



2010

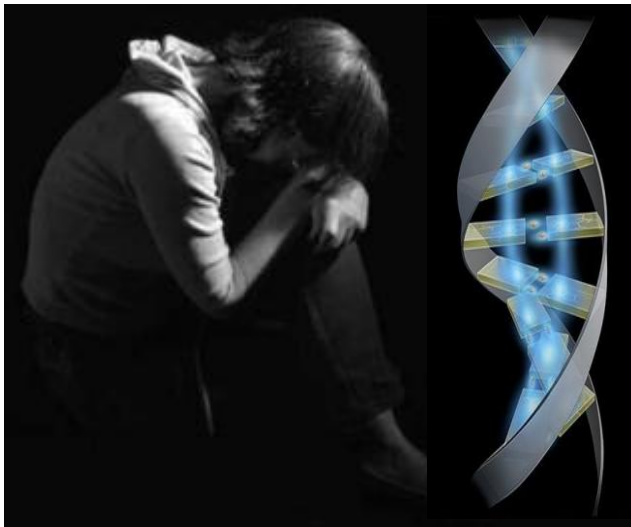
Mariana Pires A. Alves Genética do suicídio: investigação de SNPs em genes das neurotrofinas e mecanismos de transdução de sinal



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Genética do suicídio: investigação de SNPs
em genes das neurotrofinas e mecanismos de
transdução de sinal



Mariana Pires Antunes Alves

2010



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Genética do suicídio: investigação de SNPs em genes das neurotrofinas e mecanismos de transdução de sinal

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Alda Ambrósio (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e supervisão do Professor Doutor Rui de Carvalho (Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra)

Mariana Pires Antunes Alves

2010

Agradecimentos

À Professora Doutora Alda Ambrósio, pela oportunidade de realizar este trabalho na Unidade de Genética Clínica e Molecular do Instituto de Medicina Legal e pela sua total disponibilidade e ajuda na orientação do trabalho.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal, instituição de acolhimento e de recolha de amostras, e ao Professor Duarte Nuno Vieira.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho por tudo o que fizeram ao longo da minha vida, pelo apoio incondicional, pelas palavras certas nos momentos em que mais precisei. A eles, um muito obrigado.

À Andreia, pela sua amizade e por todos os momentos partilhados.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração e de boa disposição que partilhámos.

A todos, obrigada por tudo.

Publicações

Mariana Alves, Beatriz Silva, Jerónimo Fonte Santa, Cláudia Marques, Rosário Lemos Silva, Duarte Nuno Vieira, Alda M. Ambrósio. Case control study of BDNF (Val66Met), p75^{NTR} (S205L), PRKG1 (C2276T) gene polymorphisms in suicide in Portuguese population (em preparação).

Índice

Publicações	3
Abreviaturas	6
Resumo	8
Capítulo 1 – Introdução	10
1 – Introdução	11
1.1 - Caracterização geral	11
1.2 - Considerações gerais de genética	12
1.2.1 - Genoma humano e marcadores genéticos	12
1.2.2 – Projectos do genoma humano e HapMap	14
1.3 - Genética do comportamento suicida	15
1.4 - Factores neurotróficos	16
1.4.1 - Caracterização geral	16
1.4.2 - Neurotrofina BDNF	18
1.4.3 - Receptores de neurotrofinas	18
1.5 - Genes candidatos das neurotrofinas no suicídio	21
1.6 - Mecanismo de transdução de sinal: Proteína Cinase G	23
1.6.1 - Caracterização geral	23
1.6.2 - Gene candidato da PKG no suicídio	24
1.7 – Objectivo	25
Capítulo 2 - Material e métodos	26
2 - Material e métodos	27
2.1 - Selecção da amostra	27
2.2 - Extracção de DNA genómico	27
2.2.1 - Fundamentos teóricos	27
2.2.2 - Descrição do protocolo de extracção de DNA	28
2.3 - Determinação da concentração e pureza de DNA	29
2.4 - Fundamentos teóricos sobre amplificação de DNA genómico, enzimas de restrição e electroforese	30
2.4.1 - Amplificação de DNA genómico	30
2.4.2 - Enzimas de restrição e electroforese	32

2.5 - Genotipagem de polimorfismos	33
2.5.1 - Polimorfismo Val66Met do gene BDNF	33
2.5.2 - Polimorfismo S205L do gene p75 ^{NTR}	34
2.5.3 - Polimorfismo C2276T do gene PRKG1	34
2.6 - Análise estatística	35
Capítulo 3 - Resultados e discussão	36
3 - Resultados e discussão	37
3.1 - Gene BDNF	37
3.2 - Gene p75 ^{NTR}	42
3.3 - Gene PRKG1	48
Capítulo 4 - Conclusões e estudos futuros	54
4 - Conclusão e estudos futuros	55
4.1 - Conclusões	55
4.2 - Estudos futuros	56
Referências bibliográficas	57

Abreviaturas

ADHD	Doença de déficit de atenção e hiperactividade
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CPE	Carboxipeptidase E
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos tri-fosfatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ER	Retículo endoplasmático
GMPc	Monofosfato guanosina ciclíco
LD	<i>Linkage desequilibrium</i>
LTD	<i>Long-term depression</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MMPs	Metaloproteínas
NaCl	Cloreto de sódio
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Monóxido de azoto
NOS	Sintetase do óxido nítrico
NT-3	<i>Neurotrophin-3</i>
NT4/5	<i>Neurotrophin-4/5</i>
OMS	Organização mundial de saúde
p75 ^{NTR}	<i>pan 75 neurotrophin receptor</i>

pb	Pares de bases
PC1	Proteína convertase 1
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PGH	Projecto do genoma humano
PI3K	<i>Phosphoinositide 3 kinase</i>
PKG	Proteína cinase G
PLC	Fosfolipase C
PRKG	Gene proteína cinase G
RFLP	<i>Restriction fragment lenght polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sGC	Guanilciclase solúvel
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TBE	Tris-borato EDTA
Teste do X ²	Teste do qui-quadrado
TrK	Receptor de tirosina cinase
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultra-violeta
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i>
RENDA	Registo nacional de não-dadores

Resumo

O suicídio é um grave problema de saúde pública a nível mundial, principalmente em países industrializados, e os factores genéticos desempenham um papel importante na sua etiologia.

As neurotrofinas desempenham funções importantes no sistema nervoso central e periférico, estando envolvidas, por exemplo, em processos de plasticidade sináptica. Algumas evidências sugerem que as neurotrofinas, particularmente o *Brain-Derived Neurotrophic factor* (BDNF) e o receptor *pan-75 neurotrophin* (p75^{NTR}), poderão desempenhar um papel importante na etiologia do suicídio. Por exemplo, estudos *postmortem* realizados em vítimas de suicídio revelaram alterações nos níveis de expressão de BDNF e de p75^{NTR} no hipocampo e no córtex pré-frontal.

A proteína cinase G (PKG) pertence à família das cinases serina/treonina e desempenha funções ao nível da plasticidade sináptica e das vias de transdução de sinal, principalmente na activação de vias de sinalização em células pós-sinápticas, na mobilização de vesículas sinápticas na célula pré-sináptica e na libertação de neurotransmissores. Com base nestas evidências, colocámos a hipótese de que variantes genéticas no gene PRKG1 poderão eventualmente desempenhar um papel na susceptibilidade para o suicídio.

Assim, neste projecto estudou-se o envolvimento dos SNPs Val66Met, S205L e C2276T, nos genes BDNF, p75^{NTR} e PRKG1, respectivamente, na etiopatogenia do suicídio, numa amostra da população Portuguesa seleccionada no decorrer de autópsias médico-legais, realizadas no Instituto Nacional de Medicina Legal.

Os resultados obtidos para o polimorfismo Val66Met do gene BDNF não revelaram associação entre este polimorfismo e o suicídio na globalidade da amostra, na estratificação por género ou método de suicídio. Desta forma, o polimorfismo Val66Met do gene BDNF parece não desempenhar um papel importante na etiologia do suicídio.

Quanto ao gene p75^{NTR}, os resultados do estudo para a amostra de indivíduos do sexo masculino mostraram uma tendência de associação, e uma associação para o genótipo ($\chi^2=5,302$; $df=2$; $p=0,071$) e para o alelo ($\chi^2=5,269$; $df=1$; $p=0,022$),

respectivamente, o que permite sugerir que o polimorfismo do gene $p75^{NTR}$ poderá ser um factor de risco para o suicídio no sexo masculino. Contrariamente, a amostra de indivíduos do sexo feminino não revelou alterações significativas. No que diz respeito à amostra no seu todo, e estratificada por método de suicídio, não se detectarem alterações significativas na distribuição genotípica e nas frequências alélicas.

Relativamente ao polimorfismo C2276T do gene PRKG1, não foi obtida associação com o suicídio para a totalidade da amostra, bem como na estratificação por género e método de suicídio. Contudo, para a distribuição genotípica, foi obtida uma tendência de associação entre o polimorfismo C2276T do gene PRKG1 e o suicídio para indivíduos do sexo feminino ($\chi^2=5,361$; $df=2$; $p=0,069$). Face a este resultado, é importante fazer estudos adicionais para tentar esclarecer o papel do gene PRKG1 no suicídio, em particular no sexo feminino.

Tendo em conta os resultados obtidos, nomeadamente para o receptor $p75^{NTR}$, a hipótese do envolvimento de variantes genéticas das neurotrofinas é promissora, na etiologia do suicídio. A possível identificação de factores genéticos disponibilizará um contributo para uma melhor compreensão da etiologia do suicídio e potencialmente para a prevenção do comportamento suicida, reduzindo desta forma a taxa de suicídio.

Palavras-chave: Suicídio, Genética, Gene BDNF, Gene $p75^{NTR}$, Gene PRKG1

Capítulo 1

Introdução

1 - Suicídio

1.1 - Caracterização geral

O suicídio é um grave problema de saúde pública a nível mundial, afectando toda a classe etária. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3.000 pessoas cometem suicídio por dia, e nos últimos 45 anos o suicídio aumentou cerca de 60%, principalmente em países desenvolvidos. O suicídio é a terceira causa de morte em indivíduos jovens e adultos com idades compreendidas entre 15-44 anos (WHO, 2008).

O comportamento suicida inclui três categorias: ideias suicidas, tentativas de suicídio e suicídio consumado. As ideias suicidas, caracterizam-se por pensamentos e gestos com intuito de por termo à vida. As tentativas suicidas reflectem um misto de sentimentos no qual o indivíduo tem a necessidade de chamar a atenção ameaçando e tentando o suicídio, no entanto o indivíduo tem uma grande vontade de viver. No suicídio consumado, o indivíduo atinge o seu principal objectivo com sucesso, a morte (Nock et al., 2008).

O suicídio pode ser consumado por dois métodos diferentes, o método violento e o método não violento (Ajdacic-Gross et al., 2008). O método violento inclui essencialmente armas de fogo e enforcamento e é o mais utilizado no sexo masculino. O método não violento inclui intoxicação por medicamentos, drogas ou pesticidas e é o mais utilizado no sexo feminino (Ajdacic-Gross et al., 2008; Canetto, 2008). Este apresenta uma maior taxa de tentativas de suicídio, mas é no sexo masculino que se verifica maior taxa de suicídios. Segundo a OMS a taxa de suicídio é 3,5 vezes maior em homens do que em mulheres (WHO, 2005).

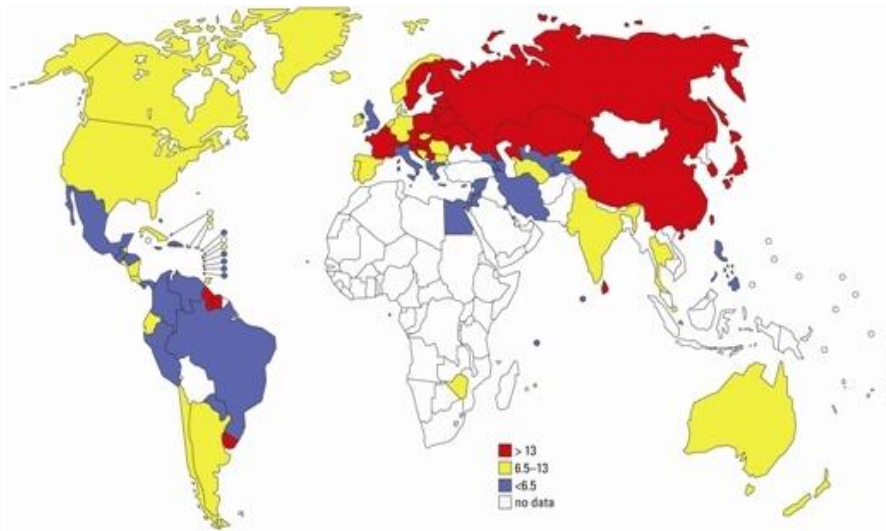


Figura 1- Mapa referente à taxa de suicídio no mundo em 2008.

Adaptado de WHO, 2008.

1.2 - Considerações gerais de genética

1.2.1 - Genoma humano e marcadores genéticos

O Genoma humano consiste na informação genética total de uma célula nucleada e distribui-se por 23 pares de cromossomas (22 pares de autossomas e 1 par de cromossomas sexuais). Os genes estão localizados em posições específicas da sequência de DNA, denominadas *locus*, e uma forma alternativa de um gene designa-se alelo. Cada indivíduo tem o seu próprio genoma, com características específicas que o diferenciam dos outros indivíduos, apesar da sequência do genoma ser idêntica na mesma espécie. As diferenças entre cada indivíduo da mesma espécie devem-se a variantes genéticas. Assim, polimorfismo genético define-se como a coexistência de duas ou mais formas alélicas ou sequências de DNA no mesmo *locus*, em que o alelo raro apresenta uma frequência de 1%, numa população (Burmeister, 1999). Os polimorfismos genéticos, com localização conhecida na sequência de DNA, são denominados marcadores genéticos e são usados em estudos genéticos. Na literatura são conhecidos os seguintes polimorfismos: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

(RFLP), Minisatélites ou *Variable Number Tandem Repeats* (VNTRs), Microsatélites ou *Short Tandem Repeats* (STRs) e os *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Haines & Pericak-Vance, 1998).

O RFLP consiste na alteração de um par de bases na sequência de DNA, alterando o local de restrição da enzima, sendo o primeiro polimorfismo a ser identificado e usado como marcador no estudo de doenças complexas (Bottstein et al., 1980; Haines e Pericak-Vance, 1998). Os VNTRs são caracterizados pela variação de comprimento entre dez a cem pares de bases na sequência do DNA, que se repetem várias vezes ao longo do genoma e são muito polimórficos (Nakamura et al., 2009). Os STRs são sequências repetitivas de um a dez pares de bases (Haddley et al., 2008). Os SNPs caracterizam-se pela substituição de um único nucleótido na sequência de DNA e são actualmente os mais utilizados no mapeamento de genes de susceptibilidade de doenças multifactoriais, uma vez que são os mais abundantes e dispersos no genoma humano e permitem a automatização do processo. Grande parte da variabilidade genética humana deve-se à existência de SNPs, sendo estes também responsáveis pelas diferentes respostas numa terapia farmacológica (The International SNP Map Working Group, 2001; Nakamura, 2009).

Os polimorfismos podem estar localizados na região codificante (exões), nas regiões reguladoras 5`UTR e 3`UTR e nas regiões não codificantes (intrões). Um polimorfismo presente na região codificante pode ser sinónimo ou não-sinónimo. Neste, a sequência de aminoácidos sintetizada é alterada, modificando as propriedades e funções da proteína, enquanto no polimorfismo sinónimo não há alteração dos aminoácidos. Os polimorfismos presentes nas regiões reguladoras e não codificantes podem estar associados a alterações funcionais, afectando a expressão do gene (Tabor et al., 2002).

1.2.2 - Projectos do genoma humano e HapMap

O projecto de Genoma Humano (PGH) consistiu de um consórcio internacional, fundado em 1990 e representa um marco na Genética Humana, contribuindo bastante para a evolução ao nível da investigação biomédica. O PGH tinha como principal objectivo determinar as sequências de nucleótidos (cerca de 3 bilhões) que constituem o DNA, e mapear cada um dos genes nos 23 pares de cromossomas humanos. No genoma humano existem aproximadamente entre 20 000 a 25 000 genes e grande parte deste terá funções estruturais e reguladoras (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Posteriormente, e com base no PGH, surgiu o projecto internacional do HapMap. Este tinha como objectivo estabelecer os padrões comuns de diversidade genética em quatro diferentes populações mundiais (distribuídas pelos continentes Africano, Europeu e Asiático), estudando as frequências e correlação entre SNPs de diferentes populações (The International HapMap Consortium, 2003). O estudo das frequências e correlações entre os SNPs realizou-se com base no *Linkage Disequilibrium* (LD) e foi possível identificar haplotipos, os quais são caracterizados por combinações de alelos ou conjunto de variações genéticas que se encontram no mesmo cromossoma e tendem a ser herdados juntos. Desta forma, os SNPs através dos quais é possível obter informação suficiente sobre os restantes SNPs da mesma região cromossómica denominam-se tagSNPs, e utilizando estes permitem a redução dos custos de genotipagem (The International HapMap Consortium, 2005).

O projecto do HapMap é muito importante para o estudo de doenças complexas, permitindo a identificação de genes candidatos.

As doenças complexas são as mais comuns, e os estudos de associação são importantes para a investigação de genes de susceptibilidade das mesmas, e caracterizam-se por estudar a frequência de um polimorfismo de um gene, num grupo de indivíduos afectados pela doença por comparação com um grupo de indivíduos não afectados. Os estudos de associação têm maior poder estatístico para detectar genes de pequeno efeito comparativamente aos estudos de *linkage*, e não é necessário conhecer o modo de transmissão familiar da doença, no entanto a selecção do grupo controlo é

muito importante (Lander & Schork, 1994). Um gene candidato de uma doença complexa é seleccionado por exemplo, se o gene estiver biologicamente associado à doença, ou com base em estudos de *linkage* realizados anteriormente, através dos quais se estabeleceu uma relação entre o *locus* do gene e a doença em estudo (Tabor et al., 2002; Healy, 2006).

1.3 - Genética do comportamento suicida

O comportamento suicida é uma doença multifactorial complexa que resulta da interacção gene-gene e gene-ambiente (Nock et al., 2008). A componente genética foi comprovada por estudos familiares, de gémeos e de adopção, sendo estimada em 50% (Brent & Mann, 2005)

Recentemente a genética do comportamento suicida foi revista por Brezo e colaboradores (2008). A nível mundial, vários estudos investigaram genes candidatos dos sistemas de neurotransmissores na etiologia do comportamento suicida. O sistema serotoninérgico tem sido o mais estudado e entre os vários genes implicados na etiologia do comportamento suicida, o gene que codifica o transportador da serotonina (5-HTT) e o gene que codifica a enzima Triptofano Hidroxilase (TPH) têm sido associados ao suicídio em diferentes populações mundiais (Brezó et al., 2008). Contudo, é necessário efectuar mais estudos com novos genes candidatos, nomeadamente os genes das neurotrofinas e genes envolvidos na via de transdução de sinal, de forma a esclarecer o papel dos mesmos na etiologia do suicídio.

1.4 - Factores neurotróficos

1.4.1 - Caracterização geral

As neurotrofinas são proteínas diméricas, que pertencem à subfamília dos factores de crescimento denominados factores neurotróficos. Esta subfamília é constituída por: *Nerve Growth Factor* (NGF), *Brain-Derived Neurotrophic factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3), *Neurotrophin-4/5* (NT-4/5). Estas são expressas no sistema nervoso central e periférico de mamíferos e estão envolvidos na sobrevivência, diferenciação e crescimento celular e neuronal, desempenhando também um papel importante ao nível da plasticidade sináptica (Bath & Lee, 2006). Esta, é um processo de reforço positivo ou negativo da comunicação entre neurónios, através do qual é formada a memória e a aprendizagem. Estas funções cognitivas são específicas de determinadas áreas do cérebro, particularmente o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (Lewin & Barde, 1996). As neurotrofinas são sintetizadas a partir de proteínas precursoras (30-35kDa), as proneurotrofinas, as quais sofrem alterações bioquímicas, sendo clivadas por pró-convertases até atingirem a forma madura. Nesta forma, as neurotrofinas formam dímeros não-covalentes estáveis e apresentam elevado grau de semelhança com cerca de 50% de aminoácidos comuns, que lhe conferem características bioquímicas semelhantes entre si (Lebmann et al., 2009).

A síntese de proneurotrofinas ocorre ao nível do retículo endoplasmático, sendo em seguida endereçadas para o complexo de Golgi. Neste, o domínio pro liga a proteína sortilina e estimula o correcto enrolamento do domínio maduro com a carboxipeptidase E (CPE) (Kuczewski et al., 2009). A enzima CPE selecciona qual a via que a neurotrofina vai seguir, ou seja, esta enzima é responsável pelo endereçamento das neurotrofinas para a via regulada por Ca^{2+} , na qual a neurotrofina se encontra armazenada dentro de vesículas grandes e o ião Ca^{2+} desempenha um papel de estimulador na libertação da neurotrofina. A neurotrofina BDNF segue esta via, no entanto o NGF não tem a sequência que liga à enzima CPE, seguindo a via secretora constitutiva, na qual não é necessário o ião Ca^{2+} para que a neurotrofina seja libertada.

Na via secretora constitutiva, as neurotrofinas estão armazenadas em vesículas pequenas e cada uma das vias liberta a neurotrofina em locais específicos do neurónio. A via secretora constitutiva é responsável por processos próximos, libertando a neurotrofina no corpo celular, enquanto a via regulada por Ca^{2+} é responsável por processos a longa distância. Ainda no complexo de Golgi, a proteína furina ou a proteína convertase 1 (PC1) clivam, no interior da célula, a forma pro da neurotrofina, originando a forma madura da neurotrofina. No entanto, esta clivagem pode ocorrer fora da célula por metaloproteínases (MMPs) ou pela plasmina (Kuczewski et al., 2009) (Figura 2).

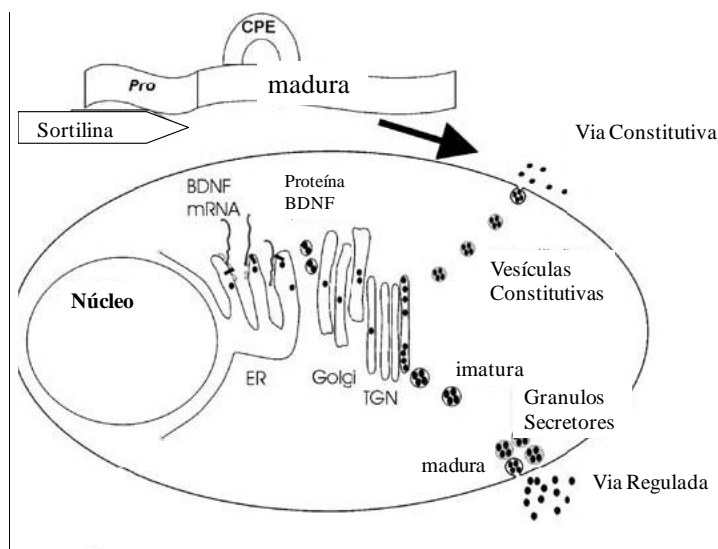


Figura 2- Esquema representativo da síntese, armazenamento e libertação de BDNF. A pré-pro-BDNF é sintetizado e sequestrado no retículo endoplasmático (ER). O Pró-BDNF transita o aparelho de Golgi e acumula-se na membrana do Golgi trans. Neste local, pode seguir-se duas vias: a constitutiva e a regulada. A forma pró-BDNF é endereçada para a via regulada, uma vez que a forma pro interage com a sortilina e a forma madura do BDNF com a carboxipeptidase E. A via regulada é dependente de Ca^{2+} . Adaptado de Kuczewski et al., 2009.

O transporte axonal é essencial para a activação das vias de sinalização das neurotrofinas e ao longo do axónio pode ocorrer de duas formas diferentes: transporte anterógrado e/ou transporte retrógrado. O transporte anterógrado é caracterizado pelo movimento de proteínas, vesículas sinápticas e alguns componentes da membrana plasmática do corpo celular até à dendrite, mais precisamente até ao nervo terminal. Salienta-se que o transporte retrógrado, permite a eliminação de proteínas não desejadas que se encontram na região do terminal nervoso, bem como a recepção por parte do neurónio de informação do meio extracelular, promovendo o aumento do número de respostas deste a diferentes estímulos, originando várias respostas na célula (Reynolds et al., 2000). No transporte retrógrado ocorre o transporte de proteínas no sentido contrário, desde o terminal nervoso da dendrite até ao corpo celular.

1.4.2 - Neurotrofina BDNF

A neurotrofina BDNF é largamente expressa em várias regiões do cérebro, nomeadamente no hipocampo, no córtex, no cerebelo e no prosencéfalo basal. Estas áreas são responsáveis por funções complexas no organismo, destacando-se a aprendizagem, a memória e a reflexão. O BDNF actua ao nível dos neurónios do sistema nervoso central e periférico, promovendo a sobrevivência dos neurónios existentes e o crescimento e diferenciação de novos neurónios. O BDNF está também envolvido nos processos de plasticidade sináptica (Bath & Lee, 2006), neurodegeneração e neuroinflamação (Hu et al., 2008). Além disso, o BDNF interage em diferentes sistemas de neurotransmissores, nomeadamente o sistema serotoninérgico, glutamatérgico e dopaminérgico (Tapia-Arancibia et al., 2004).

1.4.3 - Receptores de neurotrofinas

As neurotrofinas têm a capacidade de ligar a duas famílias de receptores diferentes, os receptores *tropomyosin-related kinase* (Trk) e os receptores *pan-75*

neurotrophin (p75^{NTR}) (figura 3). A célula pode desencadear uma resposta de morte celular ou de sobrevivência celular, consoante o receptor que é activado, por acção das neurotrofinas (Chen et al., 2009).

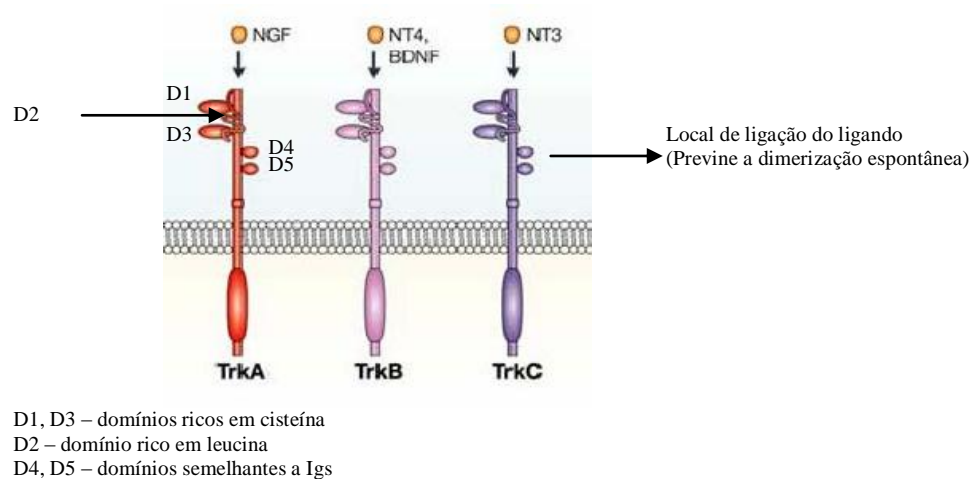


Figura 3- Receptores de tirosina Cinase: TrkA, TrkB, TrkC e respectivas neurotrofinas. Adaptado de Chao. 2003.

Os receptores Trk pertencem à superfamília dos receptores de tirosina cinase. O seu nome *Tropomyosin-related kinase* deriva do oncogene no qual estas estruturas foram identificadas pela primeira vez (Huang & Reichardt, 2003). Uma vez ligados às neurotrofinas, os Trk desencadeiam um sinal positivo na célula, promovendo o seu crescimento e a sua sobrevivência. Os receptores Trk possuem um domínio extracelular, caracterizado por dois clusters ricos em cisteínas, um *repeat* rico em leucinas e dois domínios semelhantes às imunoglobulinas, sendo responsável pela especificidade dos receptores Trk, e um domínio intracelular conservado em todos os receptores, no qual se encontram os resíduos de tirosina cinase. Estes receptores estão activos na forma dimérica, ou seja o ligando interage com o receptor e este dimeriza. Posteriormente, ocorre autofosforilação das cinases presentes na porção citoplasmática do receptor, sendo activadas as vias de sinalização *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK), *Phosphoinositide 3 Kinase* (PI3K) e *Phospholipase-C* (PLC), responsáveis pelas funções biológicas da célula (figura 4). A activação dos receptores Trk mediada por

neurotrofinas regula as vias que são responsáveis pela proliferação, sobrevivência, crescimento e remodelação de factores dendríticos e axonais, remodelação e estrutura do citoesqueleto, tráfico membranar e plasticidade sináptica (Huang & Reichardt, 2003).

Cada receptor é específico, devido ao seu domínio extracelular, para determinadas neurotrofinas, sendo portanto esta resposta dada em função da neurotrofina que se liga ao receptor. O NGF liga com maior afinidade ao receptor TrkA, tendo o BDNF e NT-4/5 mais afinidade para o TrkB, enquanto o NT-3 liga com maior afinidade ao receptor TrkC (Bath & Lee. 2006), figura 4.

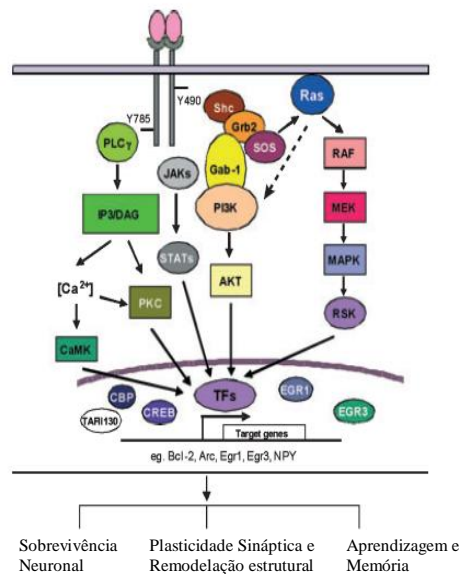


Figura 4- Vias de sinalização activadas por acção dos receptores Trk.

As NT ligam aos receptores TrK, induzindo dimerização do receptor e autofosforilação dos resíduos específicos de tirosina. Desta forma, múltiplas vias de sinalização, como: Ras/MAPK, PI3K cinases/AKT, inositoltrifosfato (IP3)-Ca²⁺/CaMK, proteína cinase C (PKC) são activadas. Como consequência da activação das vias de sinalização, os factores de transcrição são activos, havendo transcrição de genes e várias respostas na célula. Adaptado de Hu et al., 2008.

Os receptores *pan75^{NTR} neurotrophins* são membros dos receptores da superfamília dos factores de necrose tumoral. O p75^{NTR} liga a todas as neurotrofinas e pró-neurotrofinas com igual afinidade (Hu et al., 2008). O receptor p75^{NTR} não tem domínio catalítico, no entanto por interacção com moléculas adaptadoras, mediadas pelo domínio adjacente à membrana intracelular e pelo domínio *death*, têm a capacidade de ligar várias proteínas, nomeadamente os receptores Trk, levando ao aumento da especificidade e afinidade do ligando ao receptor. O p75^{NTR} receptor tem um duplo papel na célula, podendo desempenhar funções opostas na mesma. Uma vez activo, o receptor p75^{NTR} pode induzir a activação de vias apoptóticas, causando morte celular. No entanto, pode também contribuir para a sobrevivência da célula, transmissão sináptica, plasticidade e migração celular (Chen et al., 2009).

1.5 - Genes candidatos das neurotrofinas no suicídio

Várias evidências sugerem que as neurotrofinas poderão desempenhar um papel importante na etiologia do suicídio. Por exemplo, estudos *postmortem* realizados em vítimas de suicídio revelaram alterações nos níveis de expressão de neurotrofinas e dos seus respectivos receptores em diferentes regiões do cérebro, nomeadamente no hipocampo e no córtex pré-frontal (Dwivedi et al., 2003; Dwivedi et al., 2005; Karege et al., 2005; Pandey et al., 2008; Perroud et al., 2008; Dwivedi et al., 2009). Além disso, estudos genéticos realizados no gene BDNF com tentativas de suicídio, em amostras de doentes com depressão (Iga et al., 2007), com esquizofrenia (Huang & Lee, 2007), e com a doença bipolar (Kim et al., 2008) mostraram associação entre este polimorfismo e as tentativas de suicídio, nas amostras de doentes referidas. Por outro lado, estudos de expressão com o BDNF sugerem que este interage em diferentes sistemas de neurotransmissores, como por exemplo o sistema serotoninérgico (Tapia-Arancibia et al., 2004), o qual tem sido implicado no suicídio.

O gene que codifica o BDNF está localizado no cromossoma 11p13 (Maisonpierre et al., 1991), e o SNP Val66Met identificado consiste numa substituição do aminoácido Valina pelo aminoácido Metionina, no codão 66 localizado na região do

domínio pro do gene pro-BDNF (figura 5). O polimorfismo Val66Met, devido à sua localização vai interferir com a ligação do domínio pró com a proteína sortilina. A troca de aminoácido leva a uma perda da capacidade do domínio pró da neurotrofina interagir com a proteína sortilina e, como consequência não ocorre o correcto *folding* da região madura da neurotrofina com a enzima CPE. Esta enzima, como referido anteriormente, é responsável pelo endereçamento da pró-neurotrofina para a via secretora regulada por Ca^{2+} , com repercussões ao nível do tráfico intracelular da pró-neurotrofina e da actividade dependente da secreção desta molécula na sua forma madura, levando assim a disfunções no organismo (Egan et al., 2003; Chen et al., 2005).

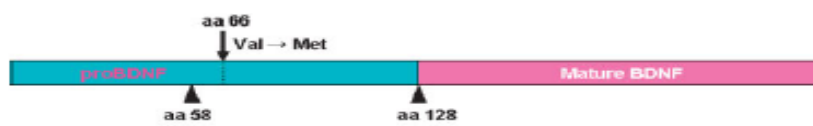


Figura 5 - Esquema do gene BDNF, com a localização do polimorfismo Val66Met. Adaptado de Hashimoto et al., 2007.

O receptor p75^{NTR} tem sido implicado também na etiologia do suicídio. No estudo *postmortem* realizado por Dwivedi e colaboradores (2009) avaliou-se o nível de expressão do receptor p75^{NTR} no cérebro de vítimas de suicídio, e o resultado obtido revelou um aumento dos níveis de RNAm de p75^{NTR} no córtex pré-frontal e no hipocampo. Um estudo genético do polimorfismo S205L no gene p75^{NTR} realizado por Kunugi et al. (2004) revelou uma associação do polimorfismo referido com o comportamento suicida, numa amostra de doentes com depressão.

O gene que codifica o receptor p75^{NTR} está localizado no cromossoma 17q21-q22 (Huebner et al., 1986), sendo formado por seis exões e cinco intrões (Sehgal et al., 1988). O polimorfismo S205L, localizado no exão IV, resulta da substituição do aminoácido serina pelo aminoácido leucina no códon 205 da proteína (Haga et al., 2002) e poderá estar associado a alterações funcionais do receptor.

Assim, com base nas evidências mencionadas anteriormente, os genes que codificam as neurotrofinas e seus receptores, em particular os genes BDNF e o receptor p75^{NTR} são candidatos promissores para a etiologia do suicídio. Contudo, os estudos que

relacionam o comportamento suicida com neurotrofinas são escassos a nível mundial (Brezo et al. 2008), particularmente em Portugal não existe nenhum estudo genético efectuado.

1.6 - Mecanismo de transdução de sinal: Proteína Cinase G

1.6.1 - Caracterização geral

O monóxido de azoto (NO) é um gás solúvel que se forma por acção da enzima sintetase do óxido nítrico (NOS) no processo de conversão do aminoácido L-arginina no aminoácido L-citrulina. A enzima NOS existe em três formas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e a NOS indutível (iNOS), sendo as duas primeiras formas da NOS denominadas constitutivas e dependentes de cálcio. A formação de NO induz activação da enzima guanil ciclase solúvel (sGC), que é responsável pela formação do mensageiro secundário monofosfato guanosina cíclico (GMPc) (Hofmann et al., 2009). O GMPc desempenha algumas funções fisiológicas, tais como regulação específica de fosfodiesterases, activação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG) e outras cinases, regulação de canais iónicos, entre outras. O GMPc está também envolvido na transdução de sinal neuronal e mecanismos de long-term potentiation (LTP)/ long-term depression (LTD), participando assim em processos de memória e aprendizagem.

A PKG pertence à família das cinases serina/treonina. Esta família é constituída por duas formas de PKGs, a PKGI e PKGII. Estas PKGs são distribuídas de forma diferente nos eucariotas. A PKGI está presente nos músculos do estômago, plaquetas, hipocampo, amígdala lateral e células de Purkinge. A PKGII é distribuída pelo epitélio do intestino pequeno, células justaglomerulares, córtex adrenal e condrócitos. Contudo, ambas as isoformas são moduladoras de crescimento celular. Desta forma, a PKG desempenha várias funções, nomeadamente na activação de vias de sinalização em células pós-sinápticas, na mobilização de vesículas sinápticas na célula pré-sináptica e libertação de neurotransmissores, na plasticidade sináptica e na formação de memória (Hofmann et al., 2009).

A PKG é constituída por dois domínios: o domínio regulador e o domínio catalítico. O domínio regulador é constituído pelo terminal N (responsável pela homodimerização, supressão de actividade cinase na ausência de GMPc e interacção com outras proteínas), e por dois locais (um local com alta afinidade e outro local com baixa afinidade por GMPc), não idênticos, de ligação do GMPc. No domínio catalítico estão presentes: MgATP e locais onde ligam peptídeos. A ligação de GMPc no domínio regulador (no local de alta e baixa afinidade) induz alteração conformacional, permitindo a activação do domínio catalítico, sendo assim possível a fosforilação de resíduos de serina/treonina em proteínas alvo e na própria PKG, aumentando a actividade de PKG (Hofmann et al., 2009).

1.6.2 - Gene candidato da PKG no suicídio

Segundo a bibliografia descrita, nos mamíferos, as duas formas de PKG: PKGI e PKGII são codificadas por dois genes diferentes, o PRKG1 e PRKG2, respectivamente. O gene humano PRKG1 está localizado no cromossoma 10 p11.2-q11.2 é constituído por 15 exões e apresenta duas isoformas, PKGI α e PKGI β (Orstavik et al., 1992; Orstavik et al., 1997), que resultam do processo de splicing alternativo na região do terminal N.

A PKGI é expressa em regiões do cérebro (hipocampo, cerebelo e amígdala), desempenhando funções ao nível da plasticidade sináptica, da activação de vias de sinalização em células pós-sinápticas, da mobilização de vesículas sinápticas na célula pré-sináptica e libertação de neurotransmissores (Hofmann et al., 2009). Alguns estudos indicam que a via de sinalização NO-GMPc-PKG surge associada a vários processos importantes em funções complexas do ser humano, como regulação do tempo e qualidade do sono (Feil et al., 2009), plasticidade sináptica e consolidação de memória associada ao medo (Ota et al., 2008), e memória declarativa (Furini et al., 2009), e estes processos podem estar relacionados com a activação da cascata de sinalização de ERK/MAPK. Além disso, o neurotransmissor NO, importante na formação de PKG, tem sido implicado na modulação de alguns neurotransmissores, como por exemplo, a

serotonina que tem sido implicada no comportamento suicida (Chiavegatto & Nelson, 2003). Face às evidências apresentadas, e uma vez que a PKG desempenha várias funções, nomeadamente na activação de vias de sinalização em células pós-sinápticas, na mobilização de vesículas sinápticas na célula pré-sináptica e libertação de neurotransmissores, colocámos a hipótese de que variantes genéticas no gene PRKG poderão eventualmente desempenhar um papel importante na susceptibilidade para o suicídio. Como a nível mundial não existem estudos genéticos efectuados no gene PRKG1, a hipótese colocada poderá ser uma mais-valia para a compreensão da etiologia do suicídio.

1.7 - Objectivos

A etiologia do suicídio permanece por esclarecer. Algumas evidências sugerem que variantes genéticas nos genes de neurotrofinas e de genes de proteínas envolvidas em mecanismos de transdução de sinal poderão estar implicados no suicídio, como por exemplo os genes BDNF, p75^{NTR} e PRKG1. No entanto, a investigação relacionada com genes de neurotrofinas é escassa e para o gene PRKG1 é inexistente.

Assim sendo, o objectivo deste trabalho consistiu em investigar a potencial investigação entre polimorfismos nos genes BDNF, p75^{NTR} e PRKG1 e o suicídio, numa amostra da população portuguesa.

2 - Material e métodos

2.1 - Selecção da amostra

Após consulta ao Registo Nacional de Não-Dadores (RENDA) (Decreto de Lei nº 244/94, September 26), as amostras de sangue periférico foram recolhidas (cerca de 10 ml) para tubos com anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (BD Vacutainer™ K3E 15%, BD Vacutainer Systems), no decorrer de autópsias Médico Legais, no Instituto Nacional de Medicina Legal. Como mencionado na introdução, Capítulo 1, existem métodos violentos e não violentos para consumar o suicídio. O método violento inclui essencialmente: armas de fogo, enforcamento, afogamento; o método não violento inclui ingestão excessiva de medicamentos, intoxicações por insecticidas, entre outros.

A amostra de vítimas de suicídio violento e não violento é constituída por indivíduos de ambos os sexos num total de 276, com idades compreendidas entre 16 a 86 anos (sexo masculino 202 indivíduos; sexo feminino 74 indivíduos). O grupo controlo é constituído por 281 indivíduos de ambos os sexos, sem historial de doenças psiquiátricas e inclui vítimas de causa natural, acidentes de viação ou de trabalho. As idades do grupo controlo estão compreendidas entre 15 e 88 anos (sexo masculino 213 indivíduos; sexo feminino 68 indivíduos).

2.2 - Extração de DNA genómico

2.2.1 - Fundamentos teóricos

Segundo a literatura descrita, o método de extração de DNA tem evoluído ao longo dos anos, existindo actualmente, diferentes métodos de extrair DNA a partir de sangue humano, como por exemplo extração enzimática, com fenol-clorofórmio e em fase sólida, na qual se usam kits comerciais.

O método de extracção de DNA genómico é constituído por diferentes passos: a ruptura das células, destruição das membranas lipídicas, inactivação de nucleases, precipitação de DNA e solubilização do mesmo (Chee Tan & Chin Yiap. 2009).

A extracção enzimática de DNA genómico tem vantagens relativamente às restantes técnicas de extracção, na qual se obtém elevado rendimento e grau de pureza da amostra, bem como DNA de alto peso molecular. Além disso, é um método simples e rápido, no qual não são usados reagentes tóxicos. Uma das principais características da extracção enzimática é a remoção das proteínas por *salting-out*, devido ao uso de uma solução de NaCl saturada responsável pela desidratação e precipitação de proteínas (Miller et al., 1988; Nasiri et al., 2005). As características mencionadas são importantes para as técnicas subsequentes de análise de DNA, como por exemplo a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Esta é uma técnica sensível, em que contaminações com proteínas, lípidos e RNA podem interferir com o resultado final da amplificação de DNA (Crowe et al., 1991).

2.2.2 - Descrição do protocolo de extracção de DNA

A extracção de DNA genómico foi efectuada com base num protocolo adaptado (Miller et al., 1988).

O processo de extracção de DNA inicia-se com uma hemólise. Assim, adicionou-se à amostra de sangue (10 ml) três vezes o volume de sangue de uma solução de lise (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (Sigma), a pH 7,4). Em seguida, a amostra é homogeneizada e colocada em gelo cerca de 20 minutos. Posteriormente, efectua-se uma centrifugação a 2500 rpm (Centrífuga refrigerada Rotenta 460R, Hettich), durante 15 minutos a 4°C. Após ressuspender o pellet obtido com uma solução de lise, o passo de centrifugação é repetido a 2800 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C durante a noite no shaker (Forma Orbital Skaker, Thermo), contendo 4 ml de uma solução tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM (Sigma), pH=8), 350 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (Sigma) e 30 µl de proteinase K (20 mg/ml) (Invitrogen).

A incubação tem como objectivo lisar os glóbulos brancos, destruir as membranas lipídicas e remover proteínas (histonas) associadas ao DNA, bem como destruir nucleases. Procedeu-se à precipitação de proteínas com uma solução saturada de NaCl 6M (Sigma), seguida de uma centrifugação a 3750 rpm, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Ao sobrenadante obtido adicionou-se duas vezes o volume de etanol absoluto para precipitação de DNA, sendo este removido com uma ansa estéril e posteriormente lavado em etanol a 70%. Por último, o DNA foi solubilizado na solução de Tris-EDTA (Tris-HCL 10 mM, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM, pH 7,4 (Sigma)) e conservado a 4°C.

2.3 - Determinação da concentração e pureza de DNA

A quantificação de DNA por espectrofotometria é baseada na Lei de Beer-Lambert. Esta relaciona a absorção de luz com as propriedades do material atravessado por esta mesma luz, sendo esta relação dada pela expressão $A = \epsilon lc$, em que A corresponde à absorvância, ϵ ao coeficiente de absorção, l à distância que luz atravessa na amostra e c à concentração da amostra (Owen-Reece et al., 1999).

A concentração de DNA genómico é quantificada através de um espectrofotómetro (Smart SpecTM Plus, Bio-Rad), efectuando-se a absorvância a 260 nm, comprimento de onda no qual absorvem as bases azotadas da molécula de DNA e calcula-se a concentração de DNA através da fórmula, na qual a constante da dupla hélice é 50 µg/ml.

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = \text{D.O.260nm} \times \text{constante da dupla hélice} \times \text{factor de diluição}$$

Afim de avaliar também o grau de pureza da amostra de DNA, lê-se a absorvância a 280 nm, comprimento de onda no qual absorvem as cadeias aromáticas dos aminoácidos. A partir do cálculo da razão entre a absorvância a 260 nm e a absorvância a 280 nm, obtém-se o grau de pureza da amostra de DNA. Para valores abaixo de 1,5, a

amostra está contaminada com proteínas (Miller et al., 1988), e para valores acima de 2 contaminada com RNA (Glasel, 1995).

2.4 - Fundamentos teóricos sobre amplificação de DNA genómico, enzimas de restrição e electroforese

2.4.1 - Amplificação de DNA genómico

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983 e caracteriza-se por amplificar de forma exponencial os fragmentos de DNA (Erlich et al., 1988).

A reacção de PCR decorre entre 30-40 ciclos e inclui três passos principais: desnaturação, emparelhamento específico dos primers e extensão da nova cadeia de DNA (Figura 6).

Para a amplificação de DNA é necessário DNA template; um par de oligonucleótidos sintéticos (primers), os quais têm uma extensão variável entre dezoito e trinta pares de bases, sendo complementares à sequência de DNA a amplificar; desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), importantes na síntese da cadeia da DNA; cofactor magnésio (Mg^{2+}), fundamental na especificidade e quantidade de produto final de amplificação, uma vez que é essencial para a actividade da Taq DNA Polimerase; solução tampão e Taq DNA Polimerase, enzima termoestável importante na catálise da reacção. Esta enzima actua a uma temperatura óptima de 72°C, mas é resistente a altas temperaturas não sendo destruída aquando do processo de desnaturação (White, 2005).

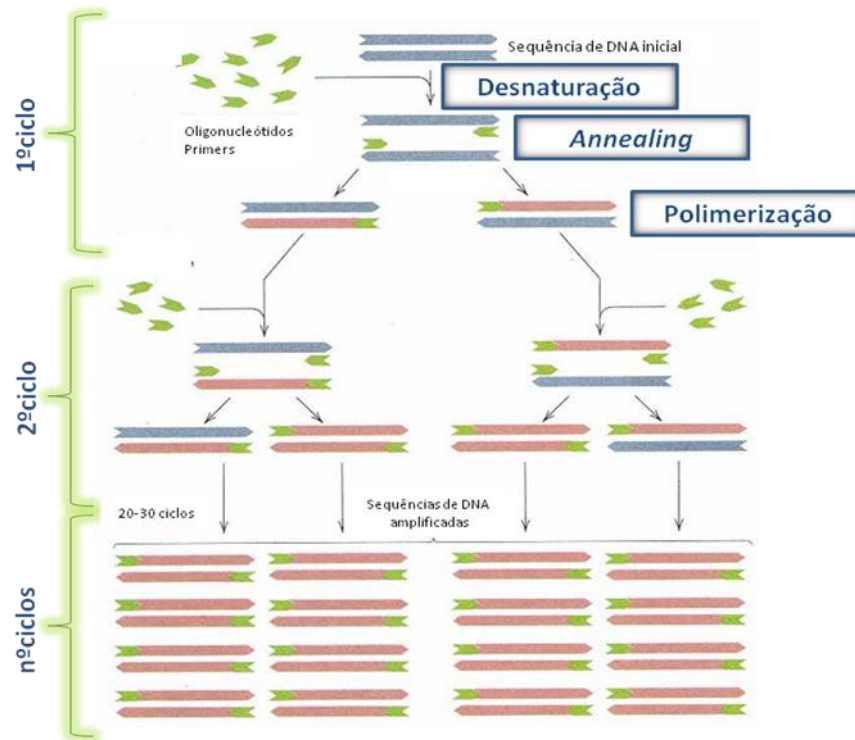


Figura 6- Esquema representativo da reacção de PCR, no qual se identifica os 3 principais passos da técnica: desnaturação de DNA genómico, emparelhamento dos primers na cadeia de DNA e extensão da cadeia de DNA catalizada pela Taq DNA Polimerase. Adaptado de Hartl et al., 1998

Numa reacção de PCR, existem factores importantes a ser optimizados de uma forma rigorosa, tornando a técnica de PCR muito sensível. A temperatura de *annealing* e a concentração de magnésio são os factores mais importantes, contudo é necessário ter em conta a concentração de Taq DNA Polimerase, de dNTPs e de DNA genómico (Bej et al., 1991). A temperatura de *annealing* alta, induz a não ligação dos primers à sequência de DNA alvo, não havendo amplificação do DNA. Por outro lado, a temperatura de *annealing* baixa, resulta na ligação inespecífica dos primers, havendo amplificação de outras sequências de DNA.

2.4.2 - Enzimas de restrição e electroforese

O produto de amplificação é digerido com enzimas de restrição específicas para o polimorfismo em estudo. As enzimas de restrição são endonucleases que clivam o DNA num local específico, obtendo-se assim pequenas sequências de DNA. A presença de um SNP pode originar um local de corte para a enzima de restrição ou pelo contrário pode perder o local de restrição (Videira, 2001).

Os fragmentos de DNA amplificados e digeridos com enzimas de restrição são analisados por electroforese em gel de agarose. A electroforese é uma técnica de análise de DNA, na qual ocorre migração de moléculas ao longo do gel (agarose ou poliacrilamida) por aplicação de corrente eléctrica, a pH constante. Assim, há separação dos fragmentos de DNA consoante o peso molecular (Videira, 2001).

A velocidade de migração da molécula de DNA varia com o tamanho do fragmento de DNA, sendo inversamente proporcional ao logaritmo do número de pares de bases. Quanto menor o peso molecular maior é a migração no gel e o contrário ocorre para os fragmentos maiores. A pH neutro, o DNA tem carga negativa (grupos fosfatos), migrando em direcção ao pólo positivo.

Na preparação do gel de agarose é utilizada uma solução tampão TBE (EDTA e Tris-borato) ou TAE (EDTA e Tris-acetato). Este tampão é também utilizado na electroforese. A solução tampão é importante para a mobilidade electroforética (condução eléctrica) de DNA. Contudo, é necessário ter em atenção a composição e força iónica da solução tampão, uma vez que quanto maior a força iónica maior será a quantidade de calor gerada, podendo assim desnaturar o DNA (Sambrook et al., 1989).

A densidade das amostras de DNA é conseguida utilizando uma solução de *loading dye* (corante), devido à presença de glicerol no corante. Além disto, o *loading dye* é também importante na coloração das amostras para monitorizar a sua migração no gel.

Quando o gel é exposto a radiações ultra-violeta, as bandas apresentam uma coloração alaranjada, uma vez que o brometo de etídio (substância cancerígena) intercala com a cadeia de DNA, permitindo assim a sua visualização (Sambrook et al.,

1989). O tamanho dos fragmentos de DNA das amostras são determinados por comparação com o marcador de peso molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas Life Science) aplicado no gel.

2.5 - Genotipagem de polimorfismos

2.5.1 - Polimorfismo Val66Met do gene BDNF

No estudo do polimorfismo Val66Met do gene BDNF, a sequência de DNA genómico foi amplificada por PCR, segundo o protocolo descrito por Neves-Pereira et al. (2002), com algumas modificações. Para um volume final de 25 µl adicionou-se 125 ng de DNA, solução tampão 1:10 de enzima Taq DNA Polimerase (Tris-HCl 200 mM, KCl 500mM, pH 8,4), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 200 µM (Roche), 0,4 µM de cada primer (Invitrogen) e 0,04 U/µl de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação de DNA genómico, iniciou-se desnaturando o DNA a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos com uma desnaturação de 30 segundos a 94°C, *annealing* dos primers a 60°C durante 30 segundos e polimerização da cadeia de DNA a 72°C durante 30 segundos. A extensão final decorreu durante 5 minutos a 72°C (PCR System 9700, Applied Biosystem).

A digestão do produto amplificado efectuou-se com a enzima Eco 72I (Fermentas Life Science), durante a noite a uma temperatura de 37°C.

Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 3,5%, corado com brometo de etídio (10 mg/ml) (Bio-Rad). Posteriormente, adicionou-se o corante: loading dye solution (xileno cianol 0,05% (m/v), azul bromofenol 0,05% (m/v) e glicerol 50% (v/v)) aos produtos de digestão, sendo estes aplicados no gel. Em seguida, procedeu-se à electroforese, num sistema de electroforese horizontal (Bio-RAd), a 90 volts, no qual foi usado a solução tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM). A visualização do gel efectuou-se no Gel Doc (Bio-Rad), sendo o tamanho dos fragmentos de DNA determinado por comparação com o marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas).

2.5.2 - Polimorfismo S205L do gene p75^{NTR}

A análise do polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} foi efectuada com base no protocolo adaptado de Kunugi et al. (2004). Procedeu-se à desnaturação de 50 ng de DNA durante 10 minutos a 95°C e posteriormente para um volume final de 25 µl adicionou-se uma solução tampão 1:10 de enzima Taq DNA Polimerase (Tris-HCl 200 mM, KCl 500mM, pH 8,4), MgCl₂ 1,25 mM, dNTPs 100 µM (Roche), 0,1 µM de cada primer (Invitrogen) e 0,04 U/µl de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação de DNA genómico decorreu num total de 35 ciclos: desnaturação de 30 segundos a 95°C, emparelhamento dos primers a 58°C durante 20 segundos e polimerização da cadeia de DNA a 72°C durante 30 segundos. A extensão final decorreu durante 3 minutos a 72°C (PCR System 9700, Applied Biosystem).

O produto amplificado foi digerido com a enzima BanII (New England Biolabs), durante a noite a uma temperatura de 37°C.

A fim de separar os produtos de digestão, adicionou-se corante: loading dye solution (xileno cianol 0,05% (m/v), azul bromofenol 0,05% (m/v) e glicerol 50% (v/v) às amostras e realizou-se a electroforese em gel de agarose a 4%, previamente corado com brometo de etídeo. A electroforese ocorreu num sistema horizontal (Bio-Rad), a 90 volts, no qual foi usado a solução tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM). A visualização do gel de agarose efectuou-se no Gel Doc (Bio-Rad) e por comparação com o marcador de peso molecular Phi-X174 RF DNA HaeIII (ABgene) determinou-se o tamanho dos fragmentos de DNA.

2.5.3 - Polimorfismo C2276T do gene PRKG1

A genotipagem do polimorfismo C2276T do gene PRKG1, foi realizada segundo o protocolo descrito por De Luca et al. (2002), com algumas modificações. O DNA genómico (125 ng) foi desnaturado a 95°C durante 5 minutos. A reacção de amplificação decorreu num volume de 25 µl com solução tampão 1:10 de enzima Taq DNA Polimerase (Tris-HCl 200 mM, KCl 500mM, pH 8,4), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200

μM (Roche), 1 μM de cada primer (Invitrogen) e 0,04 U/ μl de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O programa de amplificação consistiu em 35 ciclos com uma desnaturação de 30 segundos a 94°C, emparelhamento dos primers a 58°C durante 30 segundos e polimerização da cadeia de DNA a 72°C durante 30 segundos. A extensão final decorreu durante 4 minutos a 72°C (PCR System 9700, Applied Biosystem).

Os produtos amplificados foram incubados com a enzima de restrição AclI (New England Biolabs), durante a noite a uma temperatura de 37°C.

Aos fragmentos de digestão adicionou-se o corante loading dye solution (xileno cianol 0,05% (m/v), azul bromofenol 0,05% (m/v) e glicerol 50% (v/v)), e foram separados em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídio (10 mg/ml) (Bio-Rad). Em seguida, procedeu-se à electroforese, num sistema de electroforese horizontal (Bio-Rad), a 100 volts, no qual foi usado a solução tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM). A visualização dos produtos de digestão efectuou-se no sistema Gel Doc (Bio-Rad) e o tamanho dos mesmos foi determinado por comparação com o marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas).

2.6 - Análise Estatística

Para analisar estatisticamente os resultados obtidos para cada polimorfismo em estudo usou-se o teste do χ^2 . Assim foi possível comparar a distribuição genotípica, bem como as frequências alélicas entre o grupo de vítimas de suicídio e o grupo controlo. Os resultados foram considerados significantes para valores de $p < 0,05$.

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Gene BDNF

O gene BDNF localizado no cromossoma 11 (Maisonpierre et al., 1991), contém o polimorfismo Val66Met (G196A) no exão 3 da região do domínio pro do gene BDNF na forma precursora (Egan et al., 2003).

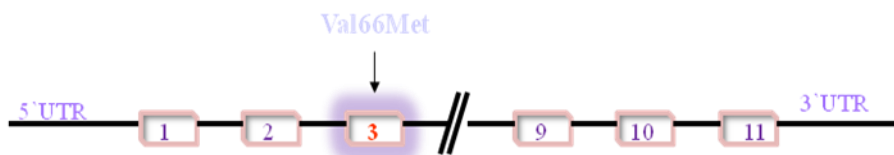


Figura 7 - Esquema representativo do gene BDNF e localização do polimorfismo Val66Met.

O estudo do polimorfismo Val66Met do gene BDNF foi realizada segundo o protocolo descrito em 2.5.1 do capítulo 2 de Material e Métodos. O perfil electroforético do produto de amplificação do polimorfismo Val66Met do gene BDNF está representado na figura 8a e o fragmento de amplificação tem 113 pb.

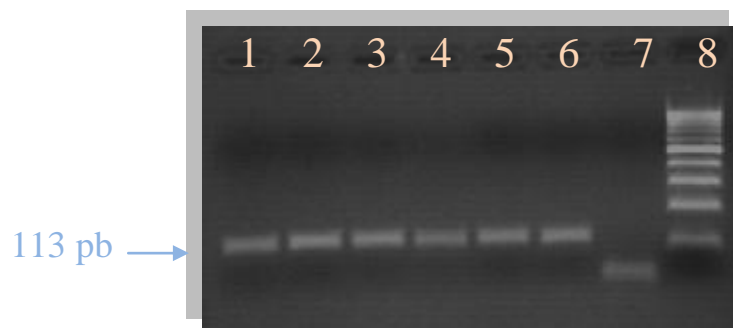


Figura 8a - Imagem do perfil electroforético do produto de amplificação referente ao polimorfismo Val66Met do gene BDNF. Legenda da figura: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem ao fragmento inicial amplificado de DNA. 7 corresponde ao controlo negativo. 8 é o marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas^R).

Os fragmentos de amplificação foram incubados com a enzima de restrição Eco72I, segundo a metodologia descrita em 2.5.1 de Material e Métodos, e os produtos de digestão estão representados na figura 8b. Obtiveram-se fragmentos de 113 pb para indivíduos homozigóticos dos alelos Met (A); 113 pb, 78 pb e 35 pb para indivíduos heterozigóticos para os alelos Val/Met (G/A); 78 pb e 35 pb para indivíduos homozigóticos dos alelos Val (G).

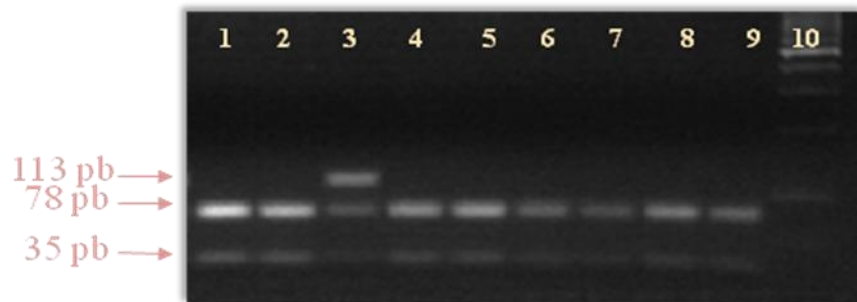


Figura 8b - Imagem referente à electroforese dos fragmentos de digestão obtidos para o polimorfismo Val66Met do gene BDNF usando a enzima de restrição Eco72I, em gel de agarose a 3,5%. Legenda da figura: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 são homozigóticos para o alelo Val. 3 é heterozigótico (Val/Met). 10 é o marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas^R).

A análise dos resultados obtidos no estudo do polimorfismo Val66Met do gene BDNF, na amostra total das vítimas de suicídio vs controlos estão representados na Tabela I. Não se detectaram diferenças estatisticamente significativas entre as vítimas de suicídio e o controlo, quer para a distribuição genotípica ($\chi^2=3,547$; $df=2$; $p=0,170$) quer para as frequências alélicas ($\chi^2= 0,000$; $df=1$; $p=0,998$).

Tabela I - Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo Val66Met do gene BDNF em vítimas de suicídio e controlos.

	Genótipos			Alelos	
	Met/Met (A/A)	Val/Met (A/G)	Val/Val (G/G)	Met (A)	Val (G)
Vítimas de Suicídio	7 (2,5%)	99 (35,9%)	170 (61,6%)	113 (20,5%)	439 (79,5%)
Controlo	14 (5%)	86 (30,6%)	181 (64,4%)	114 (20,2%)	448 (79,8%)

$\chi^2=3,547; df=2; p=0,170$
 $\chi^2=0,000; df=1; p=0,998$

Na população Portuguesa, o nosso estudo é o primeiro a investigar o papel do polimorfismo Val66Met na etiologia do suicídio. Salienta-se que a nível mundial, existe um único estudo genético realizado com o polimorfismo Val66Met do gene BDNF, em vítimas de suicídio na população da Eslovénia (Zarrilli et al., 2009), e os nossos resultados estão de acordo com o referido estudo, no qual não foi observada associação entre o polimorfismo Val66Met do gene BDNF e o suicídio. Alguns estudos efectuados com tentativas de suicídio numa amostra de doentes com depressão (Iga et al., 2007; Sarchiapone et al., 2008), esquizofrenia (Huang & Lee, 2007) e doença bipolar (Kim et al., 2008) das populações Japonesa, Italiana, Chinesa, Coreana, respectivamente, revelaram associação entre o polimorfismo Val66Met do gene BDNF e tentativas de suicídio. Num estudo realizado pelo nosso grupo observou-se uma associação entre o gene do receptor 5-HT6 do sistema serotoninérgico e o suicídio em indivíduos do sexo masculino (Azenha et al., 2009), neste contexto procedeu-se também a uma estratificação da amostra por género, no sentido de avaliar diferenças entre o sexo masculino e o sexo feminino. A distribuição genotípica e a frequência alélica do polimorfismo Val66Met do gene BDNF para indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino estão representadas nas Tabelas II e III.

Tabela II - Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo Val66Met do gene BDNF em vítimas de suicídio e controlos, no género masculino.

Género masculino	Genótipos			Alelos	
	Met/Met (A/A)	Val/Met (A/G)	Val/Val (G/G)	Met (A)	Val (G)
Vítimas de Suicídio	6 (3%)	72 (36%)	124 (61%)	84 (21%)	320 (79%)
Controlo	12 (5,6%)	62 (29%)	139 (65%)	86 (20%)	340 (80%)

$$\chi^2=3,313; df=2; p=0,191$$

$$\chi^2= 0,017; df=1; p=0,897$$

Tabela III - Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo Val66Met do gene BDNF em vítimas de suicídio e controlos, no género feminino.

Género feminino	Genótipos			Alelos	
	Met/Met (A/A)	Val/Met (A/G)	Val/Val (G/G)	Met (A)	Val (G)
Vítimas de Suicídio	1 (1,4%)	27 (36%)	46 (62%)	29 (20%)	119 (80%)
Controlo	2 (3%)	24 (35%)	42 (62%)	28 (21%)	108 (79%)

$$\chi^2=0,439; df=2; p=0,803$$

$$\chi^2= 0,004; df=1; p=0,952$$

Relativamente ao género, os resultados obtidos da análise do polimorfismo Val66Met do gene BDNF para ambos os sexos, não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre as vítimas de suicídio e controlos, quer para a distribuição genotípica (Masculino: $\chi^2=3,313$; $df=2$; $p=0,191$; Feminino: $\chi^2=0,439$; $df=2$; $p=0,803$) quer para a distribuição alélica (Masculino: $\chi^2= 0,017$; $df=1$; $p=0,897$;

Feminino: $\chi^2= 0,004$; $df=1$; $p=0,952$). O nosso estudo é o primeiro a investigar diferenças relativamente ao género com o polimorfismo Val66Met em vítimas de suicídio e o resultado obtido indica maior tendência dos homens para cometer suicídio quando comparados com as mulheres.

Na literatura estão descritas também diferenças entre suicídio violento e não violento, deste modo a amostra total foi dividida num subgrupo que inclui o suicídio violento (SV) e noutro subgrupo que inclui suicídio não-violento (SNV). Na Tabela IV estão representados os resultados obtidos para a distribuição genotípica e as frequências alélicas para o suicídio violento e não violento.

Tabela IV - Distribuição genotípica e Frequências alélicas referentes ao polimorfismo Val66Met do gene BDNF em vítimas de suicídio violento (SV), suicídio não violento (SNV) e controlos.

		Suicídio (SV)	Suicídio (SNV)	Controlos	
Genótipos	Met/Met (A/A)	6 (2,7%)	1 (1,8%)	14 (5%)	SV: $\chi^2=2,753$; $df=2$; $p=0,252$
	Met/Val (A/G)	79 (36%)	20 (36%)	86 (30,6%)	
	Val/Val (G/G)	136 (62%)	34 (62%)	181 (64,4%)	SNV: $\chi^2=1,563$; $df=2$; $p=0,458$
Alelos	Met (A)	91 (72%)	22 (20%)	114 (20%)	SV: $\chi^2= 0,002$; $df=1$; $p=0,968$
	Val (G)	35 (28%)	88 (80%)	448 (80%)	SNV: $\chi^2= 0,004$; $df=1$; $p=0,951$

A análise estatística referente ao polimorfismo Val66Met do gene BDNF para a amostra de vítimas de suicídio violento e para a amostra de vítimas de suicídio não violento quando comparados com a amostra controlo não revelaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica (Violento: $\chi^2=2,753$; $df=2$; $p=0,252$; Não violento: $\chi^2=1,563$; $df=2$; $p=0,458$) e nas frequências alélicas (Violento: $\chi^2= 0,002$; $df=1$; $p=0,968$; Não violento: $\chi^2= 0,004$; $df=1$; $p=0,951$).

Apesar de, não ter sido detectada associação entre o polimorfismo Val66Met do gene BDNF e o suicídio nos diferentes grupos estudados, a hipótese do envolvimento das neurotrofinas na etiologia do suicídio continua em aberto. De facto, alguns estudos de expressão revelam que o BDNF interage em diferentes sistemas de neurotransmissores, nomeadamente o sistema serotoninérgico (Tapia-Arancibia et al., 2004), o qual tem sido implicado no suicídio. Além disso, como mencionado na introdução, alguns estudos *postmortem* realizados em vítimas suicídio revelaram alterações no nível de expressão do BDNF em regiões do hipocampo e córtex pré-frontal (Dwivedi et al., 2003; Karege et al., 2005), reforçando o gene BDNF como um candidato promissor para etiologia do suicídio. Salienta-se ainda que, o BDNF desempenha um papel importante na plasticidade sináptica (Bath & Lee, 2006) e variantes genéticas no gene BDNF podem induzir alterações funcionais e estruturais na neurotrofina BDNF (Egan et al., 2003), repercutindo-se na interacção desta com outros neurotransmissores implicados. Assim é importante a continuação do estudo do gene BDNF numa amostra maior (salienta-se que num estudo preliminar obtivemos uma associação entre o polimorfismo Val66Met do gene BDNF e o suicídio), bem como a investigação de outros polimorfismos neste gene, no sentido de esclarecer o seu papel na etiologia do suicídio na população Portuguesa.

3.2 - Gene p75^{NTR}

O gene p75^{NTR} está localizado no cromossoma 17 (Huebner et al., 1986), e é constituído por seis exões e cinco intrões (Sehgal et al., 1988) como esquematizado na Figura 9. O polimorfismo C727T (S205L) do gene p75^{NTR} está localizado no exão IV.

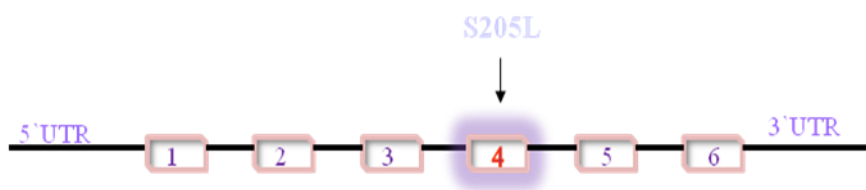


Figura 9 - Esquema representativo do gene p75NTR e localização aproximada do polimorfismo S205L.

O polimorfismo S205L foi genotipado segundo a metodologia descrita em 2.5.2 do Capítulo 2 de Material e Métodos. O perfil eletroforético do fragmento de DNA amplificado para o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} está representado na figura 10a e tem 386 pb.



Figura 10a - Imagem do perfil eletroforético do produto de amplificação referente ao polimorfismo S205L do gene p75^{NTR}. Legenda da figura: 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem ao fragmento inicial amplificado de DNA. 1 é o marcador de peso molecular Phi-X174 RF DNA HaeIII (ABgene).

Na figura 10b está representado o perfil eletroforético da digestão com a enzima BanII dos fragmentos de amplificação, referentes ao polimorfismo S205L do gene p75^{NTR}, os quais apresentam 386 pb; 386 pb, 289 pb e 97 pb; 289 pb e 97 pb para indivíduos homocigóticos para os alelos L, indivíduos heterocigóticos para os alelos S/L e indivíduos homocigóticos para os alelos S, respectivamente.

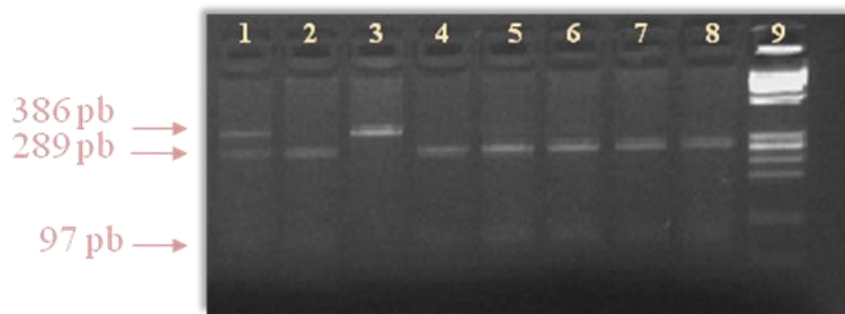


Figura 10b - Imagem referente à electroforese dos fragmentos de digestão obtidos para o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} usando a enzima de restrição BanII, em gel de agarose a 4%. Legenda da figura: 2, 4, 5, 6, 7 e 8 são homocigóticos para o alelo S. 1 é heterocigótico (S/L). 3 é homocigótico para o alelo L. 9 é o marcador de peso molecular Phi-X174 RF DNA HaeIII (ABgene).

Os resultados obtidos para as frequências genóticas ($\chi^2=2,323$; $df=2$; $p=0,313$) e para as frequências alélicas ($\chi^2=2,038$; $df=1$; $p=0,153$) não revelaram diferenças significativas entre a amostra de vítimas de suicídio e a amostra controlo, como apresentado na Tabela V. Na amostra da população Portuguesa estudada pelo nosso grupo, observou-se uma maior percentagem do alelo S em relação ao alelo L. Este resultado está de acordo com outros estudos efectuados nas populações Americana e Japonesa (Kunigi et al., 2004; McGregor et al., 2007).

Tabela V - Distribuição e frequências genotípicas e alélicas referentes ao polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} em vítimas de suicídio e controlos.

	Genótipos			Alelos	
	LL	S/L	SS	L	S
Vítimas de Suicídio	4 (1,7%)	31 (13,3%)	198 (85%)	39 (8,4%)	427 (92%)
Controlo	10 (3,8%)	40 (15%)	216 (81%)	60 (11,3%)	472 (89%)

$\chi^2=2,323; df=2; p=0,313$ $\chi^2=2,038; df=1; p=0,153$

O nosso estudo é o primeiro a investigar o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} numa amostra de vítimas de suicídio. Um estudo efectuado por Kunugi e seus colaboradores (2004) em tentativas de suicídio, numa amostra de doentes depressivos revelou uma associação entre as tentativas de suicídio e o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR}. Os autores deste estudo sugerem que o alelo L205 poderá ter um efeito protector na expressão da depressão e possivelmente do comportamento suicida, pelo contrário o alelo S205 poderá estar envolvido na susceptibilidade destas patologias. Além disso, referem ainda a possibilidade de outros SNPs estarem em *linkage disequilibrium* com este polimorfismo, sendo responsáveis pelo efeito protector ou não para as doenças em estudo. McGregor e colaboradores (2007) realizaram também um estudo com tentativas de suicídio (numa amostra de indivíduos com doença de humor) e os resultados obtidos não revelaram associação entre o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} e as tentativas de suicídio.

No sentido de avaliar também diferenças entre género, analisámos o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR}, numa amostra de vítimas de suicídio do sexo masculino e numa amostra de vítimas de suicídio do sexo feminino, e os resultados estão apresentados nas Tabelas VI e VII.

Tabela VI - Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} em vítimas de suicídio e controlos, no género masculino.

Género masculino	Genótipos			Alelos	
	LL	S/L	SS	L	S
Vítimas de Suicídio	2 (1,2%)	22 (13,3%)	141 (85%)	26 (7,9%)	304 (92,1%)
Controlo	9 (4,9%)	32 (17,4%)	143 (77,7%)	50 (15,2%)	318 (96,4%)

$$\chi^2=5,302; df=2; p=0,071$$

$$\chi^2=5,269; df=1; p=0,022$$

Tabela VII - Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} em vítimas de suicídio e controlos, no género feminino.

Género feminino	Genótipos			Alelos	
	LL	S/L	SS	L	S
Vítimas de Suicídio	2 (2,9%)	9 (13,2%)	57 (83,8%)	13 (9,6%)	123 (90,4%)
Controlo	1 (1,5%)	7 (10,8%)	57 (87,7%)	9 (6,9%)	121 (93,1%)

$$\chi^2=0,516; df=2; p=0,773$$

$$\chi^2=0,311; df=1; p=0,577$$

Os resultados obtidos da análise da amostra de indivíduos do sexo masculino mostraram uma tendência de associação, e uma associação entre o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} e o suicídio para a distribuição genotípica ($\chi^2=5,302; df=2; p=0,071$) e para a distribuição alélica ($\chi^2=5,269; df=1; p=0,022$), respectivamente. Contrariamente no que se refere à amostra de indivíduos do sexo feminino, os resultados obtidos não são significativos (distribuição genotípica: $\chi^2=0,516; df=2; p=0,773$; distribuição

alélicas: $\chi^2=0,311$; $df=1$; $p=0,577$). Relativamente ao género, não existem estudos genéticos com o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} em vítimas de suicídio. Procedeu-se também a uma análise tendo em conta os métodos utilizados para consumar o suicídio (violento e não violento) e os resultados estão apresentados nas Tabelas VIII.

Tabela VIII - Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} em vítimas de suicídio violento (SV), suicídio não violento (SNV) e controlos.

		Suicídio (SV)	Suicídio (SNV)	Controlos	
Genótipos	LL	3 (1,6%)	1 (2%)	10 (3,8%)	SV: $\chi^2=1,833$; $df=2$; $p=0,400$
	L/S	27 (14,6%)	4 (8,2%)	40 (15%)	
	SS	55 (83,8%)	44 (90%)	216 (81%)	SNV: $\chi^2=2,120$; $df=2$; $p=0,346$
Alelos	L	33 (8,9%)	22 (20%)	60 (11,3%)	SV: $\chi^2=1,071$; $df=1$; $p=0,301$
	S	337 (91,2%)	88 (80%)	472 (89%)	SNV: $\chi^2=1,828$; $df=1$; $p=0,176$

No que diz respeito às amostras de suicídio violento e não violento, os resultados obtidos não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre cada um destes grupos e o grupo controlo, para a distribuição dos genótipos (Violento: $\chi^2=1,833$; $df=2$; $p=0,400$; Não-violento: $\chi^2=2,120$; $df=2$; $p=0,346$) e para a distribuição dos alelos (Violento: $\chi^2=1,071$; $df=1$; $p=0,301$; Não violento: $\chi^2=1,828$; $df=1$; $p=0,176$).

No nosso estudo os resultados obtidos parecem sugerir que o gene p75^{NTR} está directamente envolvido na etiologia do suicídio em indivíduos do sexo masculino. De facto, existem evidências de que o gene p75^{NTR} é um candidato promissor para a etiologia do suicídio, pelo que é importante proceder a estudos adicionais quer, na população Portuguesa quer noutras populações, afim de replicar o resultado obtido. A título de exemplo, um estudo *postmortem* realizado em vítimas de suicídio mostrou

alteração no nível de expressão do receptor p75^{NTR} em regiões do hipocampo e córtex pré-frontal (Dwivedi et al., 2009). Apesar das repercussões do polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} na função e estrutura do receptor p75^{NTR} não serem conhecidas, é importante referir que a substituição de um aminoácido polar (serina) por um aminoácido não-polar (leucina) poderá ser uma explicação para uma possível alteração funcional no receptor p75^{NTR}.

3.3 Gene PRKG1

O gene PRKG1 está localizado no cromossoma 10 e é constituído por 15 exões (Orstavik et al., 1992; Orstavik et al., 1997), como representado na Figura 11.

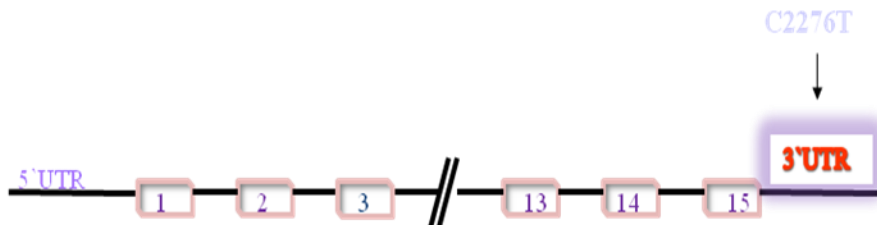


Figura 11- Esquema do gene PRKG1 e localização aproximada do polimorfismo C2276T.

O polimorfismo C2276T do gene PRKG1 localizado na região 3'UTR foi estudado conforme descrito em 2.5.3 do Capítulo 2 de Material e Métodos. A figura 12a mostra o perfil electroforético do produto de amplificação do polimorfismo C2276T do gene PRKG1, o qual tem um tamanho de 221 pb. O produto amplificado foi digerido com a enzima de restrição AcI, originando dois fragmentos de 151 pb e 70 pb na presença do alelo C (Figura 12b).



Figura 12a - Imagem do perfil electroforético do produto de amplificação referente ao polimorfismo C2276T do gene PRKG1. Legenda da figura: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem ao fragmento inicial amplificado de DNA. 7 corresponde ao controlo negativo. 8 é o marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas^R).

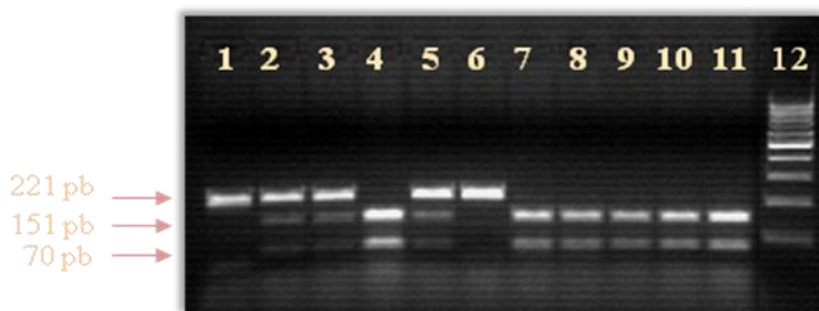


Figura 12b - Imagem referente à electroforese dos fragmentos de digestão obtidos para o polimorfismo C2276T do gene PRKG1 usando a enzima de restrição AciI, em gel de agarose a 2,5%. Legenda da figura: 1 e 6 são homocigóticas para o alelo T. 2, 3, 5 são heterocigóticas (C/T). 4, 7, 8, 9, 10 e 11 são homocigóticas para o alelo C. 12 é o marcador de peso molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas^R).

O resultado obtido na genotipagem do polimorfismo C2276T do gene PRKG1 não revelou diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de vítimas de suicídio

e o controlo, quer para a distribuição genotípica ($\chi^2=1,854$; $df=2$; $p=0,396$), quer para as frequências alélicas ($\chi^2= 0,743$; $df=1$; $p=0,389$), como apresentado na Tabela IX.

Tabela IX - Distribuição e frequências genotípicas e alélicas referentes ao polimorfismo C2276T do gene PRKG1 em vítimas de suicídio e controlos.

	Genótipos			Alelos	
	TT	C/T	CC	T	C
Vítimas de Suicídio	36 (14%)	109 (43%)	110 (43%)	181 (35%)	329 (65%)
Controlo	28 (10%)	123 (45%)	122 (45%)	179 (33%)	367 (67%)

$$\chi^2=1,854; df=2; p=0,396$$

$$\chi^2= 0,743; df=1;$$

$$p=0,389$$

A nível mundial são inexistentes os estudos genéticos efectuados com o polimorfismo C2276T do gene PRKG1 no suicídio, sendo o nosso estudo o primeiro a investigar o papel do polimorfismo C2276T do gene PRKG1 na etiologia do suicídio.

Afim de analisar diferenças entre género, estudou-se o polimorfismo C22776T do gene PRKG1 numa amostra estratificada de indivíduos do sexo masculino e indivíduos do sexo feminino e os resultados desta análise estão expostos na Tabela X e XI.

Tabela X - Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo C2276T do gene PRKG1 em vítimas de suicídio e controles, para o género masculino.

Género	Genótipos			Alelos	
	TT	C/T	CC	T	C
Masculino					
Vítimas de Suicídio	21 (11%)	82 (45%)	81 (44%)	124 (34%)	244 (66%)
Controlo	23 (11%)	92 (45%)	90 (44%)	138 (34%)	272 (66%)

$$\chi^2=0,006; df=2; p=0,997$$

$$\chi^2=0,004; df=1; p=0,948$$

Tabela XI - Distribuição genotípica e Frequências alélicas referentes ao polimorfismo C2276T do gene PRKG1 em vítimas de suicídio e controlos, para o género feminino.

Género	Genótipos			Alelos	
	TT	C/T	CC	T	C
Feminino					
Vítimas de Suicídio	15 (21%)	27 (38%)	29 (41%)	57 (40%)	85 (60%)
Controlo	5 (7,4%)	31 (46%)	32 (47%)	41 (30%)	95 (70%)

$$\chi^2=5,361; df=2; p=0,069$$

$$\chi^2= 2,618; df=1; p=0,106$$

No que diz respeito à análise do polimorfismo C2276T do gene PRKG1 para indivíduos do sexo masculino e indivíduos do sexo feminino, os resultados obtidos para a distribuição genotípica (Masculino: $\chi^2=0,006$; $df=2$; $p=0,997$; Feminino: $\chi^2=5,361$; $df=2$; $p=0,069$) e para as frequências alélicas (Masculino: $\chi^2=0,004$; $df=1$; $p=0,948$; Feminino: $\chi^2= 2,618$; $df=1$; $p=0,106$;) não mostraram diferenças estatisticamente

significativas entre os grupos analisados. No entanto, para o sexo feminino observou-se uma tendência de associação entre o polimorfismo C2276T do gene PRKG1 e o suicídio, pelo que é importante prosseguir este estudo, no sentido de esclarecer o papel deste gene na etiologia do suicídio.

À semelhança dos estudos efectuados nos genes anteriores procedemos também à análise dos subgrupos suicídio violento e não violento e os resultados da distribuição genotípica e das frequências alélicas estão apresentados na Tabela XII.

Tabela - XII. Distribuição genotípica e frequências alélicas referentes ao polimorfismo C2276T do gene PRKG1 em vítimas de suicídio violento e suicídio não violento e controlos.

		Suicídio (SV)	Suicídio (SNV)	Controlos	
Genótipos	TT	28 (13%)	8 (17%)	28 (10%)	SV: $\chi^2=1,181$; df=2; p=0,554
	C/T	90 (43%)	19 (40%)	123 (45%)	
	CC	90 (43%)	20 (43%)	122 (45%)	SNV: $\chi^2=1,866$; df=2; p=0,393
Alelos	T	146 (35%)	35 (37%)	179 (33%)	SV: $\chi^2=0,466$; df=1; p=0,495
	C	270 (65%)	59 (63%)	367 (67%)	SNV: $\chi^2=0,528$; df=1; p=0,468

Relativamente ao suicídio violento e ao suicídio não violento, os resultados obtidos não revelaram associação com o polimorfismo C2276T do gene PRKG, quer para distribuição genotípica (Violento: $\chi^2=1,181$; df=2; p=0,554; Não violento: $\chi^2=1,866$; df=2; p=0,393) quer para as frequências alélicas (Violento: $\chi^2=0,466$; df=1; p=0,495; Não violento: $\chi^2=0,528$; df=1; p=0,468).

Apesar do resultado do nosso estudo não ter revelado associação do polimorfismo C2276T do gene PRKG1 com o suicídio, há evidências, nomeadamente para indivíduos do sexo feminino, que o gene PRKG1 poderá ser um candidato, pelo que é essencial a

continuação deste estudo, a fim de esclarecer o seu papel na etiologia do suicídio. Apesar das repercussões do polimorfismo C2276T do gene PRKG1 na função da proteína PKG não estarem esclarecidas, a substituição do alelo C pelo alelo T, embora não altere a sequência de aminoácidos na proteína, pode induzir uma alteração na estrutura secundária do RNAm, podendo afectar a estabilidade, processamento e/ ou alvos subcelulares do transcripto RNAm com mudanças no splicing, transcrição e eficiência na tradução. Desta forma, variantes genéticas no gene PRKG1 poderão alterar a função da proteína PKG, reforçando assim o gene PRKG como um candidato promissor para a etiologia do suicídio. Além disso, a PKG é um elemento chave das vias de transdução de sinal, nomeadamente na via de sinalização NO-GCs-PKG que tem sido implicada em processos complexos, como a plasticidade sináptica e o LTP (Furini et al., 2009). É ainda importante referir que o neurotransmissor NO (importante na formação de PKG) tem sido implicado na modulação de alguns neurotransmissores, como por exemplo a serotonina, que por sua vez tem sido implicada no comportamento suicida (Chiavegatto & Nelson. 2003).

4 - Conclusões e estudos futuros

4.1 - Conclusões

No que se refere aos genes BDNF e PRKG1, os resultados obtidos não revelaram associação entre os polimorfismos Val66Met do gene BDNF e C2276T do gene PRKG1 e o suicídio. No seu conjunto, os resultados parecem sugerir que os genes BDNF e PRKG1 não desempenham um papel directo na etiologia do suicídio, na população Portuguesa. Contudo, é importante referir que no gene PRKG1 foi observada uma tendência de associação entre o polimorfismo C2276T do gene PRKG1 e o suicídio, para indivíduos do sexo feminino, pelo que é fundamental fazer estudos adicionais para tentar esclarecer o papel do gene PRKG1 no suicídio.

Relativamente ao gene p75^{NTR} e aos indivíduos do sexo masculino, detectou-se uma tendência de associação para a distribuição genotípica, e uma associação para as frequências alélicas, sugerindo que o polimorfismo do gene p75^{NTR} poderá ser um factor de risco para o suicídio no sexo masculino. Quanto à amostra de indivíduos do sexo feminino, quer a amostra no seu todo, quer a amostra estratificada por método de suicídio, não se detectaram alterações significativas na distribuição genotípica e nas frequências alélicas.

Uma vez que a investigação do envolvimento de genes que codificam as neurotrofinas na etiologia do comportamento suicida começou recentemente a ser explorada pela comunidade científica, os estudos obtidos vêm reforçar a importância das mesmas na etiologia do suicídio. Por outro lado, não existem estudos genéticos que investiguem genes que codifiquem proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal, e o nosso estudo representa o primeiro a nível mundial a investigar o gene PRKG1 na etiologia do suicídio. Assim, é importante prosseguir o estudo do potencial envolvimento de genes das neurotrofinas e de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal, no sentido de esclarecer o papel destes na etiologia do suicídio, e em particular na população Portuguesa, o que poderá eventualmente reduzir a taxa de suicídio.

4.2 - Estudos futuros

A etiologia do suicídio continua por explicar, e estes resultados suportam a hipótese do envolvimento de genes das neurotrofinas e de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal, pelo que é importante continuar a investigação nesta área, nomeadamente de novas variantes genéticas nos genes BDNF, p75NTR e PRKG1, bem como de novos genes das vias de transdução de sinal e neurotrofinas.

O estudo de tagSNPs nos genes estudados seria interessante, uma vez que permitiria identificar blocos de haplotipos que poderão estar associados ao suicídio.

Outra hipótese de investigação seria estudar genes dos sistemas dopaminérgico, glutamatérgico e noradrenérgico na etiologia do suicídio, uma vez que são escassos a nível mundial os estudos efectuados com genes nos sistemas mencionados (Brezo et al., 2008).

Os *Genome-wide association studies* (GWAS) caracterizam-se por estudar variantes genéticas em todo o genoma humano (Burmeister, 1999). Estes estudos permitirão eventualmente identificar SNPs envolvidos na etiologia do suicídio.

Em suma, é importante continuar os estudos no sentido de esclarecer e compreender a etiologia do suicídio, a fim de prevenir e reduzir a sua taxa a nível mundial.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- Ajdacic-Gross V., Weiss M.G., Ring M., Hepp U., Boop M., Gutzwiller F. & W. Rossler (2008). Methods of suicide: internacional suicide patterns derived from the WHO mortality database. *Bulletin of the World Health Organization* 86:726-732.
- Azenha D., Alves M., Matos R., Fonte Santa J., Silva B., Cordeiro C., Vieira D.N. & M.A. Alda (2009). Male specific association between the 5-HTR6 gene 267C/T SNP and suicide in the Portuguese population. *Neuroscience Letters* 466(3):128-30.
- Bath K.G. & F.S. Lee (2006). Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience* 6(1):79-85.
- Bej A.K., Mahbubani M.H. & R.M. Atlas (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 26(3/4): 301-4.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & R.W. Davis (1980). Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Brent D.A. & J.J. Mann (2005). Family gGenetics studies, suicide, and suicidal behavior. *American Journal of Medical Genetics* 133C:13-24.
- Brezo J, Klempan T. & G. Turecki (2008). The genetics of suicide: a critical review of molecular studies. *Psychiatric Clinics of North America* 31:179-203.
- Burmeister M. (1999). Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biology Psychiatry* 45: 522-532.
- Canetto S.S. (2008). Women and Suicidal Behavior: a cultural analysis. *American Journal of Orthopsychiatry* 78(2):259-266.
- Chao M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience* 4(4):299-309.
- Chee Tan S. & Chin Yiap B (2009). DNA, RNA, protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2009/574398.

- Chen Y., Zeng J., Chen Y., Wang X., Yao G., Wang W., Qi W. & K. Kong (2009). Multiple roles of the p75 neurotrophins receptor in the nervous system. *The journal of international medical research* 37:281-288.
- Chen Z.Y., Ieraci A., Teng H., Dall H., Meng C.X., Herrera D.G., Nykjaer A., Hempstead B.L. & F.S. Lee (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *The Journal of Neuroscience* 25(26):6156-6166.
- Chiavegato S. & R. J. Nelson (2003). Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. *Hormones and Behavior* 44(3): 233-41.
- Crowe J. S., Cooper H. J., Smith M. J., Sims M.J., Parker D. & D. Gewert (1991). Improved Cloning Efficiency of Polimerase Chain Reaction (PCR) Products After Proteinase K Digestion. *Nucleic Acids Research* 19(1):184.
- Decreto de lei no 244/94 September 26.
- De Luca V., Muglia P., Jain U., Basile S.V., Sokolowski M.B. & J.L. Kennedy (2002). A drosophila model for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuromolecular Medicine* 2:281-287.
- Dwivedi Y., Mondal A.C., Rizavi H.S. & R.R. Conley (2005). Suicide brain is association with decreased expression of neurotrophins. *Biological Psychiatry* 58:315-324.
- Dwivedi Y., Rizavi H.S., Conley R.R., Roberts R.C., Tamminga C.A. & G.N. Pandey (2003). Altered gene expression of brain-derived neurotropic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Archives General Psychiatry* 60:808-815.
- Dwivedi Y., Rizavi H.S., Zhang H., Mondal A.C., Roberts R.C., Conley R.R. & G. Pandey (2009). Neurotrophin receptor activation and expression in human postmortem brain:effect of suicide. *Biological Psychiatry* 65:319-328.
- Egan M.F., Kojima M., Callicot J.H., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., D.R. Weinberger (2003). The BDNF Val66Met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell Press* 112: 257-269.

- Erlich H.A., Gelfand D.H. & R.K. Saiki (1988). Specific DNA amplification. *Nature* 331:461-2.
- Feil R., Holter S.M., Weindl K., Wurst W., Langmesser S., Gerling A., Feil S. & U. Albrecht (2009). cGMP-dependent protein kinase I, the circadian clock, sleep and learning. *Communicative & Integrative Biology* 2:298-301.
- Furini C.R., Rossato J.I., Bitencourt J.L., Medina J.H., Izquierdo I. & M. Cammarota (2009). β -Adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus* 20(5):672-83.
- Glasel J. A. (1995). Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by 260/280nm Absorbance Ratios. *Biotechniques* 18:62-63.
- Haddley K., Vasiliou A.S., Ali F.R., Paredes U.M., Bubb V.J. & J.P. Quinn (2008). Molecular genetics of monoamine transporters: relevance to brain disorders. *Neurochemical Research* 33:652-667.
- Haga H., Yamada R., Ohnishi Y., Nakamura Y. & T. Tanaka (2002). Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium genome project: identification of 190 562 genetic variations in the human genome. *Journal of Human Genetics* 47:605-610.
- Haines J. L. & M. A. Pericak-vance (1998). Approaches to gene mapping in complex human disease. Wiley-Liss. USA.
- Hartl D. L. & E.W. Jones (1998). The Molecular Structure and Replication of the Genetic Material. In: *Genetics: principles and analysis*. 209.
- Hashimoto K. (2007). BDNF variant linked to anxiety-related behaviors. *Bioessays: news and reviews in molecular cellular and developmental biology* 29(2):116-9.
- Healy D.G. (2006). Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide. *Lancet Neurobiology* 5:701-707.
- Hofmann F., Bernhard D., Lukowski R. & P. Weinmeister (2009). cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handbook of experimental pharmacology* 191:137-162.
- Huang E.J. & L.F. Reichardt (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual Reviews Biochemistry* 72:609-642.

- Huang T.L. & C.T. Lee (2007). Associations between brain-derived neurotrophic factor G196A gene polymorphism and clinical phenotypes in schizophrenia patients. *Chang Gung Medical Journal* 30:408-13.
- Hu Y. & S.J. Russek (2008). BDNF and the disease nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *Journal of Neurochemistry* 105 (1):1-17.
- Huebner K., Isobe M., Chao M., Bothwell M., Ross A.H., Finan J., Hoxie J.A., Sehgal A., Buck C.R., Lanahan A., Nowell P.C., Koprowski H. & C.M. Croce (1986). The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 83: 1403-1407.
- Hwang J.P., Tsai S.J., Hong C.J., Yang C.H., Lirng J.F. & Y.M. Yang (2006). The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic-factor gene is associated with geriatric depression. *Neurobiology of Aging* 27:1834-1837.
- Iga J.I., Ueno S.I., Yamauchi K., Numata S., Tayoshi-Shibuya S., Kinouchi S., Nakataki M., Song H., Hokoishi K., Tanabe H., Sano A. & T. Ohmori (2007). The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with psychotic feature and suicidal behavior in Japanese major depressive patients. *American Journal of Medical Genetics* 144B:1003-1006.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945.
- Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N. & R.L. Harpe (2005). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Molecular Brain Research* 136:29-37.
- Kim B., Kim C.Y., Hong J.P., Kim S.Y., Lee C. & Y.H. Joo (2008). Brain-derived neurotrophic factor Val/Met polymorphism and bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 58:97-103.
- Kuczewski N., Porcher C., Lessmann V., Medina I. & J.L. Gaiarsa (2009). Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Molecular Neurobiology* 39:37-49.

- Kunugi H., Hashimoto R., Yoshida M., Tatsumi M. & K. Kamijima (2004). A missense polymorphism (S205L) of the low-affinity neurotrophin receptor p75^{NTR} gene is associated with depressive disorder and attempted suicide. *American Journal of Medical Genetics* 129B:44-46.
- Lander E.S. & N.J. Schork (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2047.
- Lebmann V. & T. Brigadski (2009). Mechanism, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neuroscience Research* 65:11-22.
- Lewin G.R. & Y.A. Barde (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience* 19:289-317.
- MacGregor S., Strauss J., Bulgin N., De Luca V., George C. J., Kovacs M. & J. L. Kennedy (2007). p75^{NTR} gene and suicide attempts in young adults with a history of childhood-onset mood disorders. *American Journal of Medical Genetics* 144B:696-700.
- Maisonpierre P.C., Le Beau M.M., Espinosa R.I.I.I., Ip N.Y., Belluscio L., De la Monte S.M., Squinto S., Furth M.E. & G.D. Yancopoulos (1991). Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions and chromosomal localizations. *Genomics* 10:558-568.
- Miller S.A., Dykes D.D. & H.F. Polesky (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215.
- Nakamura Y. (2009). DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *Journal of Human Genetics* 54:1-8.
- Nasiri H., Forouzandeh M., Rasaei M.J. & F. Rahbarizadeh (2005). Modified Salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of clinical laboratory analysis* 19:229-232.
- Neves-Pereira M., Mundo E., Muglia P., King N., Macciardi F. & J.L. Kennedy (2002). The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *American Journal of Human Genetics* 71:651-655.

- Nock M.K., Borges G., Bromet E.J., Cha C.B., Kessler R.C. & S. Lee (2008). Suicide and suicidal behavior. *Epidemiologic Reviews* 30(1):133-154.
- Orstavik S., Natarajan V., Tasken K., Jahnsen T. & M. Sandberg (1997). Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). *Genomics* 42:311-318.
- Orstavik S., Sandberg M., Bérubé D., Natarajan V., Simard J., Walter U., Gagné R., Hansson V. & T. Jahnsen (1992). Localization of the human gene for the type I cyclic GMP-dependent protein kinase to chromosome 10. *Cytogenetic Cell Genet* 59:270-273.
- Ota K.T., Pierre V.J., Ploski J.E., Queen K. & G.E. Schafe (2008). The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdale via activation of ERK/MAP kinase. *Learning and Memory* 15(10):792-805.
- Owen-Reece H., Smith M., Elwell E., Goldstone J.C. (1999). Near infrared Spectroscopy. *British Journal of Anaesthesia* 82(3): 418-26.
- Pandey G.N., Ren X., Rizavi H.S., Conley R.R., Roberts R.C. & Y. Dwivedi (2008). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11:1047-1061.
- Perroud N., Courtet P., Vincze I., Jausse I., Jollant F., Bellivier F., Lebover M., Baud P., Buresi C. & A. Malafosse (2008). Interaction between BDNF Val66Met and childhood trauma on adult's violent suicide attempt. *Genes, Brain and Behavior* 7(3):314-22.
- Reynolds A.J., Bartlett S.E. & I.A. Hendry (2000). Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins. *Brain Research Reviews* 33:169-178.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarchiapone M., Carli V., Roy A., Iacoviello L., Cuomo C., Latella M. C., di Giannantonio M., Janiri L., de Gaetano M. & M. N. Janal (2008). Association of

- polymorphism (Val66Met) of brain-derived neurotrophic factor with suicide attempts in depressed patients. *Neuropsychobiology* 57 (3): 139-45.
- Sehgal A., Patil N. & M. Chao (1988). A constitutive promotor directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Molecular and Cellular Biology* 8: 3160-3167.
- Tabor H.K., Risch N.J. & R.M. Myers (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* 3:391-397.
- Tan S.C. & B.C. Yiap (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2009/574398.
- Tapia-Arancibia L., Rage F., Givalois L. & S. Arancibia (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 25:77-107.
- The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796.
- The International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature* 437: 1299-1320.
- The international SNP Map Working Group (2001). A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933.
- Videira A. (2001). Engenharia genética: princípios e aplicações. Lidel – edições técnicas, lda.
- White B.A. (2005). Polymerase Chain Reaction (PCR): Design and optimization of reactions. *Encyclopedia of life Science*, Nature Publishing Group. doi:10.1038/npg.els.005340.
- World Health Organization (2005). Burden of mental and behavioural disorders: suicide. <http://www.who.int/whr/2001/chapter2/en/index6.html>.
- World Health Organization (2008). World suicide prevention day. http://www.who.int/mental_health/prevention/suicide.
- Zarrilli F., Angiolillo A., Castaldo G., Chiariotti L., Keller S., Sacchetti S., Marusic A., Zagar T., Carli V., Roy A., & M. Sarchiapone (2009). Brain Derived

Neurotrophic Factor (BDNF) Genetic Polymorphism (Val66Met) in Suicide: A study of 512 Cases. American Journal of Medical Genetics 150B: 599-600.