bastante aceptado que los transportadores funcionan exponiendo alternadamente los sitios de unión a los sustratos a un lado y otro de la membrana, lo que permite captarlos en un compartimento, y liberarlos en el opuesto. Para que esto suceda, se requiere que las dos compuertas externa e interna no estén abiertas simultáneamente (Figura 3). El ciclo catalítico del transporte se inicia con la unión en el exterior de iones y sustrato a la conformación «hacia fuera» del transportador que mantiene abierta la compuerta externa. Esta unión provoca simultáneamente el cierre de la compuerta externa y la apertura de la interna, con la adquisición de la conformación «hacia dentro». La coordinación en el funcionamiento de las dos compuertas es clave ya que, si se abriesen simultáneamente, la energía contenida en el gradiente de sodio se perdería. Tras la liberación del sustrato y los iones al interior celular, la compuerta interna se cierra a la vez que la externa se abre completando el ciclo (35). La última etapa, el retorno del transportador vacío, es la más lenta y limitante del proceso glo-

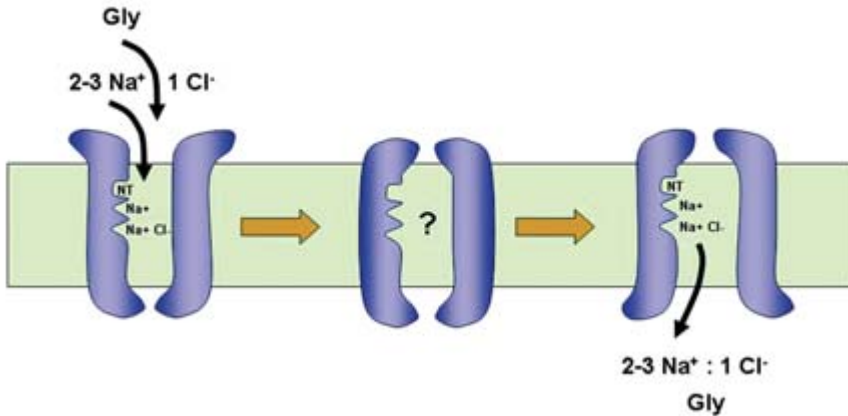


FIGURA 3. **Representación esquemática del mecanismo de «acceso alternativo».** Las diferentes conformaciones que el transportador adopta a lo largo del ciclo de transporte son tales que los sitios de unión de la glicina y los iones únicamente son accesibles desde un lado de la membrana. Así en el lado externo, el sustrato e iones se unirán a la conformación «hacia fuera» del transportador; esta unión induce cambio/s conformacionales en el transportador, liberándose la glicina e iones desde la conformación «hacia dentro» del transportador por ser los sitios de unión accesibles al interior celular.

bal y las mutaciones que bloquean al transportador en esta etapa, impiden que el ciclo de transporte se complete pero no afectan al intercambio reversible de sustrato e iones a ambos lados de la membrana. Esto explica que el transporte sea más lento que el intercambio, en el que esta etapa de retorno no está implicada. Esta teoría ha encontrado soporte en las estructuras cristalizadas de LeuT_{Aa} que presentan el bolsillo de unión a los sustratos e iones (incluso inhibidores) aislado del medio acuoso extra e intracelular por las respectivas compuertas (35, 45). Asimismo, el plegamiento de LeuT_{Aa} ha proporcionado una base estructural para la explicación detallada del mecanismo de acceso alternativo para el cual han sido propuestos dos modelos. Uno de ellos aprovecha la pseudo-simetría de la estructura de LeuT_{Aa} y propone que el transportador sufre un cambio conformacional que abre la compuerta interna a la vez que cierra la externa, de modo que el movimiento de dominios para abrir la compuerta interna es igual y simétrico al que cierra la externa (46). El otro modelo se basa en la demostración de que LeuT_{Aa} presenta un segundo sitio de unión al sustrato que sería el que, tras su unión en la conformación «hacia fuera», determinaría la apertura de la compuerta interna (47). La elucidación del mecanismo por el que se produce el acceso alternativo en los transportadores SLC6/NSS aún requiere trabajo experimental.

Oligomerización

Aunque la estructura cristalina de LeuT_{Aa} corresponde a un dímero, la identificación de los elementos estructurales que forman el bolsillo de unión del sustrato e iones en cada monómero sugiere que son funcionales de modo independiente (35). La dimerización de LeuT_{Aa} está sustentada por las dos últimas hélices α (TM11 y TM12) que no intervienen directamente en el núcleo funcional de la proteína. La formación de oligómeros se ha observado en diferentes transportadores eucariotas de la familia SLC6/NSS (ver revisión, 48) y, recientemente, se ha demostrado en GLYT1 y GLYT2 en membranas de células transfectadas y de cerebro mediante microscopía FRET y entrecruzamiento de protómeros (49, 50). Sin embargo, aunque es dudoso que la oligomerización de estas proteínas se requiera para el transporte, es probable su implicación en el tráfico del transportador desde su salida del retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática, como se ha descrito para GAT1 y GLYT1 (49,51). Así, cualquier alteración en la capacidad de oligomerización podría impedir el correcto posicionamiento de los transportadores en la membrana y afectar, en definitiva, a la capacidad de transporte.

Consecuencias de la eliminación de los genes codificantes de GLYT1 y GLYT2

La función de GLYT1 y GLYT2 *in vivo* fue puesta de manifiesto mediante la generación de ratones modificados genéticamente a los que se eliminó el gen de GLYT1 (*Slc6a9*) o GLYT2 (*Slc6a5*) (26, 27). Los ratones GLYT1^{-/-} sufrían alteraciones respiratorias y motosensoriales graves caracterizadas por letargia, hipotonía y falta de respuesta a estímulos sensoriales que provocaban su muerte a las 6-14 h tras el nacimiento. Los registros funcionales del circuito neuronal del tallo cerebral responsable del ritmo respiratorio presentaban un patrón irregular y muy lento que se normalizaba con la adición de estricnina, el antagonista del GlyR. Las motoneuronas del núcleo hipogloso del tallo cerebral de estos animales también presentaban una activación tónica elevada de GlyR debido a una concentración de glicina en la sinapsis superior a la normal (26). Estas observaciones revelaron el papel de GLYT1 en el mantenimiento de los niveles de glicina requeridos para una neurotransmisión glicinérgica normal, que impida el fallo respiratorio en el periodo neonatal.

Los ratones GLYT2^{-/-}, aparentemente normales al nacer, sin embargo morían prematuramente durante la segunda semana de vida debido a alteraciones neuromotoras graves caracterizadas por rigidez muscular, espasticidad, temblo-

res, convulsiones. Los análisis electrofisiológicos de neuronas de tallo cerebral aisladas de estos ratones, mostraban una menor amplitud de las corrientes postsinápticas espontáneas inhibitoras glicinérgicas (IPSCs), debido a una disminución de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis. Por tanto, GLYT2 desempeña un papel crucial en el reciclaje de glicina en el terminal presináptico aportando suficiente neurotransmisor para el relleno de las vesículas sinápticas y el mantenimiento de su contenido (27). Los resultados obtenidos en los ratones deficientes genéticamente permiten adjudicar papeles complementarios, y por tanto no redundantes, a GLYT1 y GLYT2 en la neurotransmisión glicinérgica inhibitora, lo que ha despertado el interés en el desarrollo de una farmacología selectiva de los GLYTs con posibles aplicaciones en la modulación de la neurotransmisión glicinérgica.

Las características funcionales de GLYT1 y GLYT2 son idóneas para llevar a cabo sus respectivos papeles fisiológicos. Debido al mayor acoplamiento a sodio, GLYT2 puede acumular niveles de glicina en el citoplasma de la terminal del orden de mM, coincidiendo con la afinidad del transportador vesicular de glicina, VIAAT. Estudios inmunohistoquímicos han confirmado la mayor acumulación de glicina en neuronas que expresan GLYT2 (52). Además, GLYT2 también participa junto a GLYT1 en la finalización de la acción de la glicina en algunas sinapsis. Prueba de ello es el aumento en los niveles de glicina y prolongación de los potenciales postsinápticos glicinérgicos observados al inhibir GLYT2 con compuestos específicos (53, 54). Por otra parte, GLYT1 puede funcionar de forma reversible retirando o liberando glicina en la sinapsis debido a su menor acoplamiento al gradiente de sodio. Esta liberación de neurotransmisor por un mecanismo independiente de Ca^{2+} puede ser importante en determinadas situaciones fisiopatológicas de despolarización neuronal ó de astrocitos.

El papel que GLYT1 desempeña en la neurotransmisión glutamatérgica no ha podido establecerse en los ratones GLYT1^{-/-} ya que su muerte prematura ocurre con anterioridad al desarrollo de la transmisión mediada por glutamato. Sin embargo, los ratones heterocigotos (GLYT1^{+/-}) adultos, en los que los niveles de GLYT1 caen al 50%, presentan una elevada actividad del receptor de glutamato tipo NMDA respecto a otros tipos (AMPA), y aventajan a los animales controles en pruebas de memoria espacial (55). Estas respuestas son análogas a las que se observan en animales en los que se ha producido inhibición farmacológica de GLYT1 *in vivo* (56). Resultados similares se desprenden de un reciente trabajo con ratones mutantes condicionales en los que el gen de GLYT1 se elimina selectivamente de neuronas del cerebro anterior (57, 58). Así, los datos indican que el bloqueo o baja expresión de GLYT1 puede producir la sobresti-

mulación de los receptores de glutamato tipo NMDA debido a la elevación de los niveles sinápticos de glicina.

Regulación de los transportadores de glicina

En la actualidad son escasos los datos existentes sobre la regulación de la síntesis y degradación de los transportadores de glicina. La expresión de GLYT1 está regulada por factores de transcripción de la familia HMGN3, muy abundantes en células de glía y retina, coincidiendo con la elevada presencia del transportador (59). El complejo Trb-1/CASK, específico de neuronas, regula la transcripción de GLYT1 al unirse directamente a la región 5' del promotor (60). En cultivos mixtos glía/neurona, la expresión glial de GLYT1 es dependiente de la actividad de las neuronas adyacentes, a través de un mecanismo aún por determinar (61). En los núcleos cocleares dorsales del sistema auditivo la estimulación acústica de la actividad neuronal regula la transcripción del gen de GLYT2 (62).

En una fase posterior a la síntesis de los transportadores en el ribosoma, los cambios en la actividad y/o en el número de moléculas de GLYT1 y GLYT2 en la membrana plasmática podrían afectar en gran medida a la eficacia de la neurotransmisión inhibitoria y excitadora en la que desempeñan su papel. En este sentido, se han propuesto diversos mecanismos reguladores. El tráfico intracelular de GLYT1 y GLYT2 hasta su llegada a la superficie celular está modulado por modificaciones postraduccionales e interacciones con diversas proteínas. La profusa N-glicosilación del bucle extracelular 4 es necesaria para la correcta inserción de GLYT1 y GLYT2 en zonas determinadas de la membrana en células polarizadas (33, 34), aspecto fundamental por tratarse de proteínas neuronales. Las interacciones del extremo C-terminal de GLYT1 con componentes del complejo del exocisto y con la proteína PSD95 parecen contribuir a la fidelidad y estabilidad de la inserción en la membrana, respectivamente (29, 63). En las terminales presinápticas, la interacción de GLYT2 con sintenina-1 y la proteína SNARE sintaxina 1A estabilizan y regulan la inserción del transportador en la membrana (64-66). El extremo N-terminal de GLYT2 interacciona con Ulip-6 (Unc-33), miembro de una familia de proteínas implicadas en el crecimiento axonal. Ulip-6 podría activar la endocitosis de GLYT2, lo que disminuiría la presencia del transportador en la membrana (67). Algunos componentes de vías de señalización, como el Ca^{2+} y la proteína quinasa C, también regulan el tráfico intracelular de los GLYTs (68, 69). Los mecanismos por los que actúan no han sido del todo establecidos, si bien podrían indirectamente modular las interacciones con las proteínas descritas, activar la endocitosis dependiente de ubiquitinación o direc-

tamente inducir la exocitosis dependiente de Ca^{2+} a través del complejo SNARE (66). No se ha detectado fosforilación directa de GLYT1 y GLYT2 por la proteína quinasa C y permanece la incógnita de si este mecanismo es responsable de la endocitosis mediada por los ésteres de forbol (70).

El reciente establecimiento de la asociación de GLYT2 con microdominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos (*membrane rafts*) en neuronas de tallo cerebral ha añadido un mecanismo nuevo de regulación de la actividad de este transportador. La modificación farmacológica de los componentes lipídicos de los *rafts*, reduce tanto su inclusión en *rafts* como su actividad de transporte de glicina, lo que indica que GLYT2 requiere la localización en balsas lipídicas para mantener una función óptima (71). Además, la endocitosis del transportador podría estar relacionada con su asociación a *rafts*, ya que el tratamiento con ésteres de forbol no sólo activa la internalización de GLYT2, como parece ser una característica general de los transportadores SLC6/NSS, sino que desplaza a GLYT2 de los *rafts*. Sin embargo, un mutante refractario a la endocitosis mediada por ésteres de forbol, no experimenta este efecto y permanece asociado a *rafts* (72).

Otros compuestos a añadir a la numerosa lista de moduladores, en este caso de GLYT1, son el ácido araquidónico, la anandamida, los iones Zn^{2+} y los H^+ . Todos ellos también actúan sobre los receptores NMDA, por lo que la modulación conjunta de ambas proteínas supondría una regulación más precisa y eficaz de la actividad glutamatérgica (73-75).

NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA Y PATOLOGÍAS DEL SNC

Los fenotipos de los ratones GLYT1^{-/-} y GLYT2^{-/-} son muy diferentes entre sí y presentan características similares a los síntomas de dos tipos de enfermedades hereditarias humanas que aparecen en la primera etapa postnatal o en la adolescencia. Los animales GLYT1^{-/-} en sus escasas horas de vida postnatal presentan letargia, hipotonía, escasa respuesta a estímulos táctiles y una severa depresión del ritmo respiratorio, síntomas todos ellos que se manifiestan en la encefalopatía glicinérgica o hiperglicinemia no cetónica humana (OMIM 605899). En los pacientes de esta enfermedad en los que se conoce su etiología, ésta se debe a una defectuosa degradación intracelular de la glicina provocada por mutaciones en alguna de las proteínas del «sistema de degradación de glicina o descarboxilasa de glicina», (GCS). La mayoría de los pacientes presentan defectos en las proteínas P o T mitocondriales, que hacen inactivo al GCS, lo que genera elevados niveles de glicina en los fluidos corporales incluido el fluido cefalo-

rraquídeo (76). Sin embargo en algunos de estos pacientes no se han encontrado tales polimorfismos, lo que abre la posibilidad de que otros genes puedan estar implicados, entre ellos GLYT1, cuya actividad de transporte proporciona sustrato a este complejo de degradación en astrocitos (76, 77). Quizá polimorfismos aún no conocidos del gen de GLYT1 estén asociados con esta enfermedad.

Los ratones mutantes GLYT2^{-/-} presentan síntomas antagónicos a los anteriores, más propios de una hipoglicinemia tales como una alterada coordinación motora, rigidez muscular, espasticidad, temblores frecuentes y convulsiones, entre otros. Este fenotipo reproduce en gran medida los síntomas de la hiperplexia humana (27).

Hiperplexia

Durante mucho tiempo se había considerado a la neurotransmisión gabaérgica como la responsable de diferentes alteraciones neuromusculares como epilepsia y la hiperplexia o enfermedad del sobresalto. Sin embargo, estudios farmacológicos y genéticos han puesto de manifiesto que las vías de neurotransmisión glicinérgica inhibitoria están directamente relacionadas con la hiperplexia hereditaria (comúnmente denominada a veces «síndrome del bebé entumecido», OMIM 149400). Es un síndrome clínico poco común que se manifiesta muy pronto tras el nacimiento (o incluso en el periodo intrauterino). Se caracteriza por una respuesta exagerada a estímulos somatosensoriales e hipertonia muscular. Los individuos reaccionan con sobresaltos enérgicos y sostenidos manteniendo una apreciable rigidez de tronco y extremidades con aparición de temblores frecuentes, que en ocasiones recuerdan a las respuestas propias de ataques epilépticos tónicos. Aunque con el paso del tiempo algunos de los síntomas iniciales pueden atenuarse, el riesgo de muerte súbita del bebé es alto como consecuencia de fallos cardiorespiratorios y espasmos laríngeos (78-80).

Hiperplexia postsináptica: mutaciones en el receptor de glicina (GlyR) y proteínas relacionadas

Los análisis de ligamiento genético llevados a cabo en la década de los 90 demostraron que la región distal del cromosoma 5q estaba relacionada con la hiperplexia hereditaria y que mutaciones en el gen *Glr1* que codifica la subunidad $\alpha 1$ del GlyR, localizado en esa región del cromosoma, 5q32, causaban formas autosómicas dominantes o recesivas de hiperplexia según el tipo y posición de la mu-

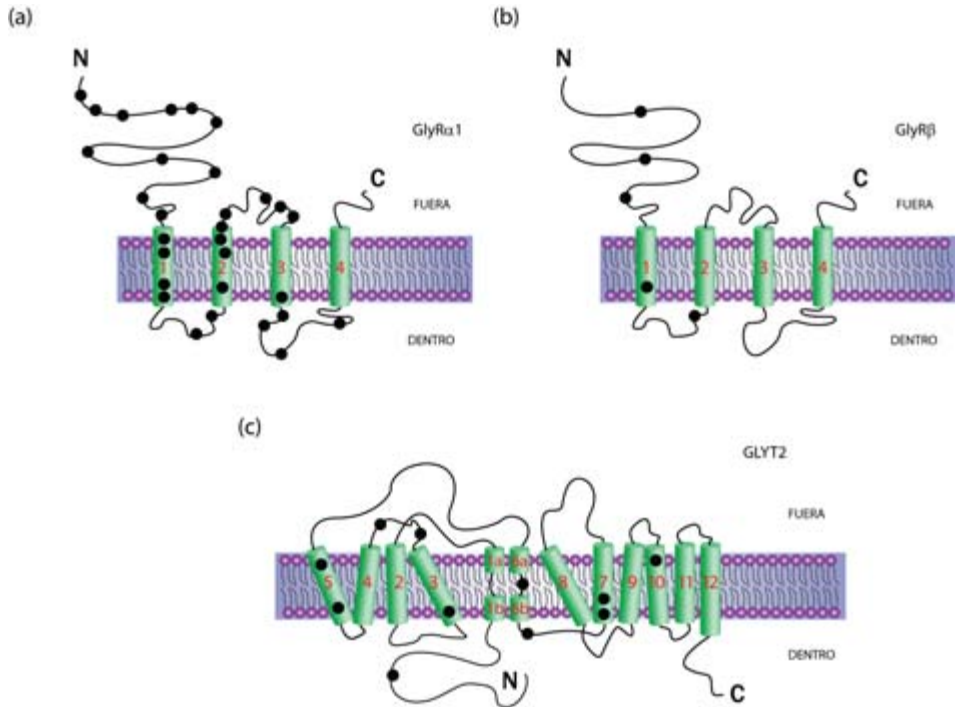


FIGURA 4. **Mutaciones causantes de hiperplexia hereditaria identificadas en los genes de subunidades del receptor de glicina y del transportador de glicina GLYT2.** (a) y (b) Estructura secundaria de las subunidades $\alpha 1$ y β del receptor postsináptico de glicina GlyR. Son proteínas politépicas que atraviesan la membrana mediante cuatro dominios helicoidales y dejan, a modo de antenas extracelulares, los extremos amino y carboxilo. (c) Estructura secundaria del transportador neuronal de glicina GLYT2. La proteína presenta 12 dominios transmembrana con los extremos amino y carboxilo localizados en el interior celular. Se indica con puntos oscuros la posición en las proteínas de las mutaciones causantes de hiperplexia hereditaria identificadas hasta la fecha en los genes *Glr1*, *Glr2* y *Slc6a5* que codifican GlyR $\alpha 1$, β y GLYT2, respectivamente.

tación (81, 82). Las alteraciones encontradas en pacientes son sustituciones puntuales de residuos, truncamientos de la proteína (sin sentido) y cambios de fase de lectura. La gran mayoría se deben a polimorfismos que afectan a los dominios M1-M3 del GlyR $\alpha 1$, donde se hallan el sitio de unión a glicina y los determinantes del canal de cloruro. Las mutaciones autosómicas dominantes más numerosas se encuentran próximas al dominio TM2 de GlyR $\alpha 1$, siendo las más frecuentes la sustitución de la Arg271 por Leu o Gln (R271L o R271Q). Este residuo es necesario para la selectividad aniónica del canal de cloruro. Otras mutaciones alteran la comunicación alostérica entre el canal y el sitio glicina determinando una disminución aparente de la afinidad por el neurotransmisor (Figura 4). También se han en-

contrado mutaciones en *Glr1* responsables de formas autosómicas recesivas de la enfermedad, aunque no se han detectado mutaciones en otras subunidades del GlyR ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$), lo que parece coherente con su menor abundancia y su emergente papel en procesos no relacionados con el control de la coordinación de respuestas motoras espinales. Más recientemente se han descrito casos de hiperplexia causados por mutaciones en el gen de la subunidad β del GlyR, *Glrb* (83), así como en los genes de proteínas asociadas al GlyR, como la gefirina (*GPNH*) y colibistina (*ARHGEF9*) que forma parte de la maquinaria de señalización que controla la migración de gefirina hacia la membrana postsináptica en desarrollo (1, 84, 85, para revisión ver 11, 13). Para casi todas estas mutaciones se han generado líneas de ratones mutantes (*Oscillator*, *Nmf11*, *Cincinatti*) que generan fenotipos con sintomatología similar a la manifestada en la enfermedad en humanos (86-88).

Hiperplexia presináptica: mutaciones en el transportador neuronal de glicina GLYT2

Aproximadamente un 70% de los pacientes diagnosticados de hiperplexia hereditaria no presentan mutaciones en los genes *GlyR*, *GPNH* o *ARHGEF9A*, clásicamente asociados con la enfermedad, lo que sugirió la implicación de otros genes en su etiología. Una valiosa pista en la búsqueda de genes candidatos fue proporcionada por los ratones carentes del gen de GLYT2, cuyo fenotipo reproduce los síntomas de los animales con mutaciones en *Glr1* (*Oscillator*, *Nmf11*, *Cincinatti*). Los recientes análisis genéticos han permitido describir varias mutaciones en el gen de GLYT2, *Slc6a5*, localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.1) causantes de hiperplexia humana (89, 90). *Slc6a5* posee 16 exones distribuidos en una región de aproximadamente 21.4 Mb en la que sólo el primer exón contiene el sitio de iniciación de la traducción. Se han localizado 11 mutaciones en los pacientes diagnosticados de hiperplexia que están repartidas por el marco de lectura de la proteína y afectan a los exones 2, 5, 7-10 y 13, estando ausentes en individuos sanos. La mayor parte tienen carácter autosómico recesivo. Funcionalmente son mutaciones puntuales o sin sentido que producen, en todos los casos, un transportador inactivo. Algunas generan un transportador truncado y, por lo tanto, inactivo (Y377X, V432F+fs97, Q630X, P108L+fs25). Otras, producen una proteína que, si bien se expresa en la membrana plasmática, es una proteína inactiva por fallos en la unión de alguno de sus ligandos, glicina (W482R) o sodio (N509S) o por estar la sustitución en regiones cruciales para la actividad de transporte (T425M, Y491C, N511S). En otros polimorfismos de hiperplexia hereditaria, GLYT2 no se expresa en la membrana plasmática y queda retenido en el retículo

endoplásmico al estar alterado su tráfico intracelular (S512R). Esta mutación es la única que se manifiesta como dominante, lo que ha llevado a sugerir que podría funcionar como dominante negativo del tráfico de GLYT2, probablemente mediante retención del transportador silvestre en un oligómero común. Otros polimorfismos del gen *Slc6a5* producen transportadores aparentemente activos y funcionales, habiéndose propuesto para estos casos fallos en la interacción de GLYT2 con proteínas accesorias necesarias para el correcto tráfico de GLYT2 hacia la membrana en el sistema nervioso (L306V, A89E, G767R, 85,86). Las proteínas sintenina-1, syntaxina 1A y Ulip-6 que interactúan con GLYT2, así como el transportador vesicular de glicina VIAAT, se consideran posibles candidatos (91). Más recientemente se ha descrito una mutación del gen de GLYT2 vacuno (L270P) como responsable de una enfermedad similar a la hiperplexia humana, la distonía muscular congénita, enfermedad letal para el ganado con las consiguientes repercusiones económicas. La mutación probablemente interrumpe la estructura α helicoidal del TM3, que contiene residuos cruciales en la unión de glicina (35, 92).

Esquizofrenia

El doble papel que GLYT1 desempeña regulando los niveles de glicina en la sinapsis inhibitoria glicinérgica y excitadora glutamatérgica convierte al transportador en un blanco terapéutico potencial para algunas patologías asociadas a alteraciones de estas vías nerviosas.

La esquizofrenia es un grave patología del SNC cuya etiología se ha asociado tradicionalmente a una sobreactivación de vías dopaminérgicas (hipótesis dopaminérgica). El deterioro cognitivo producido en estos pacientes se trata en la actualidad con antipsicóticos, antagonistas de los receptores de dopamina D2. Sin embargo, estudios preclínicos y clínicos realizados en la última década han llevado a desarrollar la hipótesis glutamatérgica que postula que muchos de los síntomas de la patología que afectan al deterioro cognitivo son debidos a una reducida función del receptor NMDA. Así, la inactivación de los genes de algunas subunidades del receptor y la inhibición funcional con agentes específicos que lo bloquean, reproducen algunos de los síntomas psicóticos de la esquizofrenia (93-95). Por otra parte, la sobreexpresión de la subunidad NR2B de NMDA en ratones aumenta su capacidad de aprendizaje, de forma similar a lo observado en ratones mutantes *GLYT1^{+/-}* (96). Puesto que GLYT1 regula las concentraciones de glicina en el microentorno de los receptores de NMDA y la reducción de la actividad de GLYT1 neuronal mejora el aprendizaje asociativo, en la actualidad parece claro que el bloqueo de transportador GLYT1 constituye un abordaje farmacológico para el tratamiento de la esquizofrenia. En este sen-

tido, son alentadores los resultados de los ensayos clínicos en pacientes de esquizofrenia realizados con sarcosina y derivados que han mostrado mejoría de los síntomas cognitivos y psicóticos (56, 97). Actualmente, varias compañías farmacéuticas están llevando a cabo ensayos preclínicos con una segunda generación de inhibidores de GLYT1 no relacionados estructuralmente con la sarcosina (98, 99). La disponibilidad de inhibidores selectivos de la forma neuronal de GLYT1 permitiría, asimismo, abundar en el estudio de su papel fisiológico.

Otras patologías

La red de interneuronas glicinérgicas localizadas en las astas dorsales de la médula espinal regulan la transmisión de señales nociceptivas desde la periferia a regiones superiores del cerebro (100). El desequilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria de esta región medular desempeña un papel clave en la patología del dolor crónico tanto de tipo inflamatorio como neuropático. Actualmente se considera a la inhibición de la neurotransmisión glicinérgica o desinhibición como el mecanismo responsable de la patología (101). Por tanto el aumento de los niveles de glicina en las sinapsis de las astas dorsales por inhibidores de los GLYTs podría producir analgesia. Los resultados de trabajos recientes demuestran la eficacia de la inhibición de los GLYTs en el control del dolor neuropático en ratones (102, 103).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Investigación e Innovación (BFU2005-05931), el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) del ISCIII, la Comunidad Autónoma de Madrid (S2006/SAL-0253), y una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LEGENDRE, P. (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life.* 58: 760-793.
- (2) WENTHOLD, R. Y HUNTER, C. (1990) Immunochemistry of glycine and glycine receptors in the central auditory system. En: *Glycine neurotransmission.* (Ottersen OP, Storm-Mathisen J eds), pp.: 391-415. John Wiley, Chichester.

- (3) POURCHO, R.G. Y GOEBEL, D.J. (1990) Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine containing neurons in the retina. En: Glycine neurotransmission. (Ottersen OP, Storm-Mathisen J eds), pp.: 355-389. John Wiley, Chichester.
- (4) HARVEY, R.J.; DEPNER, U.B.; WÄSSLE, H.; AHMADI, S.; HEINDL, C.; REINOLD, H.; SMART, T.G.; HARVEY, K.; SCHÜTZ, B.; ABO-SALEM, O.M.; ZIMMER, A.; POISBEAU, P.; WELZL, H.; WOLFER, D.P.; BETZ, H.; ZEILHOFER, H.U. Y MÜLLER, U. (2004) GlyR alpha 3: an essential target for spinal PGE(2)-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 304: 884-887.
- (5) NONOG, Y.; HUANG, Y.Q.; JU, W.; KALIA, L.V.; AHMADIAN, G.; WANG, Y.T. AND SALTER, M.W. (2003) Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature*. 422: 302-7.
- (6) ZAFRA, F.; ARAGÓN, C. Y GIMÉNEZ, C. (1997) Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol. Neurobiol.* 14:117-142.
- (7) BETZ, H. Y LAUBE, B. (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* 97: 1600-1610.
- (8) MCINTRE, S. L.; REIMER, R. J.; SCHUSKE, K.; EDWARDS, R. H. Y JORGENSEN, E. M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*. 389: 870-876.
- (9) SAGNE, C.; EL MESTIKAWY, S.; ISAMBERT, M. F.; HAMON, M.; HENRY, J. P.; GIROS, B. Y GASNIER, B. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* 417: 177-183.
- (10) GASNIER, B. (2004) The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers. Arch.* 447: 756-759.
- (11) SAKATA, Y.; OWADA, Y.; SATO, K.; KOJIMA, K.; HISANAGA, K.; SHINKA, T.; SUZUKI, Y.; AOKI, Y.; SATOH, J.; KONDO, H.; MATSUBARA, Y. Y KURE, S. (2001) Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 94: 119-130.
- (12) EULENBURG, V.; ARMSEN, W.; BETZ, H. Y GOMEZA, J. (2005) Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem. Sci.* 30: 325-333.
- (13) BETZ, H. Y LAUBE, B. (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* 97: 1600-1610.
- (14) RAJENDRA, S.; LYNCH, J.W. Y SCHOFIELD, P.R. (1997) The glycine receptor. *Pharmacol. Ther.* 73: 121-146.
- (15) LYNCH, J.W. (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.* 84: 1051-1095.
- (16) LAUBE, B.; MAKSAY, G.; SCHEMM, R. Y BETZ, H. (2002) Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 519-527.

- (17) WASSLE, H. (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 747-757.
- (18) JUSUF, P.R.; HAVERKAMP, S. Y GRÜNERT, U. (2005) Localization of glycine receptor alpha subunits on bipolar and amacrine cells in primate retina. *J. Com. Neurol.* 488: 113-128.
- (19) IVANOVA, E.; MÜLLER, U. Y WÄSSLE, H. (2006) Characterization of the glycinergic input to bipolar cells of the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 23: 350-364.
- (20) LÓPEZ-CORCUERA, B.; GEERLINGS, A. Y ARAGÓN, C. (2001) Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Molecular Membrane Biology.* 18: 13-20
- (21) ARAGÓN, C. Y LÓPEZ-CORCUERA, B. (2005) Glycine transporters: crucial roles of pharmacological interest revealed by gene deletion. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 283-286.
- (22) ARAGÓN, C. Y LÓPEZ-CORCUERA, B. (2003) Structure, function and regulation of glycine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* 479: 249-262.
- (23) JURSKY, F. Y NELSON, N. (1995) Localization of glycine transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor. *J. Neurochem.* 67: 336-344.
- (24) ZAFRA, F.; ARAGÓN, C.; OLIVARES, L.; DANBOLT, N.C.; GIMÉNEZ, C. Y STORM-MATHISEN, J. (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15: 3952-3969.
- (25) ZAFRA, F.; GOMEZA, J.; OLLIVARES, L.; ARAGÓN, C. Y GIMÉNEZ, C. (1995) Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1342-1352.
- (26) GOMEZA, J.; HULSMANN, S.; OHNO, K.; EULENBURG, V.; SZOKE, D.; RICHTER, D.W. Y BETZ, H. (2003) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron.* 40: 785-796.
- (27) GOMEZA, J.; OHNO, K.; HULSMANN, S.; ARMSSEN, W.; EULENBURG, V.; RICHTER, D.W. Y BETZ, H. (2003) Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperkplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron.* 40: 796-806.
- (28) CUBELOS, B.; GIMÉNEZ, C. Y ZAFRA, F. (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cer. Cortex.* 15: 448-459.
- (29) CUBELOS, B.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.I.; GIMÉNEZ, C. Y ZAFRA, F. (2005) The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization. *J. Neurochem.* 95: 1047-1058.
- (30) LÓPEZ-CORCUERA, B.; MARTÍNEZ-MAZA, R.; NÚÑEZ, E.; ROUX, M.; SUPPLISSON, S.; ARAGÓN, C. (1998) Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *J. Neurochem.* 71: 2211-9.
- (31) ROUX, M.J. Y SUPPLISSON, S. (2000) Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron.* 25: 373-383.

- (32) SUPPLISSON, S. Y ROUX, M.J. (2002) Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS Lett.* 529: 93-101.
- (33) OLIVARES, L.; ARAGÓN, C.; GIMÉNEZ, C. Y ZAFRA, F. (1995) The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter. *J. Biol. Chem.* 270: 9437-9442.
- (34) MARTINEZ-MAZA, R.; POYATOS, I.; LÓPEZ-CORCUERA, B.; GIMENEZ, C.; ZAFRA, F. Y ARAGON, C. (2001) The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 276: 2168-2173.
- (35) YAMASHITA, A.; SINGH, S. K.; KAWATE, T.; JIN, Y. Y GOUAUX, E. (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature.* 437: 215-223.
- (36) FAHAM, S.; WATANBE, A.; BESSERER, G.M.; CASCIO, D.; SPECHT, A.; HIRAYAMA, B.A.; WRIGHT, E.M. Y ABRAMSON, J. (2008) The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science.* 32: 810-4.
- (37) WEYAND, S.; SHIMAMURA, T.; YAJIMA, S.; SUZUKI, S.; MIRZA, O.; KRUSONG, K.; CARPENTER, E.P.; RUTHERFORD, N.G.; HADDEN, J.M.; O'REILLY, J.; MA, P.; SSAIDJAM, M.; PATCHING, S.G.; HOPE, R.J.; NORBERTCZAK, H.T.; ROACH, P.C.; IWATA, S.; HENDERSON, P.J. Y CAMERON, A.D. (2008) Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science.* 322: 709-13.
- (38) BISMUTH, Y.; KAVANAUGH, M.P. Y KANNER, B.I. (1997) Tyrosine 140 of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 plays a critical role in neurotransmitter recognition. *J. Biol. Chem.* 272: 16096-16102.
- (39) CHEN, J.G.; SACHPATZIDIS, A. Y RUDNICK, G. (1997) The third transmembrane domain of the serotonin transporter contains residues associated with substrate and cocaine binding. *J. Biol. Chem.* 272: 28321-28327
- (40) PONCE, J.; BITON, B.; BENAVIDES, J.; AVENET, P. Y ARAGON, C. (2000) Transmembrane domain III plays an important role in ion binding and permeation in the glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 275: 13856-13862.
- (41) VANDENBERG, R. J.; SHADDICK, K. Y JU, P. (2007) Molecular basis for substrate discrimination by glycine transporters. *J. Biol. Chem.* 282: 14447-14453.
- (42) KANNER, B.I. Y ZOMOT, E. (2008) Sodium-coupled neurotransmitter transporters. *Chem. Rev.* 108: 1654-1668.
- (43) ZOMOT, E.; BENDAHAN, A.; QUICK, M.; ZHAO, Y.; JAVITCH, J.A. Y KANNER, B.I. (2007) Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters. *Nature.* 449: 726-730.

- (44) FORREST, L.R.; TAVOULARI, S.; ZHANG, Y.W.; RUDNICK, G. Y HONIG, B. (2007) Identification of a chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻-dependent transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104: 12761-12766.
- (45) SINGH, S.K.; YAMASHITA, A. Y GOUAUX, E. (2007) Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature.* 448: 952-6.
- (46) FORREST, L.R.; ZHANG, Y.W.; JACOBS, M.T.; GESMONDE, J.; XIE, E.L.; HONIG, B.H. Y RUDNICK, G. (2008) Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105: 10338-43.
- (47) SHI, L.; QUICK, M.; ZHAO, Y.; WEINSTEIN, H. Y JAVITHC, J.A. (2008) The mechanism of a neurotransmitter: sodium symporter—inward release of Na⁺ and substrate is triggered by substrate in a second binding site. *Mol. Cell.* 30: 667-77.
- (48) FARHAN, H.; FREISSMUTH, M. Y SITTE, H.H. (2006) Oligomerization of neurotransmitter transporters: a ticket from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *Handb. Exp. Pharmacol.* 175: 233-249.
- (49) FERNANDEZ-SANCHEZ, E.; DIEZ-GUERRA, F. J.; CUBELOS, B.; GIMENEZ, C. Y ZAFRA, F. (2008) Mechanisms of endoplasmic-reticulum export of glycine transporter-1 (GLYT1). *Biochem. J.* 409: 669-681.
- (50) BARTHOLOMAUS, I.; MILAN-LOBO, L.; NICKE, A.; DUTERTRE, S.; HASTRUP, H.; JHA, A.; GETHER, U.; SITTE, H.H.; BETZ, H. Y EULENBURG, V. (2008) Glycine transporter dimers: evidence for occurrence in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 283: 10978-10991.
- (51) FARHAN, H.; REITERER, V.; KORKHOV, V. M.; SCHMID, J. A.; FREISSMUTH, M. Y SITTE, H.H. (2007) Concentrative export from the endoplasmic reticulum of the gamma-aminobutyric acid transporter 1 requires binding to SEC24D. *J. Biol. Chem.* 282: 7679-7689.
- (52) POYATOS, I.; PONCE, J.; ARAGON, C.; GIMENEZ, C. Y ZAFRA, F. (1997) The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 49: 63-70.
- (53) BRADAIA, A.; SCHLICHTER, R. Y TROUSLARD, J. (2004) Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *J. Physiol.* 559: 169-186.
- (54) WHITEHEAD, K.J.; PEARCE, S.M.; WALKER, G.; SUNDARAM, H.; HILL, D. Y BOWERY, N.G. (2004) Positive N-methyl-D-aspartate receptor modulation by selective glycine transporter-1 inhibition in the rat dorsal spinal cord in vivo. *Neuroscience.* 126: 381-390.
- (55) TSAI, G.; RALPH-WILLIAMS, R.J.; MARTINA, M.; BERGERON, R.; BERGER-SWEENEY, J.; DUNHAM, K.S.; JIANG, Z.; CAINE, S.B. Y COYLE, J.T. (2004) Gene knockout of glyci-

- ne transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 8485-8490.
- (56) KINNEY, G.G.; SUR, C.; BURNO, M.; MALLORGA, P.J.; WILLIAMS, J.B.; FIGUEROA, D.J.; WITTMANN, M.; LEMAIRE, W. Y 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 behavior. *J. Neurosci.* 23: 7586-7591.
- (57) YEE, B.K.; BALILC, E.; SINGER, P.; SCHWERDEL, C.; GRAMPP, T.; GABERNET, L.; KNUESEL, I.; BENKE, D.; FELDON, J.; MOHLER, H. Y BOISON, 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.
- (58) SINGER, P.; BOISON, D.; MOHLER, H.; FELDON, J. Y YEE, B.K. (2007) Enhanced recognition memory following glycine transporter 1 deletion in forebrain neurons. *Behav. Neurosci.* 121: 815-825.
- (59) WEST, K. L.; CASTELLINI, M.A.; DUNCAN, M.K. Y BUSTIN, M. (2004) Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol. Cell. Biol.* 24: 3747-3756.
- (60) WANG, T.F.; DING, C.N.; WANG, G.S.; LUO, S.C.; LIN, Y.L.; RUAN, Y.; HEVNER, R.; RUBENSTEIN, J.L. Y HSUEH, Y.P. (2004) Identification of Tbr-1/CASK complex target genes in neurons. *J. Neurochem.* 91: 1483-1492.
- (61) ZAFRA, F.; POYATOS, I. Y GIMENEZ, C. (1997) Neuronal dependency of the glycine transporter GLYT1 expression in glial cells. *Glia.* 20: 155-162.
- (62) BARMACK, N.H.; GUO, H.; KIM, H.J.; QIAN, H. Y QIAN, Z. (1999) Neuronally modulated transcription of a glycine transporter in rat dorsal cochlear nucleus and nucleus of the medial trapezoid body. *J. Comp. Neurol.* 415: 175-188.
- (63) CUBELOS, B.; GIMENEZ, C. Y ZAFRA, F. (2005) The glycine transporter GLYT1 interacts with Sec3, a component of the exocyst complex. *Neuropharmacology.* 49: 935-944.
- (64) OHNO, K.; KOROLL, M.; EL FAR, O.; SCHOLZE, P.; GOMEZA, J. Y BETZ, H. (2004) The neuronal glycine transporter 2 interacts with the PDZ domain protein syntenin-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 26: 518-529.
- (65) GEERLINGS, A.; LOPEZ-CORCUERA, B. Y ARAGON, C. (2000) Characterization of the interactions between the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 and the SNARE protein syntaxin 1A. *FEBS Lett.* 470: 51-54.
- (66) GEERLINGS, A.; NUNEZ, E.; LOPEZ-CORCUERA, B. Y ARAGON, C. (2001) Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 276: 17584-17590.

- (67) HORIUCHI, M.; LOEBRICH, S.; BRANDSTAETTER, J.H.; KNEUSSEL, M. Y BETZ, H. (2005) Cellular localization and subcellular distribution of Unc-33-like protein 6, a brain-specific protein of the collapsin response mediator protein family that interacts with the neuronal glycine transporter 2. *J. Neurochem.* 94: 307-315.
- (68) GOMEZA, J.; ZAFRA, F.; OLIVARES, L.; GIMÉNEZ, C. Y ARAGÓN, C. (1995) Regulation by phorbol esters of the glycine transporter (GLYT1) in glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1233: 41-46.
- (69) FORNÉS, A.; NÚÑEZ, E.; ARAGÓN, C. Y LÓPEZ-CORCUERA, B. (2004) The second intracellular loop of the glycine transporter 2 contains crucial residues for glycine transport and phorbol ester-induced regulation. *J. Biol. Chem.* 279: 22934-22943.
- (70) SATO, K.; ADAMS, R.; BETZ, H. Y SCHLOSS, P. (1995) Modulation of a recombinant glycine transporter (GLYT1b) by activation of protein kinase C. *J. Neurochem.* 65: 967-73.
- (71) NÚÑEZ, E.; ALONSO-TORRES, P.; FORNÉS, A.; ARAGÓN, C. Y LÓPEZ-CORCUERA, B. (2008) The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment. *J. Neurochem.* 105: 2080-2090.
- (72) FORNÉS, A.; NÚÑEZ, E.; ALONSO-TORRES, P.; ARAGÓN, C. Y LÓPEZ-CORCUERA, B. (2008) Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GLYT2 by protein kinase C. *Biochem. J.* 412: 495-506.
- (73) PEARLMAN, R.J.; AUBREY, K.R. Y 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. Y 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. Y VANDENBERG, R.J. (2000) Molecular basis for proton regulation of glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *Mol. Pharmacol.* 58: 129-135.
- (76) APPLGARTH, D.A. Y TOONE, J.R. (2001) Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy): laboratory diagnosis. *Mol Genet Metab.* 74: 139-46.
- (77) VERGOUWE, M.N.; TIJSEN, M.A.; SHIANG, R.; VAN DIJK, J.G.; AL SHAHWAN, S.; OPHOFF, R.A. Y FRANTS, R.R. (1997) Hyperekplexia-like syndromes without mutations in the GLRA1 gene. *Clin Neurol Neurosurg.* 99: 172-178.
- (78) SUHREN, O.; BRUYN, G. Y TYNMAN, J. (1966) Hyperekplexia. A hereditary startle syndrome. *J. Neurol. Sci.* 3: 577-605.
- (79) SAENZ-LOPE, E.; HERRANZ-TANARRO, F.J.; MASDEU, J.C. Y CHACÓN-PEÑA, J.R. (1984) Hyperekplexia: a syndrome of pathological startle responses. *Ann neurol.* 15: 36-41.

- (80) PRAVEEN, V.; PATOTE, S.K. Y WHITEHALL, J.S. (2001) Hyperekplexia in neonates. *Postgrad. Med. J.* 77: 570-572.
- (81) SHIANG, R.; RYAN, S.G.; ZHUY, Z.; HAHAN, A.F.; O'CONNELL, P. Y WASMUTH, J.J. (1993) Mutations in the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nature Gen.* 5: 351-358.
- (82) REES, M.I.; AANDREW, M.; JAWAD, S. Y OWEN, M.J. (1994) Evidence for recessive as well as dominant forms of startle disease (hyperekplexia) caused by mutations in the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor. *Hum. Mol. Genet.* 3: 2175-2179.
- (83) REES, M.I.; LEWIS, T.M.; KWOK, J.B.; PORTIER, G.R.; GOVAERT, P.; SNELL, R.G.; SCHOFIELD, P.R. Y OWEN, M.J. (2002) Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (*GLRB*). *Hum. Mol. Genet.* 11: 853-860.
- (84) REES, M.I.; WALDVOGEL, H.J.; WARD, H.; WHITE, J.H.; EVANS, L.; DUGUID, I.C. Y COL. (2003) Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (*GPHN*), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J. Biol. Chem.* 278: 24688-24699.
- (85) HARVEY, K.; DUGUID, I.C.; ALLDRED, M.J.; BEATTY, S.E.; WARD, H.; KEEP, N. H. Y COL. (2004) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J. Neurosci.* 24: 5816-5826.
- (86) MULHARDT, C.; FISCHER, M.; GASS, P.; SIMON-CHAZOTTES, D.; GUENET, J. L.; KUHSE, J.; BETZ, H. Y BECKER, C.M. (1994) The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron.* 13: 1003-1015.
- (87) SAUL, B.; SCHMIEDEN, V.; KLING, G.; MULHARDT, C.; GASS, P.; KHUSE, J. Y BEKER, C.M. (1994) Point mutation of glycine receptor alpha 1 subunit in the spasmodic mouse affects agonist responses. *FEBS Lett.* 350: 71-76.
- (88) BUCKWALTER, M.S.; COOK, S.A.; DAVISSON, M.T.; WHITE, W.F. Y CAMPER, S.A. (1994) A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (*Gla1*) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum. Mol. Genet.* 3: 2025-2030.
- (89) REES, M.I.; HARVEY, K.; PEARCE, B.R.; CHUNG, S.K.; DUGUID, I.C.; THOMAS, P. Y COL. (2006) Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nature Genet.* 38: 801-806.
- (90) EULENBURG, V.; BECKER, K.; GOMEZA, J.; SCHMITT, B.; BECKER, C.M. Y BETZ, H. (2006) Mutations within the human GLYT2 (SLC6A5) gene associated with hyperekplexia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 348: 400-405.

- (91) HARVEY, R.J.; CARTA, E.; PEARCE, B.R.; CHUNG, S.K.; SUPPLISSON, S.; REES, M.I. Y HARVEY, K. (2008) A critical role for glycine transporters in hyperexcitability disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 1: 1.
- (92) CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; ROLLIN, F.; DESMECHT, D.; AGERHOLM, J.S.; CAMBI-SANO, N.; CARTA, E.; DARDANO, S.; DIVE, M.; FASQUELLE, C.; Y COL. (2008) Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat. Genet.* 40: 449-454.
- (93) COYLE, J.T. (2006) Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26: 365-384.
- (94) JAVITT, D.C. (2004) Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry.* 9: 984-997.
- (95) MOHN, A.R.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G. Y KOLLER, B.H. (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell.* 98: 427-36.
- (96) TANG, Y.P.; WANG, H.; FENG, R.; KYIN, M. Y TSIEN, J.Z. (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology.* 41: 779-790.
- (97) TSAI, G.; LANE, H.Y.; YANG, P.; CHONG, M.Y. Y LANGE, N. (2004) Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55: 452-456.
- (98) SUR, C. Y KINNEY, G.G. (2007) Glycine transporter 1 inhibitors and modulation of NMDA receptor-mediated excitatory neurotransmission. *Curr. Drug Targets.* 8: 643-649.
- (99) JAVITT, D.C. (2008) Glycine transport inhibitors and the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 63: 6-8.
- (100) MELZACK, R. Y WALL, P.D. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science.* 150: 971-979.
- (101) ZEILHOFER, H.U. (2008) Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain—contributions of inflammation and microglia. *Int. Immunopharmacol.* 8: 182-187.
- (102) TANABE, M.; TAKASU, K.; YAMAGUCHI, S.; KODAMA, D. Y ONO, H. (2008) Glycine transporter inhibitors as a potential therapeutic strategy for chronic pain with memory impairment. *Anesthesiology.* 108: 929-937.
- (103) MORITA, K.; MOTOYAMA, N.; KITAYAMA, T.; MORIOKA, N.; KIFUNE, K. Y DOHI, T. (2008) Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326: 633-645.

6. Endocannabinoides: un nuevo sistema de comunicación en el cerebro

MANUEL GUZMÁN
E
ISMAEL GALVE-ROPERH

RESUMEN

La marihuana (*Cannabis sativa* L.) se ha empleado tanto médica como recreativamente desde hace muchos siglos. Sin embargo, la estructura química de sus componentes activos (los cannabinoides) no se dilucidó hasta los años 1960. Hoy en día sabemos que los cannabinoides actúan en el organismo a través de receptores específicos que son normalmente activados por una familia de moléculas endógenas denominadas endocannabinoides. Este sistema endocannabinoide regula críticamente la neurotransmisión en numerosas regiones del sistema nervioso central, actuando como una señal retroinhibidora para evitar el exceso de actividad presináptica. Estos y otros hallazgos han contribuido a una extraordinaria expansión en el conocimiento básico de cómo los (endo)cannabinoides actúan en nuestro organismo, así como al renacimiento del estudio tanto de sus propiedades terapéuticas como de sus acciones como sustancias de abuso.

Palabras clave: Cannabinoide. Receptor. Neuromodulación. Neurona. Glía.

ABSTRACT

Endocannabinoids: a new brain communication system

Marijuana (*Cannabis sativa* L.) has been used both medicinally and recreationally for many centuries. However, the chemical structure of its active ingredients (the cannabinoids) was not elucidated until the 1960s. Nowadays we

know that cannabinoids act in the body via specific receptors that are normally engaged by a family of endogenous molecules termed endocannabinoids. This endocannabinoid system is a key regulator of neurotransmission in many areas of the central nervous system, acting as a feedback signal that prevents excessive presynaptic activity. These and other findings have contributed to a great expansion in the basic knowledge of how (endo)cannabinoids act in our body, as well as to the renaissance of the study of both their therapeutic properties and their drug-of-abuse actions.

Keywords: Cannabinoid. Receptor. Neuromodulation. Neuron. Glia.

CANNABINOIDES

La marihuana (*Cannabis sativa* L.) es la única especie del reino vegetal que de manera bien establecida produce cannabinoides, una familia de moléculas bioactivas de la cual se conocen hoy en día más de setenta representantes diferentes (1). Aunque no se han estudiado con detalle las propiedades farmacológicas de la mayoría de estos compuestos, está ampliamente aceptado que el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC; Figura 1) es el más importante tanto por su alta abundancia en la planta como por su elevada potencia de acción (1, 2). Otros cannabinoides como el cannabinol y el cannabidiol pueden aparecer así mismo en niveles significativos en la planta y sus preparados, pero su potencia de acción es muy reducida. Desde los años 1990 sabemos que el THC ejerce su gran variedad de efectos, tanto en el sistema nervioso central como en distintas localizaciones periféricas del organismo, debido a que es similar a una familia de moléculas producida por numerosos animales, incluido el ser humano, y cuya

Abreviaturas: **AC**, adenilil ciclasa; **AEA**, *N*-araquidonoiletanolamina (anandamida); **2-AG**, 2-araquidonoilglicerol; **ATF-4**, factor activador de la transcripción 4 (*activating transcription factor 4*); **AMP**, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; **CHOP**, proteína homóloga a *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) (C/EBP homologue protein)*; **DAG**, *sn*-1,2-diacilglicerol; **DAGL**, *sn*-1-diacilglicerol lipasa; **ERK**, quinasa regulada por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*); **FAAH**, amidohidrolasa de ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*); **GABA**, ácido γ -aminobutírico; **iR**, receptor ionotrópico; **JNK**, quinasa del extremo *N*-terminal de *c-Jun (c-Jun N-terminal kinase)*; **MAGL**, monoacilglicerol lipasa; **mR**, receptor metabotrópico; **NAPE**, *N*-acilfosfatidiletanolamina; **NMDA**, *N*-metil-D-aspartato, **NT**, neurotransmisor; **PKA**, proteína quinasa A; **PLC**, fosfolipasa C; **PLD**, fosfolipasa D; **RIM-1 α** , molécula que interacciona con Rab3 1 α (*Rab3-interacting molecule-1*); **SM**, esfingomielina; **SMasa**, esfingomielinasa; **SPT**, serina palmitoiltransferasa; **THC**, Δ^9 -tetrahidrocannabinol; **TRB3**, homólogo de la proteína *tribbles 3 (tribbles homologue 3)*; **VSCC**, canal de Ca²⁺ sensible a potencial (*voltage-sensitive Ca²⁺ channel*).

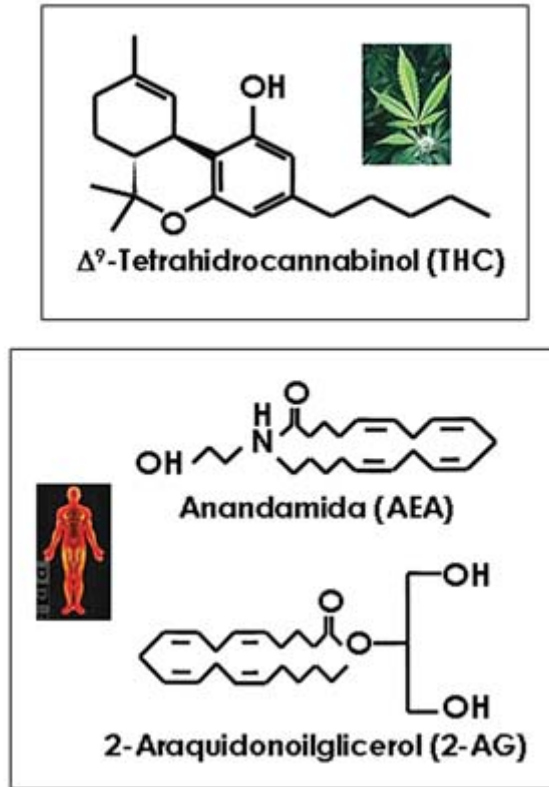


FIGURA 1. *Estructura química de los principales cannabinoides. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (principal fitocanabinoide) y la anandamida y el 2-araquidonoilglicerol (principales endocannabinoides).*

acción por tanto mimetiza. Estas moléculas se denominan por ello cannabinoides endógenos o endocannabinoides. Químicamente hablando se trata de derivados del ácido araquidónico, y la anandamida (*N*-araquidonoiletanolamina, AEA) (3) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (4,5) son sus principales representantes (Figura 1). Se han obtenido además en el laboratorio muy diversos análogos sintéticos de los cannabinoides naturales, tanto de la planta (fitocannabinoides) como de los endocannabinoides, que muestran una especificidad y potencia de acción mucho más elevadas, y entre cuyos representantes el WIN-55,212-2 y el HU-210 son quizás los actualmente más empleados como herramientas farmacológicas en la investigación sobre cannabinoides.

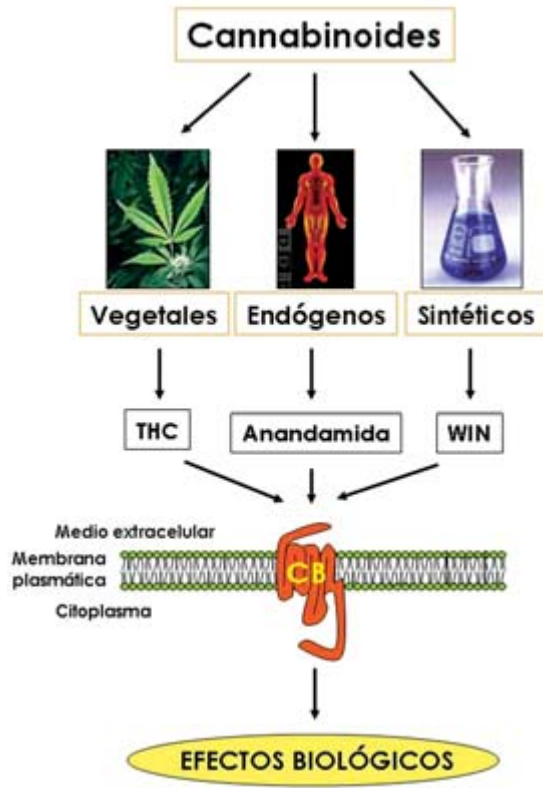


FIGURA 2. *Cannabinoides y sus receptores.* Los tres tipos de cannabinoides (vegetales, endógenos y sintéticos, cuyos ejemplos más representativos podrían ser THC, anandamida y WIN-55,212-2, respectivamente) se unen a los mismos receptores (receptores CB) en la superficie celular, y a través de ellos median sus efectos biológicos.

RECEPTORES DE CANNABINOIDES

Al ser compuestos estrechamente relacionados entre sí, los cannabinoides tanto endógenos como de *C. sativa* y sintéticos actúan en el organismo mediante las mismas dianas moleculares. Se trata de receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células que se denominan receptores de cannabinoides o receptores CB (Figura 2) y de los cuales existen hoy en día dos tipos bien caracterizados molecular y farmacológicamente: el receptor de tipo 1 ó receptor CB₁ (6) y el receptor de tipo 2 ó receptor CB₂ (7). Es posible no obstante que existan en el organismo otros receptores, como GPR55 (8) o TRPV1 (9), que medien algunas ac-

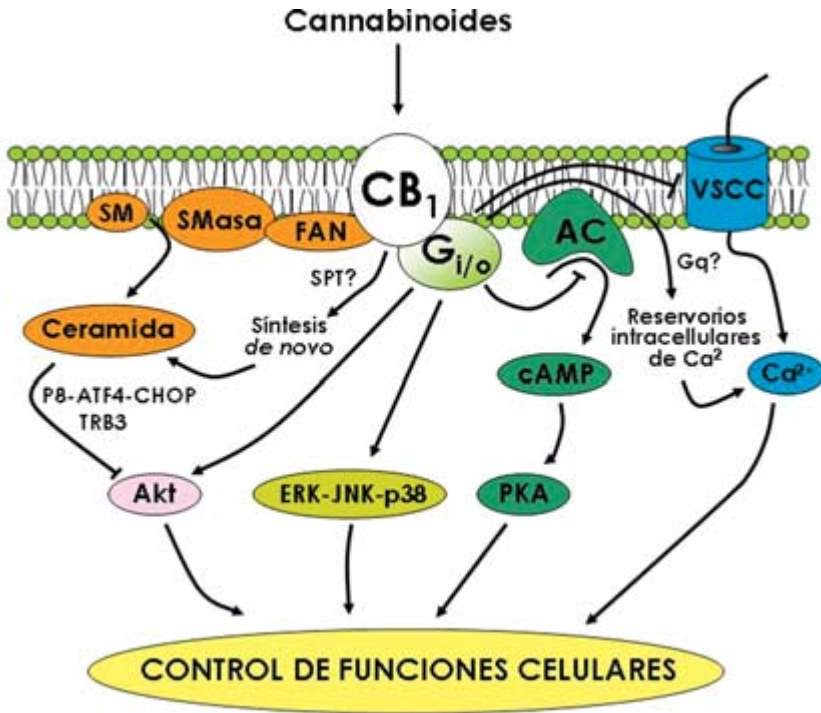


FIGURA 3. *Mecanismos de señalización acoplados al receptor CB₁ cannabinoide.* Los cannabinoides ejercen sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G, principalmente G_{i/o}. En concreto, el receptor CB₁ cannabinoide regula una gran variedad de sistemas de señalización celular. Entre estos efectos se incluyen los siguientes: (i) la inhibición de la vía de la adenilil ciclasa (AC)-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)-proteína quinasa A (PKA); (ii) el control de la concentración citoplasmática de Ca²⁺ libre, tanto por cierre de canales iónicos de membrana plasmática [por ejemplo canales de Ca²⁺ sensibles a potencial (voltage-sensitive Ca²⁺ channels, VSCC)] como por salida de Ca²⁺ de reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico (probablemente vía proteínas G_q); (iii) la activación de cascadas de proteína quinasa activadas por mitógenos como ERK (quinasa regulada por señales extracelulares; extracellular signal-regulated kinase), JNK (quinasa del extremo N-terminal de c-Jun; c-Jun N-terminal kinase) y p38; (iv) la generación del esfingolípido ceramida a través de dos posibles mecanismos: la hidrólisis de esfingomielina (SM) vía activación de una esfingomielinasa (SMasa), con la posible participación de la proteína adaptadora FAN, y la síntesis de novo de ceramida, probablemente vía inducción de la serina palmitoiltransferasa (SPT); en las células tumorales, la acumulación de ceramida induce una respuesta de estrés de retículo endoplásmico que desencadena la inducción sucesiva de los factores de transcripción p8, ATF-4 (factor activador de la transcripción 4; activating transcription factor 4) y CHOP [proteína homóloga a CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP); C/EBP homologue protein] y de la pseudoquinasa TRB3 (homólogo de la proteína tribbles 3; tribbles homologue 3); (v) la modulación de la quinasa de supervivencia Akt, tanto directamente a través de la señalización dependiente de proteínas G_{i/o} acopladas al receptor CB₁ como a través de la interacción con TRB3. Todos estos y otros mecanismos de señalización participan en el control de la funcionalidad celular por cannabinoides.

ciones de los (endo)cannabinoides. Los receptores CB_1 y CB_2 pertenecen a la principal clase de receptores del organismo (los receptores acoplados a proteínas G) y se acoplan principalmente a proteínas $G_{i/o}$, aunque también se ha descrito que en algunas situaciones pueden señalizar vía proteínas G_q (10, 11). A través de ambas, estos receptores modulan rutas de señalización intracelular de gran importancia como la vía de la adenilil ciclasa (AC)-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)-proteína quinasa A (PKA), cascadas de proteína quinasas activadas por mitógenos como ERK (quinasa regulada por señales extracelulares; *extracellular signal-regulated kinase*), la generación del esfingolípido ceramida y la vía de la quinasa Akt (10-12). Éstos y otros mecanismos de señalización, que se detallan en la Figura 3, participan en el control de la funcionalidad celular por el sistema endocannabinoide.

Como parece lógico suponer, únicamente los tejidos del organismo que poseen receptores específicos para cannabinoides son blanco de la acción de estos compuestos. En concreto, la mayor parte de los efectos de los cannabinoides, tanto sobre el sistema nervioso central como sobre diversas localizaciones periféricas, están mediados por el receptor CB_1 , inicialmente denominado «receptor central de cannabinoides» pero que hoy sabemos posee una localización muy ubicua. Este receptor es especialmente abundante en áreas del sistema nervioso central implicadas en el control de la actividad motora (ganglios basales, cerebelo), memoria y aprendizaje (corteza, hipocampo), emociones (amígdala), percepción sensorial (tálamo) y diversas funciones autónomas y endocrinas (hipotálamo, médula), lo que lógicamente explica que los endocannabinoides modulen estos procesos y que el consumo de marihuana interfiera con ellos (10, 11) (Figura 4). El receptor CB_1 está presente también en las terminales nerviosas periféricas que inervan tanto la piel como los tractos digestivo, circulatorio y respiratorio, así como en numerosos tejidos y órganos como endotelio vascular, hueso, testículo, útero, ojo, hígado y tejido adiposo.

El receptor CB_2 , inicialmente denominado «receptor periférico de cannabinoides», muestra una distribución más restringida que receptor CB_1 , y está fundamentalmente presente en el sistema inmune, tanto en células (por ejemplo, linfocitos y macrófagos) como en tejidos (por ejemplo, bazo, apéndice y ganglios). Se piensa por ello que este receptor está implicado en la modulación de la respuesta inmune por el sistema endocannabinoide (10, 13).

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Los endocannabinoides, junto con sus receptores y sistemas específicos de síntesis y degradación, constituyen en el organismo el denominado sistema en-

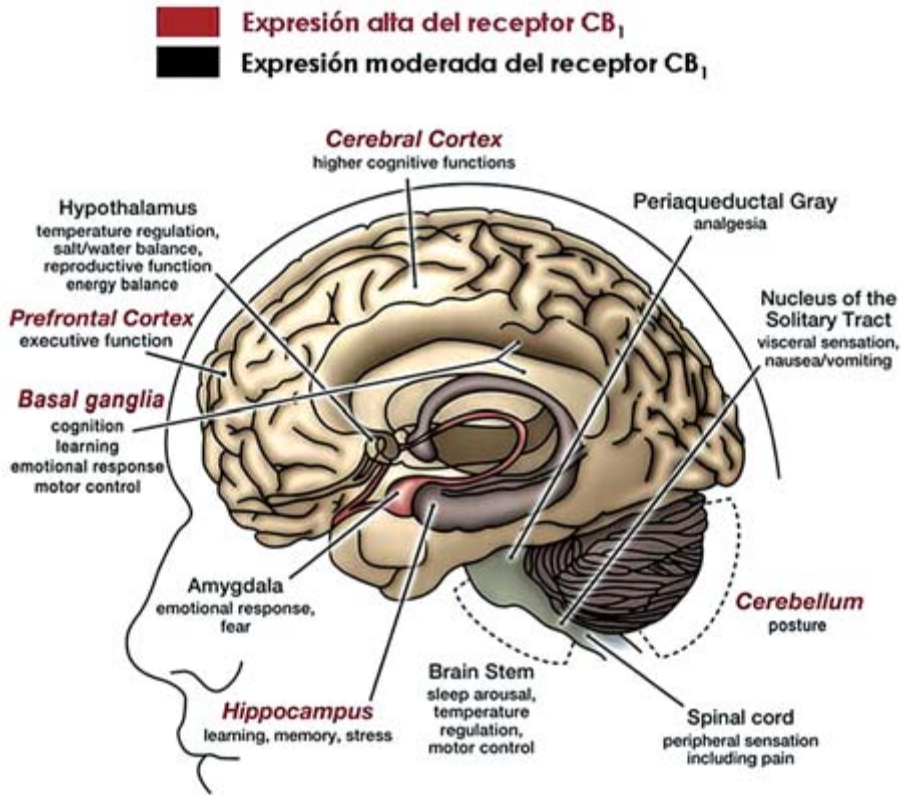


FIGURA 4. *Expresión del receptor CB₁ cannabinoide en distintas regiones del sistema nervioso central. El receptor CB₁ cannabinoide constituye uno de los receptores más abundantes del sistema nervioso central, y se halla expresado en muy distintos tipos de neuronas de prácticamente todas sus regiones. Es particularmente abundante en el hipocampo (donde controla los procesos de aprendizaje y memoria), la corteza (donde controla el procesamiento de información cognitiva), el cerebelo (donde controla la actividad motora) y los ganglios basales (donde controla el comportamiento motor y otros procesos muy diversos). Además, en la amígdala modula las emociones, en el tronco cerebral y la médula espinal controla la respuesta nociceptiva, en el sistema mesolímbico dopaminérgico participa en los procesos motivacionales y de recompensa, en el hipotálamo regula la ingesta, etc. Original disponible en <http://www.endocannabinoid.net>.*

docannabinoide o sistema cannabinoide endógeno. Este sistema (o al menos parte de sus componentes) aparece de forma altamente conservada en la gran mayoría de animales, al menos en todos los deuteróstomos, y su función hasta ahora mejor establecida es la de constituir un mecanismo de neuromodulación en el sistema nervioso central de los mamíferos (14, 15). Así, cuando se activan receptores de neurotransmisores en la membrana plasmática de una neurona

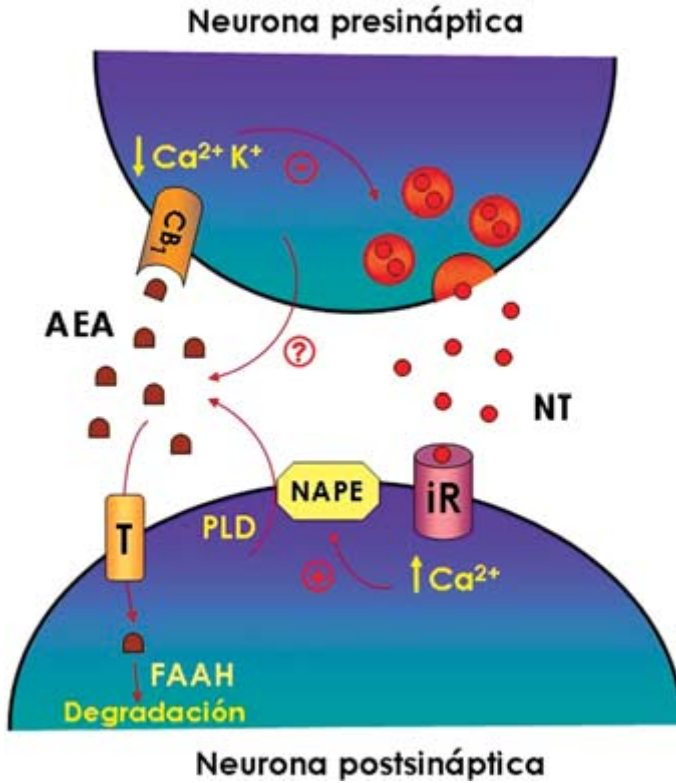


FIGURA 5. **Papel neuromodulador de la anandamida.** La ocupación de receptores postsinápticos de diversos neurotransmisores (NT), particularmente receptores ionotrópicos (iR) de glutamato, eleva la concentración citoplasmática de Ca^{2+} libre, lo cual induce (i) la activación de N-aciltransferasas que generan precursores fosfolipídicos de anandamida (AEA) como la N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) y (ii) la subsecuente hidrólisis de NAPE por diversas lipasas, entre las que destaca una fosfolipasa D (PLD) de NAPE. Se ha descrito así mismo la localización presináptica de la NAPE-PLD, lo que implicaría la posible generación presináptica de AEA (señalada con interrogación). La AEA actúa sobre receptores CB_1 presinápticos, que están acoplados al cierre de canales de Ca^{2+} sensibles a potencial y a la apertura de canales rectificadores de K^+ . Ello hiperpolariza la membrana plasmática e inhibe la secreción de NTs. La acción de la AEA finaliza mediante la recaptura por un sistema de transporte de membrana (T) aún no completamente caracterizado y una familia de enzimas intracelulares entre las que destaca la amidohidrolasa de ácidos grasos (fatty acid amide hydrolase, FAAH), de localización preferentemente postsináptica y que degrada la AEA a ácido araquidónico y etanolamina. +, activación; -, inhibición.

postsináptica, ésta sintetiza precursores de endocannabinoides y los escinde para liberar a la hendidura sináptica endocannabinoides funcionalmente activos. Esto acontece, por ejemplo, tras la unión de algunos neurotransmisores como el glu-

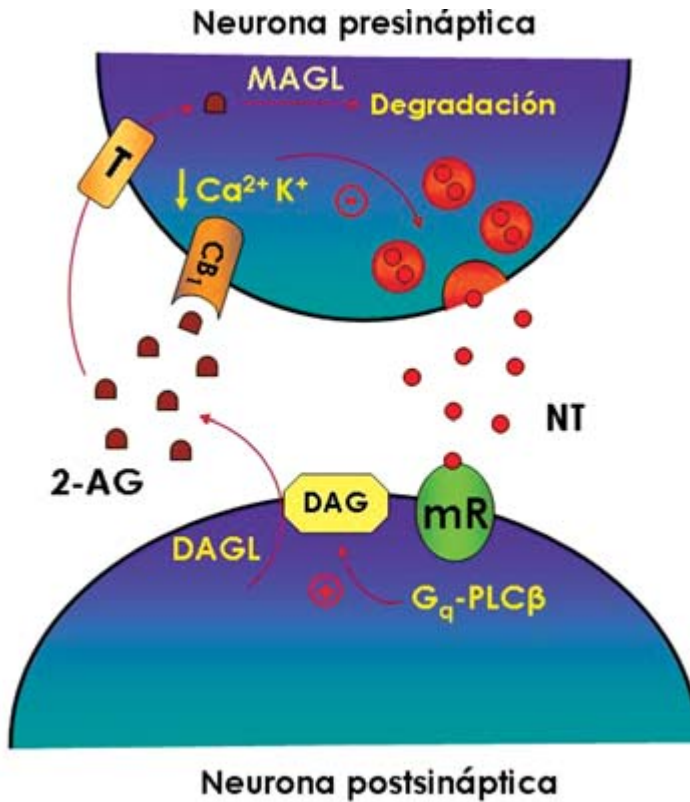


FIGURA 6. **Papel neuromodulador del 2-araquidonoilglicerol.** La ocupación de receptores postsinápticos de diversos neurotransmisores (NT), particularmente receptores metabotrópicos (mR) de glutamato, induce (i) la disociación de proteínas G_q heterotriméricas y (ii) la activación de la fosfolipasa $C\beta$, ($PLC\beta$), que hidroliza precursores fosfolipídicos de membrana como el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato para rendir *sn*-1,2-diacilgliceroles (DAG), entre ellos los que poseen un grupo araquidonoilo en posición *sn*-2. Éstos son hidrolizados por la *sn*-1-diacilglicerol lipasa (DAGL) para generar 2-araquidonoilglicerol (2-AG). El 2-AG actúa sobre receptores CB_1 presinápticos, que están acoplados al cierre de canales de Ca^{2+} sensibles a potencial y a la apertura de canales rectificadores de K^+ . Ello hiperpolariza la membrana plasmática e inhibe la secreción de NTs. La acción del 2-AG finaliza mediante la recaptura por un sistema de transporte de membrana (T) aún no caracterizado y una familia de enzimas intracelulares entre las que destaca la monoacilglicerol lipasa (MAGL), de localización preferentemente presináptica y que degrada 2-AG a ácido araquidónico y glicerol. +, activación; -, inhibición.

tamato a sus receptores ionotrópicos o metabotrópicos. Los endocannabinoides actúan entonces como mensajeros químicos retrógrados, esto es, se unen a receptores CB_1 de la neurona presináptica, lo que conlleva por ejemplo que se dificulte la entrada de iones Ca^{2+} (por cierre de canales de Ca^{2+} sensibles a po-

tencial; VSCCs, *voltage-sensitive Ca²⁺ channels*) y se facilite la salida de iones K⁺ (por la apertura de canales rectificadores de K⁺ sensibles a proteínas G). Ello impide la despolarización de la membrana y los procesos exocitosis, y así se bloquea la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el ácido γ -aminobutírico (GABA). La acción neuromoduladora de los endocannabinoides finaliza mediante su recaptura celular a través de sistemas de transporte de membrana plasmática y su posterior degradación intracelular, que corre a cargo de una variada familia de lipasas entre las cuales la amidohidrolasa de ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*, FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) son las mejor caracterizadas para la AEA y el 2-AG, respectivamente. En las Figuras 5 y 6 se detallan las características de los procesos de señalización retrógrada en los que participan la AEA y el 2-AG.

El receptor CB₁ cannabinoide es en general uno de los tipos de receptores más altamente expresados en el sistema nervioso central y, en concreto, el receptor presináptico acoplado a proteínas G más abundante en el cerebro adulto, hallándose presente en muy distintos tipos de neuronas de prácticamente todas las regiones de este órgano (Figura 4). La localización presináptica del receptor CB₁ cannabinoide fue mostrada por vez primera en terminales axonales de interneuronas hipocampales, y hoy en día se conocen numerosos ejemplos de otras neuronas GABAérgicas (por ejemplo, corticales y estriatales), así como glutamatérgicas (por ejemplo, corticales, hipocampales, hipotalámicas y cerebelares) o de vías subcorticales ascendentes (por ejemplo, terminales colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas), que expresan altas cantidades de receptores CB₁ presinápticos (15). Aunque el resultado global de la activación de dichos receptores es la retroinhibición de la liberación de neurotransmisores y la consiguiente atenuación de la transmisión sináptica, el curso temporal en el que tiene lugar este proceso divide los efectos de los endocannabinoides sobre la plasticidad sináptica en dos grandes tipos, que pueden además poseer distintas implicaciones patofisiológicas (16). Así, la depresión sináptica a corto plazo se inicia muy rápidamente (< 1 s) y su duración es muy corta (s-min), mientras que la depresión sináptica a largo plazo requiere periodos más largos de inducción (s-min) y su duración es más larga (h). Aunque ambos procesos están mediados por la activación de receptores CB₁ presinápticos, los mecanismos señalizadores responsables de cada uno de ellos son diferentes. Así, la depresión a corto plazo suele implicar la inhibición de canales de Ca²⁺ y la apertura de canales de K⁺ en la membrana plasmática (Figuras 5 y 6), mientras que la depresión a largo plazo depende de la inhibición de la vía AC-cAMP-PKA (Figura 3) y consecuentemente de la inactivación de algunas proteínas blanco de esta ruta como RIM-1 α (molécula que interacciona con Rab3 1 α ; *Rab3-interacting molecule-1 α*).

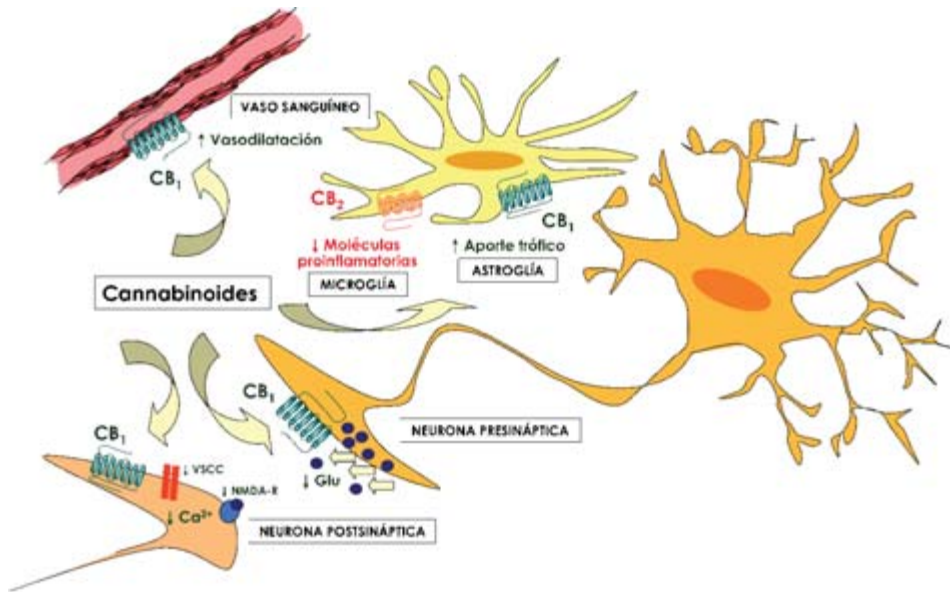


FIGURA 7. *Expresión de receptores cannabinoides en distintas localizaciones celulares del sistema nervioso central.* Los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados y controlan a través de receptores CB₁ presinápticos la liberación de neurotransmisores como el glutamato (ver más detalles en las Figuras 5 y 6). Se ha descrito además la existencia de receptores CB₁ postsinápticos, cuya activación inhibiría la actividad de canales de Ca²⁺ sensibles a potencial (voltage-sensitive Ca²⁺ channels, VSCC) y de receptores ionotrópicos de glutamato (tipo N-metil-D-aspartato, NMDA). Los receptores CB₁ se expresan también en astrocitos, donde podrían controlar el aporte de nutrientes a las neuronas, así como en células del endotelio vascular, donde su activación induce vasodilatación. Por último, los receptores CB₂ cannabinoides se expresan en células de microglía, donde median la inactivación de dichas células y por tanto un descenso en la liberación de moléculas proinflamatorias. Figura original cortesía del Prof. Javier Fernández-Ruiz y la Dra. Sara González (Universidad Complutense de Madrid).

Además de esta localización característica en terminales presinápticas, se ha descrito la existencia de receptores CB₁ en neuronas postsinápticas, cuya activación inhibiría la actividad de VSCCs y de receptores ionotrópicos de glutamato (tipo N-metil-D-aspartato, NMDA) (Figura 7). En el cerebro los receptores CB₁ se expresan también en astrocitos, donde podrían controlar el aporte de nutrientes a las neuronas y mediar procesos de intercomunicación sináptica entre ambos tipos de células, así como en células del endotelio vascular, donde su activación induce vasodilatación. Por último, los receptores CB₂ cannabinoides se expresan en células de microglía, donde median la inactivación de dichas células y por tanto un descenso en la liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que conlleva a su vez una atenuación de la respuesta inflamatoria.

nuación de los procesos neuroinflamatorios (17, 18) (Figura 7). Todos estos efectos complementan la acción de mensajeros retrógrados que ejercen los cannabinoides sobre la plasticidad sináptica y la funcionalidad neuronal.

El sistema endocannabinoide no sólo se expresa en el sistema nervioso adulto, sino que también lo hace en el cerebro en desarrollo, en el cual evidencia un patrón de distribución «atípico», ya que, por ejemplo, durante etapas prenatales los receptores CB₁ abundan en células progenitoras neurales y en proyecciones axonales que conforman áreas de sustancia blanca (19, 20). Estudios recientes sugieren que, durante el desarrollo cerebral, el sistema endocannabinoide controla procesos esenciales como la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de células neurales, así como la elongación y fasciculación de axones y la formación de conexiones sinápticas durante el establecimiento de los patrones morfogenéticos del sistema nervioso (20). Una reminiscencia de ese papel del sistema endocannabinoide durante el desarrollo podría ser su presencia y actividad funcional en células progenitoras residentes en regiones neurogénicas del cerebro adulto como la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo (21).

POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS CANNABINOIDES

La marihuana y sus preparados se han empleado en medicina desde hace al menos cincuenta siglos. Además, los descubrimientos recientes en el conocimiento del sistema endocannabinoide han contribuido al renacimiento del estudio de sus posibles propiedades terapéuticas, lo que constituye hoy en día un campo de amplio debate científico y clínico (22, 23). Con base en la demostración de la función moduladora que los endocannabinoides ejercen sobre numerosas funciones cerebrales, se ha sugerido el potencial terapéutico que la manipulación farmacológica de sus niveles o la administración de agonistas cannabinoides (bien fitocannabinoides, bien cannabinoides sintéticos) podría tener en el tratamiento de diversas patologías que afectan al sistema nervioso. En algunas de estas enfermedades ya se ha podido poner de manifiesto que existen cambios en la expresión de receptores cannabinoides y/o en los niveles de endocannabinoides en ciertas zonas del cerebro, lo que justificaría el estudio farmacológico de este sistema (22, 23). Por ejemplo, y de forma general, los cannabinoides ejercen efectos analgésicos que los harían de utilidad en el tratamiento del dolor (24). También podrían ser útiles en el tratamiento de los procesos de neuroinflamación, en la que su administración permitiría paliar algunas consecuencias típicas de dichos desórdenes (18). Hoy en día sabemos ade-

más que, bajo determinadas circunstancias, los cannabinoides son capaces de proteger a las neuronas frente a diversas situaciones de daño, lo que podría tener interés para el tratamiento de episodios de daño cerebral agudo y quizás de enfermedades neurodegenerativas (25, 26). Su participación en los procesos de memoria y aprendizaje hace pensar que los cannabinoides podrían ser de utilidad en trastornos como la extinción de memorias aversivas en situaciones de estrés post-traumático (27). Análogamente, la presencia de receptores de cannabinoides en regiones del sistema límbico y el hipotálamo anterior permitiría que en este caso el bloqueo de dichos receptores pueda ser una aproximación farmacológicamente relevante en el tratamiento de trastornos alimentarios y metabólicos (28) y de fenómenos compulsivos relacionados con la adicción a drogas (29, 30).

A pesar de todo ello, la utilización clínica de los cannabinoides y otros compuestos que afectan a la señalización cannabínérgica es hoy en día bastante restrictiva. En la actualidad se permite en algunos países la prescripción de cápsulas de THC (Marinol[®]) y del cannabinoide sintético nabilona (Cesamet[®]), así como la dispensa de marihuana medicinal, para inhibir la náusea y el vómito y estimular el apetito en pacientes de sida o cáncer tratados con agentes quimioterapéuticos emetógenos (12, 31). Entre otros posibles usos de los cannabinoides, cuyo estudio se encuentra en su mayoría en fase III de ensayos clínicos, podríamos destacar el tratamiento del dolor (el Sativex[®], un aerosol oro-mucosal que contiene THC y cannabidiol, ha sido registrado recientemente en Canadá para el tratamiento del dolor neuropático asociado a la esclerosis múltiple y el dolor oncológico resistente a opioides) (32), la atenuación de los trastornos del movimiento (espasmos y temblores) asociados a la esclerosis múltiple (32) y la recuperación neurológica posterior a un traumatismo craneal (33). Por otro lado, un antagonista selectivo de los receptores CB₁ (Acomplia[®]) ha sido aprobado en la Unión Europea como tratamiento adyuvante (junto con la dieta y el ejercicio físico) de la obesidad (34). En la Figura 8 se detallan los medicamentos hoy en día disponibles basados en cannabinoides y el estado de las principales investigaciones clínicas sobre estos compuestos.

No debemos olvidar en cualquier caso que, aunque los cannabinoides sean sustancias bastante seguras en el contexto de su aplicación clínica, su uso médico está en parte dificultado por sus efectos psicoactivos no deseados, entre los que se incluyen los de tipo afectivo (euforia), somático (somnia, descoordinación motora), sensorial (alteraciones en la percepción temporal y espacial, desorientación) y cognitivo (lapsos de memoria, confusión) (23, 35). Aunque dichos efectos secundarios puedan ser transitorios y estar dentro de los márgenes



EFFECTO	POSIBLE APLICACIÓN TERAPÉUTICA (fase)
Inhibición de la emesis y estimulación del apetito	Quimioterapia de cáncer y sida (Marinol, Cesamet y marihuana medicinal aprobados)
Analgesia	Dolor (fase III con THC; Sativex aprobado)
Hipomotilidad y antiespasticidad	Esclerosis múltiple (fase III con THC y Sativex)
Neuroprotección	Traumatismo craneal e ictus (fase III con dexamabinol)
Inhibición de la ingesta y aumento del catabolismo	Obesidad (Acomplia aprobado)

FIGURA 8. *Posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides.* El efecto terapéutico mejor establecido hoy en día de los cannabinoides es la inhibición de la náusea y el vómito en pacientes de cáncer y sida tratados con agentes quimioterapéuticos. Los cannabinoides también pueden aumentar el apetito, inhibir el dolor, atenuar los trastornos del movimiento (espasmos y temblores) asociados a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple y quizás ser agentes neuroprotectores. Por otro lado, el bloqueo de los receptores CB₁ podría ser de utilidad terapéutica en el tratamiento de la obesidad y trastornos metabólicos.

aceptados para otros medicamentos, está claro que al menos para determinados pacientes y patologías sería deseable diseñar cannabinoides que carecieran de acciones psicotrópicas. Puesto que éstas dependen de los receptores CB₁ centrales, la opción más lógica es evitar la activación de dichos receptores (siempre que la patología en cuestión lo haga viable). Así, se está intentando diseñar compuestos que se unan selectivamente al receptor CB₂ o compuestos que no atraviesen la barrera hematoencefálica y por tanto no alcancen el sistema nervioso central (22, 23). Por otro lado, la administración a animales de experimentación de inhibidores de la degradación (recaptura o hidrólisis intracelular) de endocannabinoides ha permitido conseguir la elevación de los niveles de estos compuestos en contextos espacio-temporales restringidos y de esta manera la inducción de efectos bradiquinésicos, ansiolíticos o analgésicos sin efectos se-

cundarios notorios (36). Este tipo de compuestos no ha sido aún objeto de ensayos clínicos.

La comunidad científica se encuentra hoy en día en un punto en el cual se ha acumulado un conocimiento relativamente bueno de cómo actúan molecularmente los (endo)cannabinoides en el organismo y de cuáles pueden ser algunas de sus aplicaciones terapéuticas más inmediatas. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigación básica más profunda y ensayos clínicos más exhaustivos para comprender más sólidamente la función biológica y relevancia terapéutica de estos nuevos mensajeros químicos de nuestro organismo.

AGRADECIMIENTOS

La investigación de nuestro grupo está actualmente financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto SAF2006-00918), la Comunidad de Madrid (proyecto SAL2006/261) y la Universidad Complutense de Madrid (proyecto 950344). Agradecemos a todos nuestros compañeros de laboratorio su excelente labor y constante apoyo.

REFERENCIAS

- (1) PERTWEE, R.G. (2008) The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol.* 153: 199-215.
- (2) GAONI, Y. Y MECHOULAM, R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646-1647.
- (3) DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A. Y MECHOULAM, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258: 1946-1949.
- (4) MECHOULAM, R.; BEN SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N.E.; SCHATZ, A.R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B.R.; COMPTON, D.R.; PERTWEE, R.G.; GRIFFIN, G.; BAYEWITCH, M.; BARG, J. Y VOGEL, Z. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50: 83-90.
- (5) SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A. Y WAKU, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 89-97.

- (6) MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J.; BROWNSTEIN, M.J.; YOUNG, A.C. Y BONNER, T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346: 561-564.
- (7) MUNRO, S.; THOMAS, K.L. Y ABU SHAAR, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365: 61-65.
- (8) PERTWEE, R.G. (2007) GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* 152: 984-986.
- (9) STAROWICZ, K.; CRISTINO, L. Y DI MARZO, V. (2008) TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* 14: 42-54.
- (10) HOWLETT, A.C.; BARTH, F.; BONNER, T.I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W.A.; FELDER, C.C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN, B.R.; MECHOULAM, R. Y PERTWEE, R.G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54: 161-202.
- (11) MACKIE, K. (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286: S60-S65.
- (12) GUZMÁN, M. (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 3: 745-755.
- (13) KLEIN, T.W. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 400-411.
- (14) PIOMELLI, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 873-884.
- (15) KATONA, I. Y FREUND, T.F. (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14: 923-930.
- (16) CHEVALEYRE, V.; TAKAHASHI, K.A. Y CASTILLO, P.E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 37-76.
- (17) FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ROMERO, J.; VELASCO, G.; TOLÓN, R.M.; RAMOS, J.A. Y GUZMÁN, M. (2007) Cannabinoid CB₂ receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* 28: 39-45.
- (18) BAKER, D.; JACKSON, S.J. Y PRYCE, G. (2007) Cannabinoid control of neuroinflammation related to multiple sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* 152: 649-654.
- (19) FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNÁNDEZ, M.L. Y RAMOS, J.A. (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.* 23: 14-20.
- (20) HARKANY, T.; GUZMÁN, M.; GALVE-ROPERH, I.; BERGHUIS, P.; DEVI, L.A. Y MACKIE, K. (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol. Sci.* 28: 83-92.

- (21) GALVE-ROPERH, I.; AGUADO, T.; PALAZUELOS, J. Y GUZMÁN, M. (2007) The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist*. 13: 109-114.
- (22) MACKIE, K. (2006) Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 101-122.
- (23) PACHER, P.; BATKAI, S. Y KUNOS, G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 389-462.
- (24) HOHMANN, A.G. Y SUPLITA, R.L. (2006) Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 8: E693-E708.
- (25) MECHOULAM, R. Y SHOHAMI, E. (2007) Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* 36: 68-74.
- (26) GALVE-ROPERH, I.; AGUADO, T.; PALAZUELOS, J. Y GUZMÁN, M. (2008) Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr. Pharm. Des.* 14: 2279-2288.
- (27) LUTZ, B. (2007) The endocannabinoid system and extinction learning. *Mol. Neurobiol.* 36: 92-101.
- (28) JESUDASON, D. Y WITTEG, G. (2008) Endocannabinoid system in food intake and metabolic regulation. *Curr. Opin. Lipidol.* 19: 344-348.
- (29) MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Y BERRENDERO, F. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29: 225-232.
- (30) COLOMBO, G.; ORRÙ, A.; LAI, P.; CABRAS, C.; MACCIONI, P.; RUBIO, M.; GESSA, G.L. Y CARAI, M.A. (2007) The cannabinoid CB₁ receptor antagonist, rimonabant, as a promising pharmacotherapy for alcohol dependence: preclinical evidence. *Mol. Neurobiol.* 36: 102-112.
- (31) SLATKIN, N.E. (2007) Cannabinoids in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: beyond prevention of acute emesis. *J. Support. Oncol.* 5: 1-9.
- (32) SMITH, P.F. (2007) Symptomatic treatment of multiple sclerosis using cannabinoids: recent advances. *Expert Rev. Neurother.* 7: 1157-1163.
- (33) MAAS, A.I.; MURRAY, G.; HENNEY, H.; KASSEM, N.; LEGRAND, V.; MANGELUS, M.; MUIZELAAR, J.P.; STOCCHETTI, N.; KNOLLER, N. Y PHARMOS TBI INVESTIGATORS (2006) Efficacy and safety of dexanabinol in severe traumatic brain injury: results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial. *Lancet Neurol.* 5: 38-45.
- (34) WRIGHT, S.M.; DIKKERS, C. Y ARONNE, L.J. (2008) Rimonabant: new data and emerging experience. *Curr. Atheroscler. Rep.* 10: 71-78.
- (35) IVERSEN, L. (2005) Long-term effects of exposure to cannabis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 69-72.
- (36) DI MARZO, V. (2008) Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 438-455.