

FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

NEUROBIOLOGÍA DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y CONDUCTA SUICIDA

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

Autor: María Albert Sogorb

Modalidad: Experimental

Tutor/es: María Salud García Gutiérrez y Jorge Manzanares Robles

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. ANTECEDENTES	4
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. MUESTRAS	12
3.2. DISECCIÓN CEREBRAL	14
3.3. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN (<i>RNA INTEGRITY NUMBER - RIN</i>)	14
3.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL RCB ₂ , ISOFORMA A, MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR)	15
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
4. RESULTADOS	17
4.1. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN TOTAL EN EL TEJIDO CONGELADO DE LA CÓRTEX PREFRONTAL Y AMÍGDALA DE S Y C: NÚMERO INTEGRIDAD DEL ARN (RIN)	17
4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL RCB ₂ , ISOFORMA A, EN LA DLPFC Y AMY DE S Y C MEDIANTE RT-PCR	19
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

RESUMEN

El suicidio representa una de las principales causas de muerte en todas las edades y supone un importante problema de salud pública. Durante los últimos años diversas investigaciones se han centrado en caracterizar las alteraciones neuroquímicas que subyacen a la conducta suicida con el objetivo de identificar potenciales biomarcadores que ayuden a prevenirla.

Diferentes estudios han demostrado el papel del receptor cannabinoide CB₂ (rCB₂) en la respuesta al estrés, ansiedad y depresión. Teniendo en cuenta la estrecha relación entre diferentes trastornos afectivos y la conducta suicida, el objetivo del presente trabajo consiste en investigar las potenciales alteraciones del rCB₂ en sujetos suicidas.

Para ello, se analizó la expresión del gen del rCB₂, isoforma A, en la corteza prefrontal dorsolateral (DLPFC) y en la amígdala (AMY) de sujetos suicidas (S; n=18) sin historia previa de patologías psiquiátricas y sin previo tratamiento farmacológico, y sus correspondientes controles (C; n=15) mediante la técnica PCR a tiempo real (Rt-PCR). Los resultados muestran una reducción estadísticamente significativa del rCB₂ en DLPFC (-30%) y AMY (-40%) de los S en comparación con sus respectivos C.

Estos hallazgos suponen un paso más en la caracterización del rCB₂ y refuerzan su función en la regulación de las respuestas emocionales. Futuros estudios son necesarios para evaluar la potencial utilidad terapéutica del rCB₂ en el tratamiento y/o prevención de la conducta suicida.

1. ANTECEDENTES

El suicidio representa una de las principales causas de muerte en todas las edades y supone un importante problema de salud pública. Se estima que 1,5 millones de personas fallecerán por suicidio en 2020 en todo el mundo¹, un dato alarmante que justifica la necesidad de investigar esta patología con el fin de prevenirla.

La conducta suicida puede aparecer como consecuencia de factores genéticos, eventos adversos, traumas o situaciones de estrés, y suele asociarse a trastornos mentales que incluyen desórdenes afectivos, esquizofrenia o abuso de sustancias. Concretamente, los trastornos del ánimo incrementan en un 20% el riesgo de suicidio. Aproximadamente el 50% de los casos de suicidio padecen un trastorno de depresión mayor, el 15-20% padece trastornos de ansiedad, mientras que un reducido número de casos no presenta historia clínica de patologías psiquiátricas², lo cual apunta a que este comportamiento también puede darse en personas sanas.

En los últimos años, diversos estudios postmortem se han centrado en esclarecer las alteraciones neurobiológicas que subyacen al comportamiento suicida³. Los resultados demuestran la implicación de diferentes sistemas neuromoduladores como los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico⁴⁻⁶. Recientemente, resultados preliminares destacan la potencial implicación de otro sistema neuromodulador, el sistema endocannabinoide (SEC), que es capaz de regular gran variedad de procesos fisiológicos del organismo y que se ha visto implicado en numerosas patologías psiquiátricas.

Este sistema se compone de diferentes ligandos endógenos, receptores, enzimas de síntesis y degradación. Existen dos grandes familias de cannabinoides endógenos (CE), la N-araquidoniletanolamina (anandamida; AEA)⁷ y el 2-araquidonilglicerol (2-AG)^{8, 9}. Tanto el sistema de transporte de estos ligandos como los procesos implicados en su síntesis y metabolismo son independientes. La AEA es sintetizada por la acción de la enzima fosfodiesterasa selectiva de N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), mientras que el 2-AG se sintetiza por la acción de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL). Asimismo, la AEA es metabolizada por la acción de la enzima amidohidrolasa

de ácidos grasos (FAAH) localizada en neuronas postsinápticas^{10, 11}, por el contrario, el 2-AG es metabolizado en la neurona presináptica mediante la acción de la monoacilglicerol lipasa (MAGL)¹²⁻¹⁵ (**Figura 1**).

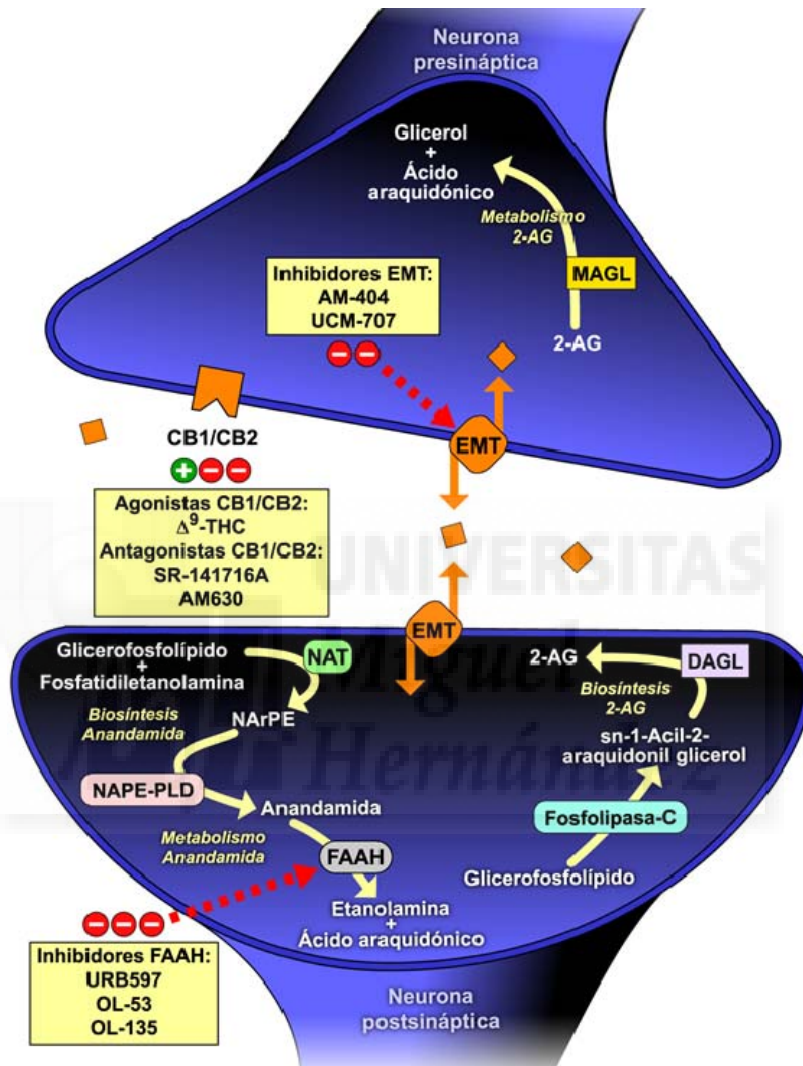


Figura 1. Caracterización del SCE

MAGL: enzima monoacilglicerol lipasa, 2-AG: 2-araquidonilglicerol, EMT: sistema de transporte de cannabinoides endógenos, NAT: enzima N-aciltransferasa, NArPE: N-araquidonil-fosfatidiletanolamina, NAPE-PLD: enzima fosfodiesterasa selectiva de N-acil-fosfatidiletanolamina, FAAH: enzima amidohidrolasa de ácidos grasos, DAGL: enzima diacilglicerol lipasa.

La síntesis y liberación de los CE se produce en respuesta a cambios en la actividad neuronal¹⁶⁻¹⁸, a diferencia de la mayoría de neurotransmisores (NT) que son sintetizados y almacenados en vesículas sinápticas hasta su liberación. Una vez liberados, actúan como NT retrógrados a nivel sináptico y se unen a receptores específicos acoplados a proteínas G para ejercer su acción¹⁹: el receptor cannabinoide CB₁ (rCB₁) y el receptor cannabinoide CB₂ (rCB₂).

El rCB₁ se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro de roedores y humanos. En ratas, este receptor se expresa en regiones como hipocampo (HIP), AMY, hipotálamo medial, tálamo, sustancia negra (SN), tronco del encéfalo y cerebelo, entre otros. También se localiza en tejidos y células no neuronales como astrocitos, microglía y oligodendrocitos²⁰. La expresión del rCB₁ en áreas cerebrales relacionadas con la respuesta al estrés, ansiedad y depresión como el HIP y la AMY, supuso el punto de partida para investigar el papel de este receptor en numerosas patologías psiquiátricas²¹⁻²⁷. El empleo de ratones modificados genéticamente ha permitido observar que los ratones desprovistos del gen del rCB₁ (CB₁^{-/-}) presentan una mayor vulnerabilidad frente a estímulos estresantes, ansiogénicos y que promueven un estado depresivo, así como alteraciones en la plasticidad neuronal^{28, 29} y en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), implicado en la respuesta al estrés^{30, 31}.

Asimismo, la activación farmacológica del rCB₁ en roedores, mediada por la administración de agonistas del receptor, se ha relacionado con efectos antidepressivos y aumento de los procesos de neurogénesis³²⁻³⁴. Por el contrario, el bloqueo del rCB₁, producido por el antagonista SR-141716A, se relaciona con efectos depresivos tanto en ratas como en humanos. Cabe destacar que el compuesto SR-141716A (*Rimonabant*[®]), empleado en el tratamiento de la obesidad, fue retirado del mercado tras registrarse varios casos de suicidio^{35, 36}.

En contraposición, menos se conoce en relación al papel del rCB₂. Inicialmente fue considerado como el receptor cannabinoide periférico atribuyéndole funciones en el sistema inmune y hematopoyético debido a su identificación en tejidos periféricos, como bazo de rata, y células del sistema inmune, como determinadas subpoblaciones de leucocitos en humanos^{37, 38}. Además, solamente se pudo detectar expresión del rCB₂ en el cerebro en

determinadas condiciones patológicas como las placas seniles en enfermos de Alzheimer y en las proximidades de tumores³⁹⁻⁴⁵. Sin embargo, en el año 2005, Van Sickle y colaboradores describieron por primera vez la expresión del rCB₂ en neuronas del tronco cerebral de rata, ratón y hurón en condiciones normales⁴⁶. Estos hallazgos se completaron posteriormente con la caracterización de la expresión del rCB₂ en cerebro de rata (**Figura 2A**)⁴⁷ y ratón (**Figura 2B**)⁴⁸.

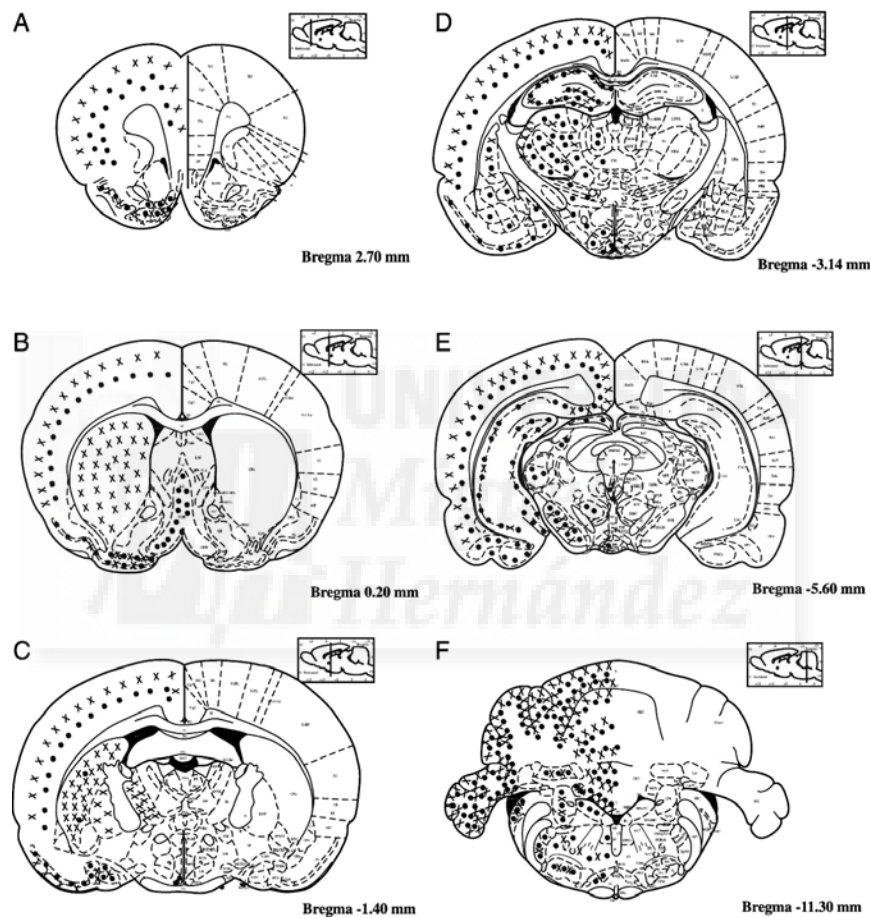


Figura 2A. Localización rCB₂ en el cerebro de rata

Representación esquemática de las fibras inmunoreactivas para el receptor CB₂ en el cerebro de rata correspondientes a diferentes niveles rostrocaudales respecto al bregma: +2.70 mm (A), +0.20 mm (B), -1.40 mm (C), -3.14 mm (D), -5.60 mm (E), -11.30 mm (F). Los círculos negros representan somas neuronales inmunopositivas y las X representan fibras y terminales nerviosas inmunoreactivas⁴⁷.

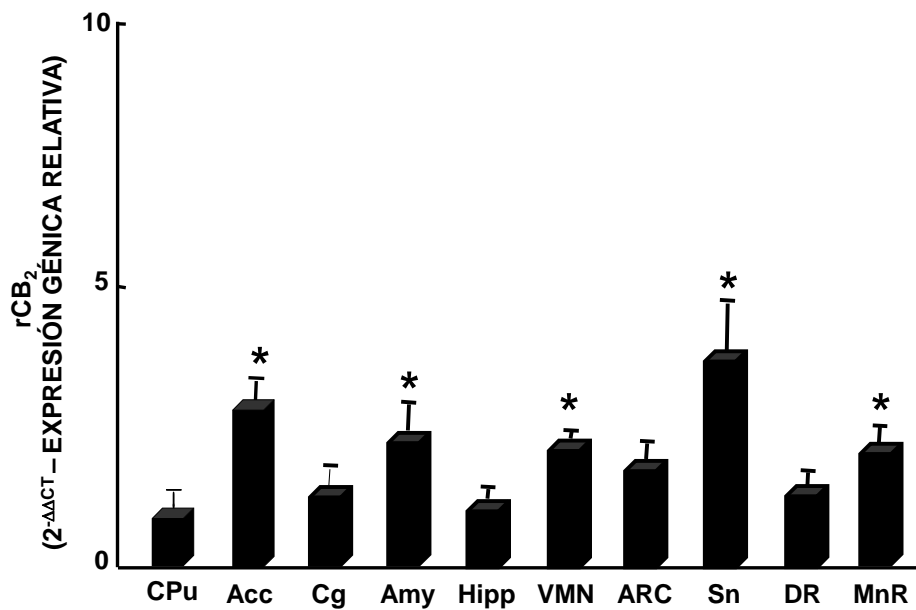


Figura 2B. Localización rCB₂ en el cerebro de ratón

CPu: núcleo caudado-putamen, Acc: núcleo accumbens, Cg: corteza cingulada, Amy: Amígdala, Hipp: Hipocampo, VMN: núcleo ventromedial del hipotálamo, ARC: núcleo arqueado, Sn: sustancia negra, DR: núcleo dorsal del rafe, MnR: núcleo medial del rafe.

La amplia distribución del rCB₂ en el cerebro en condiciones no patológicas llevó a reconsiderar el papel del presente receptor en diferentes procesos y patologías del Sistema Nervioso Central (SNC). En este sentido, el empleo de animales modificados genéticamente y diferentes estudios farmacológicos han permitido corroborar la implicación del rCB₂ en la respuesta al estrés, ansiedad y depresión. El ratón transgénico que sobreexpresa el rCB₂ en el SNC (CB₂xP) presenta un endofenotipo resistente frente a estímulos ansiogénicos y depresógenicos. Estas alteraciones comportamentales se acompañan de modificaciones en dianas estrechamente relacionadas con la respuesta al estrés, ansiedad y depresión, como el eje HPA y el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)^{48, 49}. Por el contrario, la ausencia del rCB₂ se asocia con una mayor vulnerabilidad frente a estímulos ansiogénicos y que promueven un estado depresivo, como han demostrado los estudios llevados a cabo con el ratón desprovisto del rCB₂ (CB₂^{-/-})⁵⁰.

Estudios farmacológicos complementarios muestran cómo la administración crónica del antagonista del rCB₂, AM630, presenta efectos antidepresivos en el modelo de estrés crónico leve, que van acompañados de un aumento del

BDNF⁴⁸. Por otra parte, la administración subcrónica del AM630 también ha demostrado presentar efectos ansiolíticos asociados a alteraciones en las principales subunidades ansiolíticas del receptor GABA (subunidades alfa-2 y gamma-2) en el HIP y en la AMY⁵¹. Todos estos hallazgos muestran la importancia funcional de rCB₂ en la regulación de trastornos como la depresión y la ansiedad, y destacan la relevancia de este receptor como posible diana terapéutica en el tratamiento de estas patologías.

De manera paralela, también se han hallado evidencias que sugieren la participación del rCB₂ en esquizofrenia. El ratón CB₂^{-/-} presenta rasgos similares a los observados en pacientes esquizofrénicos, como alteraciones en la inhibición prepulso, que posteriormente fueron revertidas tras la administración de fármacos antipsicóticos como la risperidona⁵⁰.

Teniendo en cuenta la estrecha relación entre algunas de estas patologías psiquiátricas y alteraciones cognitivas, se ha evaluado la implicación del rCB₂ en la regulación de los procesos cognitivos. Los ratones CB₂^{-/-} presentan un déficit cognitivo e importantes variaciones morfológicas (número de sinapsis, y determinados marcadores como MAP-2, NF-200 y sinaptofisina) y moleculares (BDNF, receptor de glucocorticoides, vía mTOR) en el HIP⁵².

De manera conjunta, los resultados obtenidos refuerzan el papel de los receptores cannabinoides en la reactividad emocional y sugieren su potencial utilidad terapéutica en diferentes patologías psiquiátricas. En este sentido, y considerando la estrecha relación entre dichas patologías y la conducta suicida, algunos estudios han analizado el papel del SCE en el suicidio. Destacan las investigaciones llevadas a cabo por el grupo de Hungund y colaboradores en suicidas depresivos, donde se halló una mayor densidad y activación del rCB₁ en la corteza prefrontal⁵³. De manera complementaria, Vinod y colaboradores observaron un incremento de la activación del rCB₁ en la corteza prefrontal de sujetos suicidas alcohólicos⁵⁴. Estos resultados sugieren que la sensibilización de la activación del rCB₁ en la corteza prefrontal se encuentra más relacionada con el suicidio que con la patología previa, en este caso alcoholismo o depresión. Asimismo, se han detectado alteraciones en la vía cAMP-PKA-CREB en la DLPFC de suicidas depresivos⁵⁵. Teniendo en cuenta que el rCB₁ actúa como elemento neuromodulador GPRC, su activación podría aumentar la capacidad de las proteínas Gi para inhibir la enzima adenilato ciclasa,

contribuyendo así al descenso de la actividad de la vía cAMP-PKA-CREB, que desempeña un importante papel en la fisiopatología de la depresión y suicidio. Sin embargo, las causas etiopatológicas implicadas en la reducción de la actividad del rCB₁ en suicidas siguen sin conocerse a día de hoy.

El objetivo del presente trabajo es profundizar en la implicación del SCE en el suicidio. Para llevarlo a cabo se examinó la expresión génica del rCB₂, isoforma A, en la DLPFC y AMY de sujetos suicidas. Generalmente, los estudios postmortem se realizan en muestras de pacientes depresivos, sin embargo, la interpretación de los resultados puede ser confusa y estar alterada por el hecho de que los pacientes estuvieran bajo tratamiento farmacológico con antidepresivos y/o ansiolíticos durante meses o años previos al suicidio. De este modo, las potenciales alteraciones observadas en pacientes suicidas con depresión pueden ser debidas a adaptaciones neuroquímicas y/o neuromoleculares inducidas por la administración repetida de los fármacos, más que por las alteraciones subyacentes a la conducta suicida. Por ello, la expresión génica del rCB₂, isoforma A, se analizó en sujetos suicidas sin historial clínico de depresión, ansiedad o cualquier otra patología psiquiátrica y sin previo tratamiento farmacológico con antidepresivos o ansiolíticos que pueda interferir en los resultados.

2. OBJETIVOS

Analizar las potenciales alteraciones del rCB₂ en sujetos suicidas. Para ello, se analizó la expresión génica del rCB₂, isoforma A, mediante la técnica PCR a tiempo real en la DLPFC y AMY de sujetos suicidas (S; n=18) y sus correspondientes controles (C; n=15), teniendo en cuenta que los sujetos suicidas no tienen un historial clínico de depresión ni ansiedad y no han sido tratados previamente con fármacos ansiolíticos o antidepresivos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Las muestras cerebrales que se utilizaron en este estudio se han obtenido de autopsias realizadas por el Instituto de Medicina Legal de Alicante, de acuerdo con el convenio establecido entre dicho Instituto, la Universidad Miguel Hernández de Elche y el Departamento de Justicia de la Comunidad Valenciana.

Las muestras se clasificaron en dos grupos: suicidas (S) y controles (C). La **Tabla 1** presenta los datos demográficos y postmortem de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio. Todos los sujetos eran caucásicos (España, provincia de Alicante), varones y dentro de un rango de edad similar (C: 46 ± 12 años; S: 43 ± 17 años), evitando así que existiera variabilidad entre las características de las muestras que pudieran actuar como factores de confusión. También se procuró que el intervalo postmortem, que indica el tiempo que transcurre desde el fallecimiento hasta la realización de la autopsia, fuera lo más similar posible entre los sujetos (PMI, C: 15 ± 7 h; S: 20 ± 11 h). Además, se ha tenido en cuenta un intervalo adicional, el intervalo de refrigeración, que consiste en el tiempo que transcurre entre el momento de la muerte hasta la introducción del cadáver en una cámara refrigeradora (4° C) (PMR, C: 4.43 ± 3.17 h; S: 3.51 ± 2.40 h). Ambos parámetros son indicadores indirectos de la integridad del ARN, y por lo tanto de la calidad del ARN, imprescindible en todos los estudios de expresión génica.

Respecto a los criterios de exclusión, fueron descartados aquellos individuos cuya historia clínica incluyera trauma cerebral, enfermedad del SNC o abuso de drogas ilegales, así como aquellos que estuvieran en tratamiento farmacológico con medicamentos indicados para enfermedades psiquiátricas (antidepresivos, antipsicóticos, benzodiazepinas, etc). Para la detección toxicológica de cocaína, opiáceos, alcohol, antidepresivos y otros fármacos ácidos y básicos, se emplearon los fluidos corporales (sangre, bilis, humor acuoso y orina), siendo un resultado positivo un criterio de exclusión. Todos los sujetos incluidos en el estudio dieron negativo en esta prueba y tampoco cumplieron con los criterios de diagnóstico de enfermedades psiquiátricas. Del

mismo modo, no se hallaron autolesiones, ni intentos previos de suicidio o parientes cercanos con historia de suicidio.

Tabla 1. Características demográficas e intervalos postmortem de las muestras C y S. IPM: intervalo postmortem; RPM: intervalo postmortem hasta refrigeración (4°C).

Grupo Controles				Grupo Suicidas			
Edad	IPM (h)	RPM (h)	Causa de la muerte	Edad	IPM (h)	RPM (h)	Causa de la muerte
49	7	7.5	Natural, Paro cardíaco	47	11	12	Suicidio, Ahorcadura
47	22	1.30	Natural, Fallo respiratorio	61	23	1.30	Suicidio, Ahorcadura
52	23	3.30	Natural, Paro cardíaco	26	18	3.30	Suicidio, Ahorcadura
64	16	6	Natural, Muerte súbita	57	20	8	Suicidio, Ahorcadura
56	24	2.30	Natural, Paro cardíaco	25	7	10	Suicidio, Ahorcadura
55	6	2	Natural, Pancreatitis aguda	40	17	2.30	Suicidio, Ahorcadura
33	24	1.30	Natural, Muerte súbita	41	10	2.30	Suicidio, Ahorcadura
52	10	7.5	Natural, Infarto de miocardio	42	8	1.30	Suicidio, Ahorcadura
40	19	1.30	Natural, Embolismo pulmonar	30	20	4	Suicidio, Ahorcadura
64	18	2.30	Natural, Hipertrofia cardíaca	36	21	5	Suicidio, Ahorcadura
19	6	4.30	Natural, Muerte súbita	41	18	8	Suicidio, Ahorcadura
40	19	2	Natural, Muerte súbita	22	18	6	Suicidio, Ahorcadura
38	11	1.30	Natural, Muerte súbita	66	27	5	Suicidio, Ahorcadura
50	20	7.30	Natural, Muerte súbita	18	12	2	Suicidio, Precipitación
39	4	3	Natural, Muerte súbita	66	18	2.30	Suicidio, Ahorcadura
				78	20	2.30	Suicidio, Ahorcadura
				46	21	2.30	Suicidio, Ahorcadura
				36	18	2.30	Suicidio, Ahorcadura

3.2. Disección cerebral

Las muestras cerebrales se encontraban almacenadas en el interior de una cámara refrigerada a una temperatura de -70°C . Posteriormente, fueron seccionadas en seis piezas mayores (cuatro lóbulos corticales, ganglios basales - diencéfalo y tronco cerebral - cerebelo). Para realizar la disección se utilizó hielo seco, una superficie de acero, un cuchillo para realizar el corte, un bisturí y un cuchillo de microdisección (de Graefe).

En primer lugar, se descongelaron las muestras de *DLPFC* y *AMY* de ambos grupos desde -70°C a -20°C . Se preparó una superficie de acero sobre hielo seco para mantener la temperatura óptima y asegurar la buena conservación de las muestras. Seguidamente se realizó el corte con máxima precaución, sujetando cada bloque de tejido sobre la superficie de acero, con ayuda del cuchillo y el bisturí para una mayor precisión. Cada sección obtenida se introdujo en un tubo *ependorf* de 1,5 mL autoclavado. Al finalizar la disección, el tejido cerebral era devuelto de inmediato a la cámara refrigerada a -70°C .

3.3. Evaluación de la integridad del ARN (*RNA integrity number* - RIN)

Previamente al análisis de la expresión génica del rCB_2 , se evaluó la integridad del ARN de cada una de las muestras. Para ello, se calculó el número de integridad del ARN (RIN), que determina el grado de degradación de éste. Inicialmente, se aisló el ARN total a partir del tejido congelado de *DLPFC* y *AMY*, usando el reactivo TRI (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Posteriormente, estas muestras se analizaron con el bioanalizador 2100 (*Agilent Technologies, Madrid, España*) que permite detectar las bandas de ARN ribosómico 18S y 28S. El RIN se calcula en función de la relación 28S/18S. Los valores entre los que está comprendido es 1-10, siendo 10 el valor para una muestra con ARN de excelente calidad y 1 para una muestra con ARN totalmente degradado.

3.4. Análisis de la expresión génica del rCB₂, isoforma A, mediante PCR a tiempo real (Rt-PCR)

Se realizó el análisis de la expresión génica del rCB₂, isoforma A, en DLPFC y AMY de las muestras de los pacientes C y S. El ARN total se obtuvo de las secciones de cerebro contenidas en los tubos *ependorf* que se prepararon previamente durante la disección. Para la extracción de ARN total se utilizó el Reactivo Tri (*Applied Biosystems, Madrid, España*). Con la ayuda de un micropistilo se homogenizó cada muestra en su respectivo tubo *ependorf*. Tras la incubación se realizó la separación de fases, estando el ARN solo en la fase acuosa, que se transfirió con extremo cuidado a un nuevo tubo para el siguiente paso, la precipitación. Tras obtener el pellet en el fondo del tubo, se procedió al lavado de las muestras con etanol y posterior resuspensión del ARN, que se conservó en pequeñas alícuotas de 10 µL a una temperatura de -80°C para evitar su degradación. Para el ajuste de concentraciones se utilizó un espectrofotómetro (*Nanodrop*), paso necesario para que todas las concentraciones de ARN de las muestras estén igualadas y así poder retrotranscribir la misma cantidad de ARN.

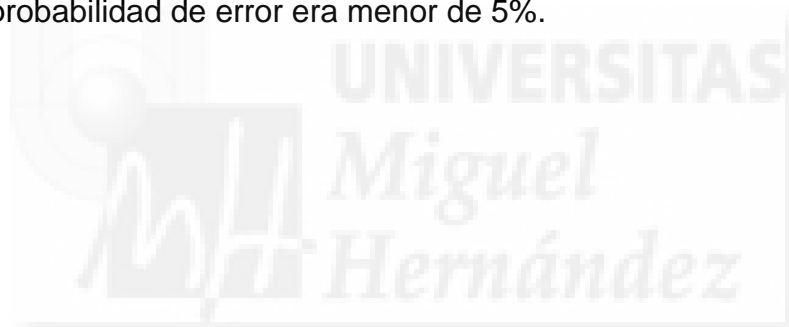
La transcripción inversa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (*Epicentro, Tech. Corp., Madison, Wisconsin*). La expresión génica del rCB₂, isoforma A, se midió usando el Ensayo de Taqman (*Taqman Gene Expresión Assay*) (el par de cebadores y la sonda que se utilizó fueron los siguientes: cebador sentido, GGAAGAAAGAGAATATTGTTTCAGTTGATT; cebador antisentido, GCTGGCCTTGGAGAGTGACA; y la sonda Taqman MGB, CCAGATGCAGCCGC)⁵⁶ como colorante fluorescente de la doble cadena de ADN, realizado mediante el Sistema Detector de Secuencia StepOne© (*Applied Biosystems, Madrid, España*). Todos los reactivos se obtuvieron de *Applied Biosystems* y se siguieron los protocolos del fabricante. Todas las combinaciones cebador-sonda fueron optimizadas y validadas para la cuantificación de la expresión génica. En este estudio se utilizaron dos genes de referencia, la ciclofilina (PPIA, Hs99999904_m1) y sinaptofisina (SYP, Hs00300531_m1), para así asegurar la validez y reproducibilidad de los resultados. Por cada muestra se preparó un duplicado para cada diana y gen

de referencia, en dos placas diferentes (una para las muestras de la AMY y otra para DLPFC).

Una vez acabada la Rt-PCR, se consideraron válidas las muestras cuando los valores de las desviaciones estándar entre los duplicados fueran menores de 0,3 con el fin de evitar un pipeteado no homogéneo e incorrecto. Se ajustaron los datos correspondientes a cada muestra respecto a los genes endógenos de referencia. La variación en la abundancia de genes se determinó utilizando la expresión matemática $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 57, de tal manera que los niveles de las muestras S se expresan en relación con los niveles de las muestras C.

3.5. Análisis estadístico

Mediante la prueba de t de Student se realizó el análisis estadístico de los resultados de la expresión del rCB₂ para comparar el grupo C y S mediante el programa Sigmaplot v11.0. Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad de error era menor de 5%.

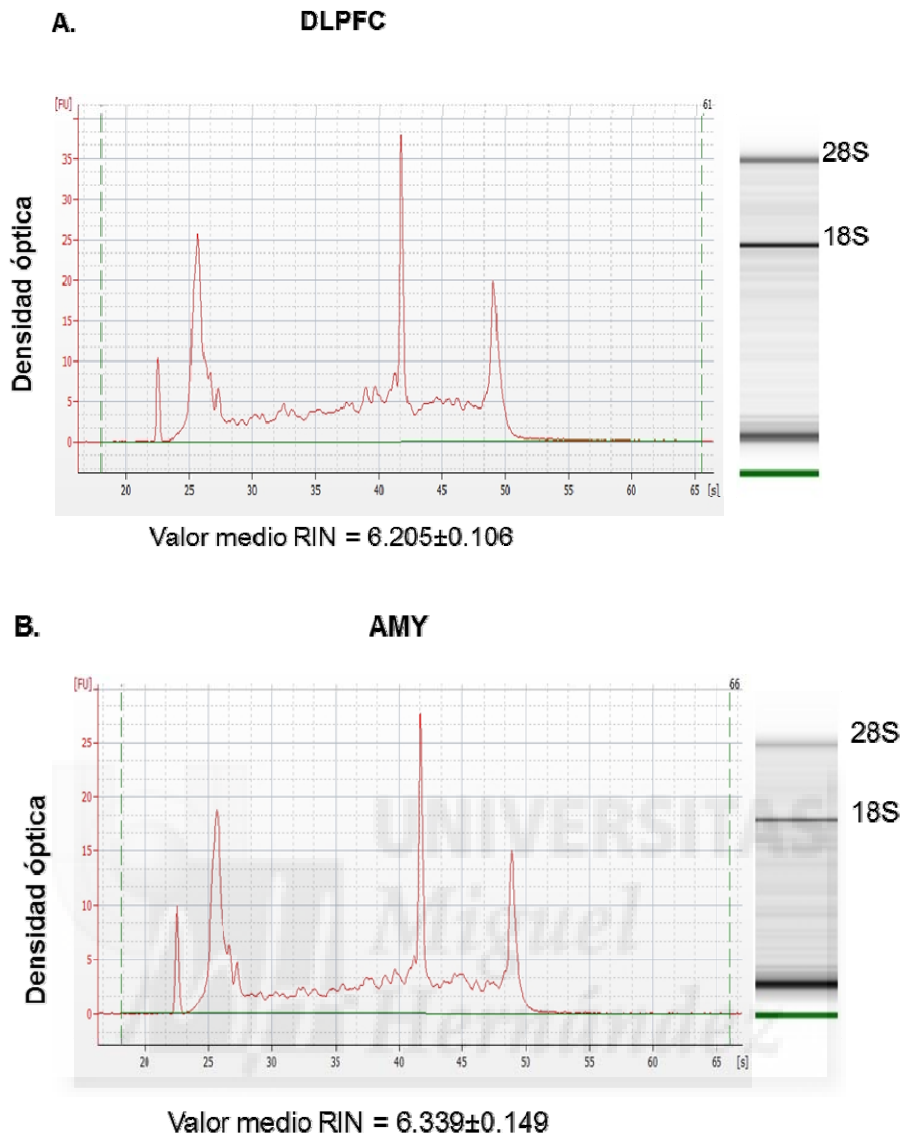


4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la integridad del ARN total en el tejido congelado de la corteza prefrontal y amígdala de S y C: número integridad del ARN (RIN)

En primer lugar, se analizaron todas las muestras de ARN total de las regiones DLPFC y AMY con el bioanalizador *Agilent 2100* para evaluar el valor de RIN. Resulta imprescindible realizar esta evaluación del nivel de calidad del ARN con el fin de obtener resultados fiables en el estudio de la expresión génica⁵⁸.

Los resultados indican que el valor medio de RIN fue superior a 6 (DLPFC: S = $6,046 \pm 0,11$, rango: 5,75 a 7,00; C = $6,50 \pm 0,18$, rango: 6,00-7,40) (AMY: S = $6,611 \pm 0,174$, rango: 6,10 -7,40; C = $6,067 \pm 0,213$, rango: 5,50 a 7,10), por lo que las muestras presentan un nivel de calidad de ARN óptimo para poder realizar estudios de expresión génica⁵⁹. En la **Figura 3** se pueden observar los electroferogramas e imágenes de los geles representativas de las muestras analizadas. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas regiones (Figura 3A, 3B; t de Student: $t=-0,744$, $p=0,461$, 64 df), ni entre C y S (Figura 3C; t de Student, $t=- 0,115$, $p=0,909$, 64 df).



C. Valor global RIN (media \pm SEM)

	DLPFC	AMY	
CONTROLES	6.500 ± 0.185	6.067 ± 0.213	6.256 ± 0.151
SUICIDAS	6.046 ± 0.110	6.611 ± 0.174	6.277 ± 0.111
	6.205 ± 0.106	6.339 ± 0.149	

Figura 3. Evaluación del RIN en DLPFC y AMY de C y S. Imágenes representativas obtenidas del electroferograma que muestran el RIN medio de cada región: DLPFC (A) y AMY (B). Tabla resumen que muestra los valores de RIN y los valores medios globales en DLPFC y AMY (C).

4.2. Análisis de la expresión génica del rCB₂, isoforma A, en la DLPFC y AMY de S y C mediante Rt-PCR:

Se observó una reducción significativa de la expresión génica del rCB₂, isoforma A, en los S en las dos regiones analizadas. En la DLPFC se observó una reducción del 30% en los sujetos S respecto a sus C (Figura 4A; -30%; prueba t de Student: $t = 2,376$, $p=0,024$, 31 df) y en la AMY, una reducción del 40% en la expresión génica en S en comparación con sus C (Figura 4B; - 40%; prueba t de Student: $t = 3,050$, $p=0,005$, 31 df). Los resultados se representan en la **Figura 4** como la media del resultado obtenido con cada gen endógeno de referencia (PPIA y SYP) en cada placa duplicada.

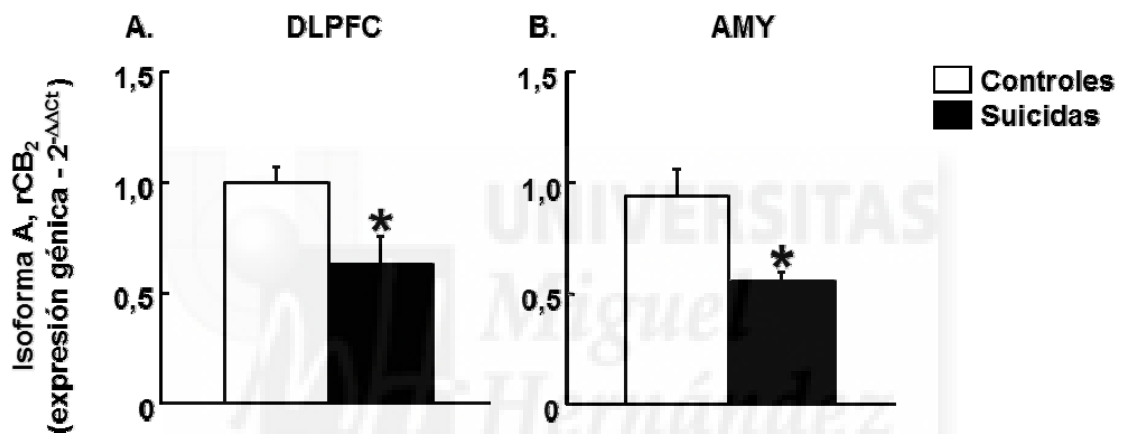


Figura 4. Análisis de la expresión génica relativa del rCB₂, isoforma A, en DLPFC (A) y AMY (B) mediante Rt-PCR. La expresión génica relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ empleando dos genes de referencia (ciclofilina y sinaptofisina). Las columnas representan las medias \pm error estándar de los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtenidos para cada uno de los genes de referencia y muestras analizadas.

5. DISCUSIÓN

En la sociedad actual el suicidio representa un importante problema de salud pública, siendo la decimotercera causa de muerte en el mundo. Diferentes factores sociales, psicológicos, ambientales, biológicos y culturales pueden actuar, de manera acumulativa, como factores de riesgo para la ideación suicida. Según el primer informe acerca de la Prevención del Suicidio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 se registraron unas 804.000 muertes por suicidio en todo el mundo. Teniendo en cuenta el impacto devastador que provoca en la sociedad actual, se hace necesario profundizar en el conocimiento de las alteraciones neurobiológicas que subyacen a esta patología con el objetivo último de poder identificar potenciales biomarcadores y/o dianas farmacológicas que ayuden a prevenir y/o tratar la conducta suicida.

Hasta la fecha las investigaciones llevadas a cabo han permitido relacionar diferentes sistemas de neurotransmisión con el comportamiento suicida, como los sistemas monoaminérgicos, opioidérgicos, glutamatérgicos y GABAérgicos, además de alteraciones en los procesos de neurogénesis⁶⁰⁻⁶⁵. Sin embargo, ninguna de estas alteraciones resulta ser específica de la conducta suicida.

Recientemente, el SCE también se ha relacionado con el suicidio. Estudios preliminares muestran alteraciones en la expresión génica de rCB₁ en DLPFC de individuos suicidas con historial de depresión⁵³. Estos resultados se han corroborado posteriormente en suicidas alcohólicos⁵⁴. Por tanto, es probable que las alteraciones del rCB₁ se relacionen más con la conducta suicida que con otras patologías previas como depresión o alcoholismo. Estos hallazgos constituyen las primeras evidencias sobre la potencial participación del SCE en la neurobiología del suicidio.

Con el objetivo de profundizar en el papel del SCE en la conducta suicida, en el presente estudio se han analizado las potenciales alteraciones del rCB₂ en sujetos suicidas. La expresión basal del rCB₂ en regiones como la DLPFC y AMY (implicadas en la conducta impulsiva y en la modulación de la respuesta emocional), y la participación de este receptor en patologías psiquiátricas estrechamente relacionadas con el suicidio, como trastornos de ansiedad y depresión, sugieren su potencial implicación en el comportamiento suicida.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios postmortem mencionados previamente se han llevado a cabo en sujetos con historial de depresión. Este hecho dificulta la posibilidad de relacionar las alteraciones observadas en estas muestras con la conducta suicida. La razón recae en que el tratamiento farmacológico de los trastornos depresivos es complejo y los pacientes son tratados diariamente con fármacos ansiolíticos y/o antidepresivos, normalmente durante años, de tal manera que las alteraciones observadas en estas muestras pueden deberse más al tratamiento antidepresivo repetido que a la conducta suicida. Partiendo de esta base, en este estudio se examinó la expresión génica del rCB₂, isoforma A, en sujetos suicidas que no presentaban diagnóstico de enfermedad mental o trastorno psiquiátrico subyacente, según las entrevistas a familiares, la evaluación psicológica forense y la historia clínica. Además, todos los sujetos incluidos dieron negativo en las analíticas postmortem para cualquier sustancia de abuso o psicofármacos. Por otra parte, todas las muestras cerebrales examinadas en el presente estudio fueron seleccionadas adecuadamente en cuanto a edad, sexo, intervalo postmortem y RIN.

El análisis de los datos presentados demuestra una reducción significativa de la expresión génica del rCB₂ en DLPFC y AMY de S en comparación con C. Estos resultados apuntan a que existe relación entre la reducción del rCB₂ en DLPFC y AMY y la aparición de alteraciones en el estado emocional. Tanto DLPFC como AMY desempeñan un papel crucial en la toma de decisiones y en la regulación de las funciones cognitivas, de tal manera que las deficiencias en las conexiones desde AMY a las áreas corticales y subcorticales se relacionan con alteraciones en la toma de decisiones y el comportamiento social^{66, 67}. Curiosamente, las disfunciones que se han encontrado en DLPFC de pacientes que han intentado suicidarse se han asociado con un deterioro de las funciones ejecutivas y una mayor impulsividad, lo cual puede explicar el comportamiento suicida [68, 69], teniendo en cuenta que una mayor impulsividad se relaciona con un mayor riesgo de suicidio^{70, 71}. Asimismo, cabe destacar que estudios recientes sugieren la participación del rCB₂ en la modulación de la impulsividad en ratones⁷². Por consiguiente, los resultados obtenidos que muestran la reducción de la expresión del rCB₂ en áreas involucradas en el control de la toma de decisiones en sujetos suicidas constituyen la primera evidencia de la

implicación del rCB_2 como receptor clave en la neurobiología del comportamiento suicida.

A pesar de que la neurociencia todavía se encuentra lejos de la comprensión de todos los mecanismos biológicos específicos que subyacen al suicidio, este estudio contribuye a esclarecer algunas cuestiones que hasta hace una década eran imposibles de resolver. Son necesarias nuevas investigaciones que examinen áreas cerebrales adicionales relacionadas con trastornos emocionales y patologías psiquiátricas y que continúen complementando la caracterización del SCE y su implicación en ellas. Estos estudios permitirán determinar la potencial utilidad terapéutica del SCE en el tratamiento de algunas patologías psiquiátricas que se asocien con riesgo de suicidio.



6. CONCLUSIONES

1. La expresión génica del rCB₂ (isoforma A) se encuentra reducida de manera significativa en las regiones DLPFC y AMY de víctimas suicidas.
2. rCB₂ desempeña un papel importante en la neurobiología del suicidio.
3. Estos resultados señalan al rCB₂ como una nueva diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas que se asocien con riesgo de suicidio.
4. Existe una potencial utilidad terapéutica del SCE para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas, incluyendo el suicidio.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Levi, F., et al., *Trends in mortality from suicide, 1965-99*. Acta Psychiatr Scand, 2003. **108**(5): p. 341-9.
2. Arseneault-Lapierre, G., C. Kim, and G. Turecki, *Psychiatric diagnoses in 3275 suicides: a meta-analysis*. BMC Psychiatry, 2004. **4**: p. 37.
3. Costanza, A., et al., *Neurobiology of suicide: do biomarkers exist?* Int J Legal Med, 2014. **128**(1): p. 73-82.
4. Furczyk, K., et al., *The neurobiology of suicide - A Review of post-mortem studies*. J Mol Psychiatry, 2013. **1**(1): p. 2.
5. Sokolowski, M., J. Wasserman, and D. Wasserman, *An overview of the neurobiology of suicidal behaviors as one meta-system*. Mol Psychiatry, 2015. **20**(1): p. 56-71.
6. Turecki, G., *The molecular bases of the suicidal brain*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(12): p. 802-16.
7. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
8. Mechoulam, R., et al., *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 83-90.
9. Sugiura, T., et al., *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(1): p. 89-97.
10. Bracey, M.H., et al., *Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1793-6.
11. Cravatt, B.F., et al., *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides*. Nature, 1996. **384**(6604): p. 83-7.
12. Dinh, T.P., T.F. Freund, and D. Piomelli, *A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation*. Chem Phys Lipids, 2002. **121**(1-2): p. 149-58.
13. Dinh, T.P., S. Kathuria, and D. Piomelli, *RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(5): p. 1260-4.
14. Gulyas, A.I., et al., *Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(2): p. 441-58.
15. Saario, S.M., et al., *Characterization of the sulfhydryl-sensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes*. Chem Biol, 2005. **12**(6): p. 649-56.
16. Bisogno, T., A. Ligresti, and V. Di Marzo, *The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects*. Pharmacol Biochem Behav, 2005. **81**(2): p. 224-38.
17. Freund, T.F., I. Katona, and D. Piomelli, *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 1017-66.
18. Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 873-84.
19. Alger, B.E., *Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids*. Prog Neurobiol, 2002. **68**(4): p. 247-86.
20. Herkenham, M., et al., *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. J Neurosci, 1991. **11**(2): p. 563-83.
21. Brotchie, J.M., *CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(1): p. 54-61.
22. Colombo, G., et al., *Endocannabinoid system and alcohol addiction: pharmacological studies*. Pharmacol Biochem Behav, 2005. **81**(2): p. 369-80.
23. Corchero, J., J. Manzanares, and J.A. Fuentes, *Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system*. Crit Rev Neurobiol, 2004. **16**(1-2): p. 159-72.
24. Chaperon, F. and M.H. Thiebot, *Behavioral effects of cannabinoid agents in animals*. Crit Rev Neurobiol, 1999. **13**(3): p. 243-81.
25. Manzanares, J., et al., *Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(7): p. 287-94.
26. Naassila, M., et al., *Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice*. Neuropharmacology, 2004. **46**(2): p. 243-53.
27. Ortiz, S., et al., *Differences in basal cannabinoid CB1 receptor function in selective brain areas and vulnerability to voluntary alcohol consumption in Fawn Hooded and Wistar rats*. Alcohol Alcohol, 2004. **39**(4): p. 297-302.
28. Aso, E., et al., *BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice*. J Neurochem, 2008. **105**(2): p. 565-72.
29. Paska, A.V., T. Zupanc, and P. Pregelj, *The role of brain-derived neurotrophic factor in the pathophysiology of suicidal behavior*. Psychiatr Danub, 2013. **25** Suppl 2: p. S341-4.
30. Cota, D., et al., *Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function*. Endocrinology, 2007. **148**(4): p. 1574-81.
31. Uriguen, L., et al., *Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors*. Neuropharmacology, 2004. **46**(7): p. 966-73.
32. Bambico, F.R., et al., *Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex*. J Neurosci, 2007. **27**(43): p. 11700-11.
33. Jiang, W., et al., *Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3104-16.
34. Morrish, A.C., et al., *Protracted cannabinoid administration elicits antidepressant behavioral responses in rats: role of gender and noradrenergic transmission*. Physiol Behav, 2009. **98**(1-2): p. 118-24.
35. Christensen, R., et al., *Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2007. **370**(9600): p. 1706-13.
36. Nissen, S.E., et al., *Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial*. JAMA, 2008. **299**(13): p. 1547-60.
37. Galiegue, S., et al., *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. Eur J Biochem, 1995. **232**(1): p. 54-61.

38. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. *Nature*, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
39. Benito, C., et al., *A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis*. *J Neurosci*, 2005. **25**(10): p. 2530-6.
40. Ehrhart, J., et al., *Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation*. *J Neuroinflammation*, 2005. **2**: p. 29.
41. Guzman, M., C. Sanchez, and I. Galve-Roperh, *Control of the cell survival/death decision by cannabinoids*. *J Mol Med (Berl)*, 2001. **78**(11): p. 613-25.
42. Ibrahim, M.M., et al., *Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(18): p. 10529-33.
43. Joosten, M., et al., *Leukemic predisposition of pSca-1/Cb2 transgenic mice*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(2): p. 142-9.
44. Steffens, S., et al., *Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice*. *Nature*, 2005. **434**(7034): p. 782-6.
45. Yiangu, Y., et al., *COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord*. *BMC Neurol*, 2006. **6**: p. 12.
46. Van Sickle, M.D., et al., *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. *Science*, 2005. **310**(5746): p. 329-32.
47. Gong, J.P., et al., *Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain*. *Brain Res*, 2006. **1071**(1): p. 10-23.
48. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors*. *Br J Pharmacol*, 2010. **160**(7): p. 1773-84.
49. Garcia-Gutierrez, M.S. and J. Manzanares, *Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice*. *J Psychopharmacol*, 2011. **25**(1): p. 111-20.
50. Ortega-Alvaro, A., et al., *Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice*. *Neuropsychopharmacology*, 2011. **36**(7): p. 1489-504.
51. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors*. *Br J Pharmacol*, 2012. **165**(4): p. 951-64.
52. Garcia-Gutierrez, M.S., et al., *Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors*. *Neuropharmacology*, 2013. **73**: p. 388-96.
53. Hungund, B.L., et al., *Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims*. *Mol Psychiatry*, 2004. **9**(2): p. 184-90.
54. Vinod, K.Y., et al., *Elevated levels of endocannabinoids and CB1 receptor-mediated G-protein signaling in the prefrontal cortex of alcoholic suicide victims*. *Biol Psychiatry*, 2005. **57**(5): p. 480-6.
55. Dwivedi, Y., et al., *Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects*. *Arch Gen Psychiatry*, 2003. **60**(8): p. 804-15.
56. Liu, Q.R., et al., *Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands*. *Genes Brain Behav*, 2009. **8**(5): p. 519-30.
57. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
58. Vermeulen, J., et al., *Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(9): p. e63.
59. Klempner, T.A., et al., *Characterization of QKI gene expression, genetics, and epigenetics in suicide victims with major depressive disorder*. *Biol Psychiatry*, 2009. **66**(9): p. 824-31.
60. Arango, V., et al., *Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims*. *Neuropsychopharmacology*, 2001. **25**(6): p. 892-903.
61. Arango, V., et al., *Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims*. *Brain Res*, 1995. **688**(1-2): p. 121-33.
62. Mann, J.J., et al., *A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide*. *Arch Gen Psychiatry*, 2000. **57**(8): p. 729-38.
63. Noga, J.T., et al., *Glutamate receptors in the postmortem striatum of schizophrenic, suicide, and control brains*. *Synapse*, 1997. **27**(3): p. 168-76.
64. Rajkowska, G., et al., *GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression*. *Neuropsychopharmacology*, 2007. **32**(2): p. 471-82.
65. Sequeira, A., et al., *Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6585.
66. Bechara, A., H. Damasio, and A.R. Damasio, *Role of the amygdala in decision-making*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **985**: p. 356-69.
67. Gaffan, D., E.A. Murray, and M. Fabre-Thorpe, *Interaction of the amygdala with the frontal lobe in reward memory*. *Eur J Neurosci*, 1993. **5**(7): p. 968-75.
68. Jollant, F., et al., *Impaired decision making in suicide attempters*. *Am J Psychiatry*, 2005. **162**(2): p. 304-10.
69. van Heeringen, C., et al., *Prefrontal 5-HT2a receptor binding index, hopelessness and personality characteristics in attempted suicide*. *J Affect Disord*, 2003. **74**(2): p. 149-58.
70. Mann, J.J., et al., *Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients*. *Am J Psychiatry*, 1999. **156**(2): p. 181-9.
71. Turecki, G., *Dissecting the suicide phenotype: the role of impulsive-aggressive behaviours*. *J Psychiatry Neurosci*, 2005. **30**(6): p. 398-408.
72. Navarrete, F., J.M. Perez-Ortiz, and J. Manzanares, *Cannabinoid CB(2) receptor-mediated regulation of impulsive-like behaviour in DBA/2 mice*. *Br J Pharmacol*, 2012. **165**(1): p. 260-73.