



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A hipótese serotoninérgica e noradrenérgica na etiologia do suicídio

Pedro Marques Mendes

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A hipótese serotoninérgica e noradrenérgica na etiologia do suicídio

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Alda Cardoso (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra) e co-orientação do Professor Doutor Armando Cristóvão (Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra).

Pedro Marques Mendes

2014

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Alda Cardoso, pela sua constante partilha de conhecimentos, sentido crítico, rigor científico, frontalidade e pela imensa ajuda proporcionada.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Armando Cristóvão, por toda a sua disponibilidade, ajuda e simpatia.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) e à Professora Doutora Alda Cardoso, responsável pela Unidade de Genética Clínica e Molecular da Delegação do Centro do INMLCF, por me terem proporcionado todas as condições logísticas para o desenvolvimento do meu trabalho.

A todos os Patologistas e Técnicos Forenses do INMLCF responsáveis pela seleção das amostras utilizadas no meu trabalho.

Às minhas colegas e amigas de laboratório.

Aos meus pais. Sem eles não estava aqui, literalmente. Obrigado é pouco.

À Joana.

Aos meus familiares e amigos.

Muito agradecido. Um bem-haja.

Índice

Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	ii
Abreviaturas	iii
Resumo	v
Abstract	vi

Capítulo I

1. Introdução	1-13
1.1 Contextualização geral do suicídio	1
1.2 Sistemas de neurotransmissores	3
1.2.1 Sistema serotoninérgico	3
1.2.1.1 Contextualização geral	3
1.2.1.2 Contextualização da hipótese de trabalho	4
1.2.1.2.1 Gene <i>HTR2A</i> : polimorfismo T102C	5
1.2.1.2.2 Gene <i>SLC6A4</i> : polimorfismo VNTR Stin2	7
1.2.2 Sistema noradrenérgico	8
1.2.2.1 Contextualização geral	8
1.2.2.2 Contextualização da hipótese de trabalho	9
1.2.2.2.1 Gene <i>ADRA2A</i> : polimorfismo C-1291G	10
1.3 Considerações gerais de genética	11
1.4 Objetivos	13

Capítulo II

2. Materiais e Métodos	14-20
2.1 Seleção da amostra	14
2.2 Extração do DNA genómico	14
2.3 Quantificação e determinação do grau de pureza do DNA genómico	15
2.4 Amplificação, digestão e eletroforese	16
2.4.1 Fundamentação teórica	16
2.4.2 Genotipagem	18
2.4.2.1 Gene <i>HTR2A</i> : polimorfismo T102C	18
2.4.2.2 Gene <i>SLC6A4</i> : polimorfismo VNTR Stin2	19
2.4.2.3 Gene <i>ADRA2A</i> : polimorfismo C-1291G	19
2.5 Análise estatística	20

Capítulo III

3. Resultados	21-28
3.1 Gene <i>HTR2A</i> : polimorfismo T102C	21
3.2 Gene <i>SLC6A4</i> : polimorfismo VNTR Stin2	23
3.3 Gene <i>ADRA2A</i> : polimorfismo C-1291G	25

Capítulo IV

4. Conclusão	29
--------------	----

Capítulo V

5. Referências Bibliográficas	30-39
-------------------------------	-------

Índice de Figuras

Figura 1	Esquemática da neurotransmissão serotoninérgica.	4
Figura 2	Representação esquemática da estrutura do gene <i>HTR2A</i> e localização do polimorfismo T102C.	5
Figura 3	Representação esquemática da estrutura do gene <i>SLC6A4</i> e localização do polimorfismo VNTR Stin2.	7
Figura 4	Esquemática da neurotransmissão noradrenérgica.	9
Figura 5	Representação esquemática da estrutura do gene <i>ADRA2A</i> e localização do polimorfismo C-1291G.	10
Figura 6	Representação esquemática dos fragmentos de restrição esperados para os indivíduos homocigóticos <i>wild-type</i> (T/T), homocigóticos para o alelo mutante (C/C) e heterocigóticos (T/C) relativamente ao polimorfismo T102C do gene <i>HTR2A</i> .	21
Figura 7	Representação esquemática dos fragmentos de amplificação esperados para os indivíduos homocigóticos para o alelo de 10 repetições (10/10), homocigóticos para o alelo de 12 repetições (12/12) e heterocigóticos (10/12) relativamente ao polimorfismo VNTR Stin2 do gene <i>SLC6A4</i> .	24
Figura 8	Representação esquemática dos fragmentos de restrição esperados para os indivíduos homocigóticos para o alelo mutante (G/G), homocigóticos <i>wild-type</i> (C/C) e heterocigóticos (C/G) relativamente ao polimorfismo C-1291G do gene <i>ADRA2A</i> .	26

Índice de Tabelas

Tabela I	Distribuição das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo T102C do gene <i>HTR2A</i> nas vítimas de suicídio e nos indivíduos controlo.	22
Tabela II	Distribuição das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo VNTR Stin2 do gene <i>SLC6A4</i> nas vítimas de suicídio e nos indivíduos controlo.	24
Tabela III	Distribuição das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo C-1291G do gene <i>ADRA2A</i> nas vítimas de suicídio e nos indivíduos controlo.	27

Abreviaturas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
3'-UTR	<i>3'- untranslated region</i>
5'-UTR	<i>5'- untranslated region</i>
5-HIAA	5-hidroxiindoleacético
5-HTT	Transportador da serotonina
5-HTTLPR	<i>5-HTT linked polymorphic region</i>
A	Adenina
C	Citosina
cm	Centímetro
CNV	<i>Copy-number variation</i>
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
df	<i>Degrees of freedom</i>
DGS	Direção-Geral da Saúde
dGTP	Desoxiguanidina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitiminida trifosfato
EDTA	Etilenodiaminotetracético
G	Guanina
INE	Instituto Nacional de Estatística
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

RENDA	Registo Nacional de Não Dadores
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
T	Timina
TBE	Tris-borato EDTA
U	Unidade
UV	Ultravioleta
VMAT₂	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Resumo

O suicídio é um grave problema de saúde pública, sendo anualmente responsável por cerca de um milhão de mortes a nível mundial. Diversas evidências indicam que os sistemas de neurotransmissores serotoninérgico e noradrenérgico estão envolvidos na etiologia do suicídio. Deste modo, investigou-se a associação entre variantes genéticas nos genes *HTR2A* (T102C), *SLC6A4* (VNTR Stin2) e *ADRA2A* (C-1291G) e o suicídio na população Portuguesa.

Relativamente ao polimorfismo T102C do gene *HTR2A*, os resultados obtidos não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de vítimas de suicídio e a amostra controlo, quer na distribuição genotípica ($\chi^2= 4,150$; $df= 2$; $p= 0,126$) quer na distribuição alélica ($\chi^2= 0,14$; $df= 1$; $p= 0,708$). À semelhança do gene *HTR2A*, a análise estatística efetuada não mostrou associação entre o polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4* e o suicídio (frequências genotípicas: $\chi^2= 0,097$; $df= 2$; $p= 0,953$; frequências alélicas: $\chi^2= 0,002$; $df= 1$; $p= 0,964$). Procedeu-se também à análise dos resultados do polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* sendo os mesmos negativos, quer para a distribuição genotípica ($\chi^2= 1,660$; $df= 2$; $p= 0,436$) quer para a distribuição alélica ($\chi^2= 1,479$; $df= 1$; $p= 0,224$). Face ao exposto, os resultados no seu conjunto não revelaram associação entre os genes dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico e o suicídio.

Palavras-chave: Suicídio; Sistemas serotoninérgico e noradrenérgico; Genes *HTR2A*, *SLC6A4* e *ADRA2A*.

Abstract

Suicide is a serious public health problem, being annually responsible for about one million deaths worldwide. Several evidences indicate that the serotonergic and noradrenergic neurotransmitters systems are involved in the etiology of suicide. Therefore, the association between genetic variants in *HTR2A* (T102C), *SLC6A4* (Stin2 VNTR) and *ADRA2A* (C-1291G) genes and suicide in the Portuguese population was investigated.

Regarding the T102C polymorphism in *HTR2A* gene, the results revealed no statistically significant differences between the sample of suicide victims and control sample, both in genotype ($\chi^2= 4.150$, $df= 2$, $p= 0.126$) and allele distribution ($\chi^2= 0.14$, $df= 1$, $p= 0.708$). Similarly to the *HTR2A* gene, the performed statistical analysis showed no association between the Stin2 VNTR polymorphism in *SLC6A4* gene and suicide (genotype frequencies: $\chi^2= 0.097$; $df= 2$; $p= 0.953$; allele frequencies: $\chi^2= 0.002$; $df= 1$; $p= 0.964$). The analysis of the results of the C-1291G polymorphism in the *ADRA2A* gene was also fulfilled, being the results negative, both in genotype ($\chi^2= 1.660$, $df= 2$, $p= 0.436$) and allele distribution ($\chi^2= 1.479$, $df= 1$, $p= 0.224$). Given the above, the overall results revealed no association between the genes of the serotonergic and noradrenergic systems and suicide.

Keywords: Suicide; Serotonergic and noradrenergic systems; *HTR2A*, *SLC6A4* and *ADRA2A* genes.

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

1.1 Contextualização geral do suicídio

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o suicídio é o resultado de uma ação deliberadamente executada por um indivíduo com pleno conhecimento do seu desfecho fatal. Anualmente, o suicídio é responsável por cerca de um milhão de mortes a nível mundial, sendo uma das principais causas de morte com especial incidência na faixa etária dos 15-44 anos (WHO_a, 2012). As taxas de suicídio mais elevadas a nível mundial são verificadas na Europa onde se regista uma taxa de prevalência média de suicídio de cerca de 13.9 por cada 100.000 pessoas, destacando-se países como a Lituânia, a Hungria e a Eslovénia (Antypa *et al.*, 2013). Apesar de na Europa se registarem as taxas de suicídio mais elevadas, é na Ásia que o maior número de suicídios ocorre. Os suicídios consumados apenas na Índia, na China e no Japão correspondem a cerca de 40% da totalidade de suicídios a nível mundial (Wu *et al.*, 2012).

Relativamente à taxa de suicídio verificada em Portugal, as estatísticas mais recentes demonstram uma taxa global de suicídio de 10.1 por cada 100.000 pessoas. A distribuição por género é de 17.0 por cada 100.000 pessoas para o masculino e de 3.9 por cada 100.000 pessoas para o género feminino (INE, 2014). Tal como sucede em Portugal, a taxa de suicídio a nível mundial no género masculino é superior comparativamente à observada no género feminino. Por outro lado, a taxa de tentativas de suicídio é superior no género feminino (Gvion & Apter, 2012).

As taxas globais de suicídio encontram-se consideravelmente subestimadas. Esta situação acontece na medida em que, entre os diferentes países, existem distintos procedimentos de registo de mortes por suicídio e diferentes práticas e valores socioculturais que resultam em classificações incorretas da causa de morte em casos de suicídio (Hawton & van Heeringen, 2009). Portugal figura entre os países da União Europeia com maior taxa de mortes de causa indeterminada (14%), sendo este o veredito médico mais comumente utilizado em casos de provável suicídio. Portanto, os valores das taxas globais de suicídio devem ser interpretados com especial ponderação (DGS, 2013).

Nos últimos anos verificou-se um aumento de cerca de 60% das taxas de suicídio (WHO_b, 2012) e, face à conjuntura atual existente a nível mundial, espera-se

que continuem a aumentar nos próximos anos. Segundo a OMS, estima-se que no ano de 2020 o suicídio seja responsável por cerca de 2,4% do total de mortes a nível global (WHO_a, 2012).

O comportamento suicida inclui a ideação suicida, as tentativas de suicídio e a consumação do suicídio. A ideação suicida abrange os pensamentos suicidas e/ou as ameaças desprovidas de ação. A tentativa de suicídio pode ser definida de acordo com o seu nível de letalidade (baixo ou alto) e o fato de ser impulsiva ou planeada. O comportamento suicida é classificado tendo em conta a intenção de morrer, a letalidade e o método. Relativamente ao método de consumação, o suicídio pode ser considerado como violento ou não violento. Os métodos que fazem parte do suicídio violento são o enforcamento, a precipitação, a utilização de arma de fogo ou de objetos cortantes e a imolação, enquanto que os métodos pertencentes ao suicídio não violento são a overdose de drogas, o afogamento, a inalação de monóxido de carbono e a indução de hipotermia através do uso de álcool ou de drogas neurolépticas (Heilä *et al.*, 1997).

O suicídio é um fenómeno complexo com vários fatores de risco distais e proximais associados. Os fatores de risco distais compreendem aqueles que aumentam a predisposição para o suicídio, tais como: história familiar de suicídio; componente genética; fatores epigenéticos; antecedentes de adversidades na infância; traços de personalidade e estilos cognitivos; e abuso crónico de substâncias como o álcool e outras drogas dependentes. Os fatores de risco proximais são aqueles que atuam como desencadeadores do resultado final, nomeadamente: eventos de vida recentes como experiências de desmoralização (humilhação pública ou rejeição social); o sentimento de desespero; e a presença de uma ideação suicida ou de uma psicopatologia, principalmente a depressão *major* (Turecki *et al.*, 2012). De fato, verifica-se que cerca de 90% dos casos de suicídio possuem uma doença psiquiátrica associada (Gvion & Apter, 2012).

Estudos familiares, de gémeos e de adoção demonstraram a existência de uma componente genética no comportamento suicida. Roy (1983), num estudo familiar, comparou as taxas de tentativas de suicídio de indivíduos com história familiar de suicídios com indivíduos sem história familiar de suicídios. Ao analisar os resultados, verificou uma taxa significativamente mais elevada de tentativas de suicídio nos indivíduos com história familiar de suicídios comparativamente com os indivíduos sem história familiar de suicídios. Este estudo, assim como outros estudos familiares efetuados, indica a ocorrência de agregação do comportamento suicida nas famílias

(Brent & Mann, 2005). Os estudos de gémeos revelaram uma maior taxa de concordância para o suicídio (Roy *et al.*, 1991) e para as tentativas de suicídio (Roy *et al.*, 1995) nos gémeos monozigóticos comparativamente com os gémeos dizigóticos, demonstrando deste modo a importância dos fatores genéticos no comportamento suicida. Os estudos de adoção permitiram separar a componente genética da componente ambiental. Schulsinger *et al.* (1979) comparou as taxas de suicídio entre os parentes biológicos e os parentes adotivos dos adotados que cometeram suicídio com um grupo controlo de adotados. Analisando os resultados, verificou-se uma taxa de suicídio mais elevada nos parentes biológicos dos adotados suicidas. Além disso, constatou-se a ausência de casos de suicídio nos parentes adotivos quer dos adotados suicidas quer dos adotados controlo. Estes resultados indicaram um efeito genético, ao invés de um efeito ambiental, no suicídio.

1.2 Sistemas de neurotransmissores

1.2.1 Sistema serotoninérgico

1.2.1.1 Contextualização geral

A serotonina está presente no sistema nervoso central, no sistema nervoso periférico e também em tecidos não neuronais como no intestino e no sangue. A biossíntese da serotonina é dependente da enzima limitante, a triptofano hidroxilase. Esta enzima catalisa a hidroxilação do triptofano, o aminoácido precursor da serotonina, em 5-hidroxitriptofano sendo de seguida descarboxilado em serotonina. Após a sua síntese, a serotonina é acumulada em vesículas e posteriormente libertada pelo processo de exocitose na fenda sináptica. Uma vez na fenda sináptica, este neurotransmissor fica disponível para interagir com os recetores pré-sinápticos e pós-sinápticos da serotonina de modo a exercer as suas funções no sistema nervoso.

O sistema serotoninérgico é composto por 15 recetores de serotonina subdivididos em sete distintas famílias (5-HT₁-5-HT₇) tendo em conta as suas características estruturais e funcionais. A maioria destes recetores são metabotrópicos, à exceção dos recetores 5-HT_{3A} e 5-HT_{3B} que são ionotrópicos (Hoyer *et al.*, 2002). Os níveis extracelulares de serotonina são regulados pelo transportador da serotonina, uma proteína membranar localizada nos neurónios pré-sinápticos, responsável pela

recaptação da serotonina (Figura 1). Após a sua recaptação, a serotonina pode ser reacumulada em vesículas sinápticas para posterior libertação ou ser inativada metabolicamente pela enzima monoamina oxidase A em 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA).

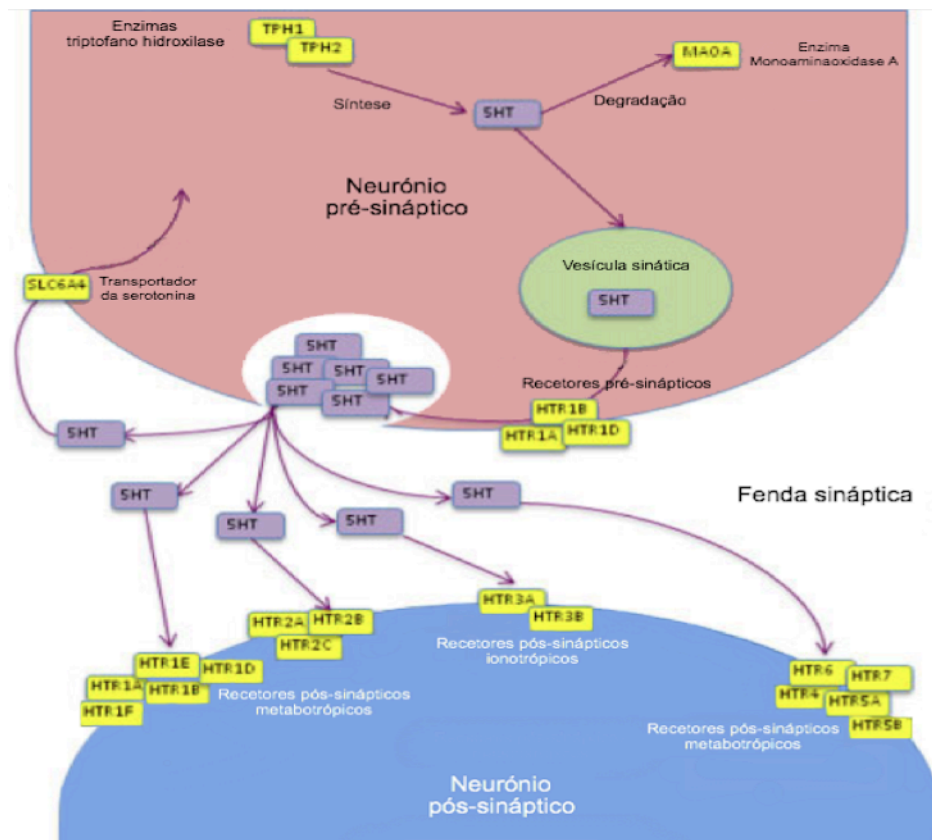


Figura 1 – Esquematisação da neurotransmissão serotoninérgica. Adaptado de Judy *et al.*, 2012.

1.2.1.2 Contextualização da hipótese de trabalho

O sistema serotoninérgico tem sido implicado na etiologia do suicídio. Uma das primeiras evidências do envolvimento da serotonina no suicídio surgiu com a descoberta de níveis reduzidos do principal metabolito da serotonina, o 5-HIAA, no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com depressão que tentaram o suicídio (Åsberg *et al.*, 1976). Além disso, alguns estudos constataram um aumento na densidade dos recetores 5-HT₂ quer no córtex frontal (Stanley & Mann, 1983; Mann *et al.*, 1986; Arango *et al.*, 1990) quer nas plaquetas (Pandey *et al.*, 1995) de vítimas de suicídio comparativamente com os respetivos grupos controlo. Turecki *et al.* (1999), ao verificar a existência de um nível mais elevado de ligação aos recetores 5-HT_{2A} no córtex pré-frontal de vítimas de suicídio em comparação com controlos, concluiu que esse aumento

era, em parte, geneticamente determinado pela variação presente no gene que codifica para o recetor 5-HT_{2A} (gene *HTR2A*). Adicionalmente, também foram reportadas alterações na ligação ao transportador da serotonina, tendo sido demonstrado, através da técnica de autoradiografia quantitativa, uma diminuição da ligação ao transportador da serotonina no córtex pré-frontal de vítimas de suicídio (Arango *et al.*, 1995). Todos estes estudos demonstraram evidências de uma neurotransmissão serotoninérgica alterada presente na patogénese do comportamento suicida. Consequentemente, os genes que codificam para as proteínas que regulam a neurotransmissão da serotonina têm sido propostos como genes candidatos para estudos de associação do comportamento suicida.

1.2.1.2.1 Gene *HTR2A*: polimorfismo T102C

O gene *HTR2A* está localizado no cromossoma 13q14-q21 (Sparkes *et al.*, 1991), possui 64 kb e é composto por três exões separados por dois intrões (Chen *et al.*, 1992). Já foram identificados aproximadamente 300 diferentes SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) no gene *HTR2A*. Particularizando, o polimorfismo T102C está localizado no exão 1 do gene *HTR2A* e é caracterizado pela substituição de uma base timina por uma base citosina na posição 102 (Figura 2) que não altera a sequência de aminoácidos da proteína resultante (Warren *et al.*, 1993). Apesar de ser um polimorfismo sinónimo, o polimorfismo T102C está localizado próximo da região promotora do gene *HTR2A* e pode, por conseguinte, estar envolvido na regulação genética. Esta característica faz com que o polimorfismo T102C do gene *HTR2A* seja um dos polimorfismos mais estudados tendo em conta a sua associação com o suicídio.

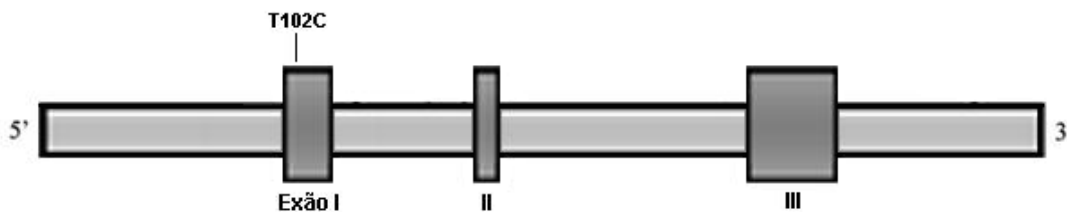


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do gene *HTR2A* e localização do polimorfismo T102C.

Vários estudos de associação entre o polimorfismo T102C do gene *HTR2A* e o comportamento suicida têm sido efetuados, contudo os resultados têm sido

inconsistentes. Du *et al.* (2000) verificou que o polimorfismo T102C do gene *HTR2A* está significativamente associado com a ideação suicida em indivíduos com depressão *major*, sendo que o alelo C confere um risco acrescido para o comportamento suicida. Arias *et al.* (2001), numa replicação do estudo feito por Du *et al.* (2000), demonstrou igualmente o risco acrescido para o comportamento suicida conferido pelo alelo C em indivíduos com depressão *major*, uma vez que os indivíduos portadores deste alelo apresentavam um risco mais do que cinco vezes superior para tentar cometer suicídio em comparação com os indivíduos não portadores do alelo C. Vaquero-Lorenzo *et al.* (2008), além de também observar que o alelo C do polimorfismo T102C do gene *HTR2A* pode estar associado com a suscetibilidade para o comportamento suicida, verificou um excesso do genótipo C/C no grupo de tentativas de suicídio em comparação com o grupo controlo. Por outro lado, Saiz *et al.* (2008) verificou um excesso do alelo T do polimorfismo T102C nas tentativas de suicídio não impulsivas comparativamente com as tentativas de suicídio impulsivas e com o grupo controlo. Wrzosek *et al.* (2011) reportou uma associação entre o genótipo C/C do polimorfismo T102C e as tentativas de suicídio em indivíduos do género feminino com dependência alcoólica. González-Castro *et al.* (2013) encontrou diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo T102C do gene *HTR2A* de indivíduos que tentaram cometer suicídio e do grupo controlo. Contudo, também foram reportados estudos onde não foi verificada associação entre o polimorfismo T102C do gene *HTR2A* e o comportamento suicida, sendo de destacar múltiplos estudos de associação (Du *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 1999; Turecki *et al.*, 1999; Bondy *et al.*, 2000; Crawford *et al.*, 2000; Preuss *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2001; Correa *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002; Ertugrul *et al.*, 2004; Khait *et al.*, 2005; Yoon & Kim, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2011) e ainda três meta-análises (Anguelova *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; González-Castro *et al.*, 2013). Os diferentes resultados relativamente aos estudos de associação do polimorfismo T102C do gene *HTR2A* e o comportamento suicida carecem de estudos adicionais em diferentes populações mundiais.

1.2.1.2.2 Gene *SLC6A4*: polimorfismo VNTR Stin2

O gene *SLC6A4* localiza-se no cromossoma 17q.11.1-q12 (Ramamoorthy *et al.*, 1993), é constituído por 14 exões e possui cerca de 31 kb (Figura 3) (Lesch *et al.*, 1994). Este gene codifica para o transportador da serotonina, uma proteína membranar responsável pela regulação da concentração de serotonina na fenda sináptica. Duas regiões polimórficas com consequências funcionais foram identificadas no gene *SLC6A4*: uma inserção/deleção de 44 pares de bases (pb) na região promotora (5-HTT linked polymorphic region, 5-HTTLPR) resultando, respetivamente, num alelo longo (L) e num alelo curto (S) (Heils *et al.*, 1996) e um VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) de 17 pb localizado no intrão 2 (VNTR Stin2) (Lesch *et al.*, 1994). Particularmente, o polimorfismo VNTR Stin2 contém 9, 10 ou 12 cópias de um elemento de repetição de 17 pb (Ogilvie *et al.*, 1996). Assume-se que este VNTR possa estar envolvido na regulação da atividade transcricional, sendo essa regulação dependente do número de cópias existentes. O alelo de 12 repetições demonstrou ter uma maior atividade comparativamente com o alelo de 10 repetições (Fischerstrand *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que os transportadores de serotonina presentes nas plaquetas de indivíduos homocigóticos para o alelo de 12 repetições parecem ter menor afinidade para a captação de serotonina comparativamente com os transportadores de serotonina localizados nas plaquetas de indivíduos heterocigóticos para o alelo de 10 repetições/9 repetições (Kaiser *et al.*, 2002).



Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do gene *SLC6A4* e do polimorfismo VNTR Stin2. Adaptado de Heils *et al.* (1996).

A associação entre o polimorfismo VNTR localizado no intrão 2 do gene *SLC6A4* e o suicídio tem sido estudada, todavia os resultados são contrários (Hranilovic *et al.*, 2003; Jernej *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2006; Gaysina *et al.*, 2006; Lopez de Lara *et al.*, 2006; Bah *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2005; Pungercic *et al.*, 2006; Saiz *et al.*, 2008; Zupanc *et al.*, 2010). Além disso, na meta-

análise de Li & He (2007) não se verificou associação entre o polimorfismo VNTR Stin2 e o comportamento suicida. Devido ao fato do transportador da serotonina possuir um papel relevante na regulação da transmissão deste neurotransmissor e do polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4* ter uma relevância funcional, assume-se este polimorfismo como candidato para estudos de associação com o suicídio.

1.2.2 Sistema noradrenérgico

1.2.2.1 Contextualização geral

O sistema noradrenérgico está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos como a regulação da resposta ao *stress*, a atenção, a memória e a tomada de decisão (Dwivedi, 2012). A noradrenalina é produzida maioritariamente pelos neurónios presentes no *locus coeruleus*, o principal grupo celular noradrenérgico do cérebro. O primeiro e decisivo passo na síntese desta catecolamina é a hidroxilação do aminoácido precursor da noradrenalina, a tirosina, pela ação da enzima limitante, a tirosina hidroxilase. Após a sua síntese, a noradrenalina é acumulada em vesículas sinápticas através do VMAT₂ (*vesicular monoamine transporter*) e é libertada na fenda sináptica por exocitose. A regulação da libertação da noradrenalina é efetuada pelos adrenoreceptores presentes nos neurónios noradrenérgicos: $\alpha_{1(A,B,D)}$, $\alpha_{2(A,B,C)}$, β_1 , e β_2 . Particularmente, os adrenoreceptores α_2 foram identificados no cérebro por Grijalba *et al.* (1996) que verificou a predominância do subtipo de adrenoreceptores α_{2A} , principalmente no córtex frontal. A ativação dos adrenoreceptores α_2 pré-sinápticos (autoreceptores) inibe a libertação de noradrenalina, enquanto que a ativação dos adrenoreceptores β_2 pré-sinápticos conduz à sua libertação. A ação da noradrenalina na fenda sináptica é terminada através da recaptação deste neurotransmissor pelo transportador de noradrenalina, localizado na membrana dos neurónios pré-sinápticos. Uma vez no neurónio, a noradrenalina é reacumulada nas vesículas sinápticas ou degradada pela enzima monoamina oxidase (Figura 4) (Dwivedi, 2012).

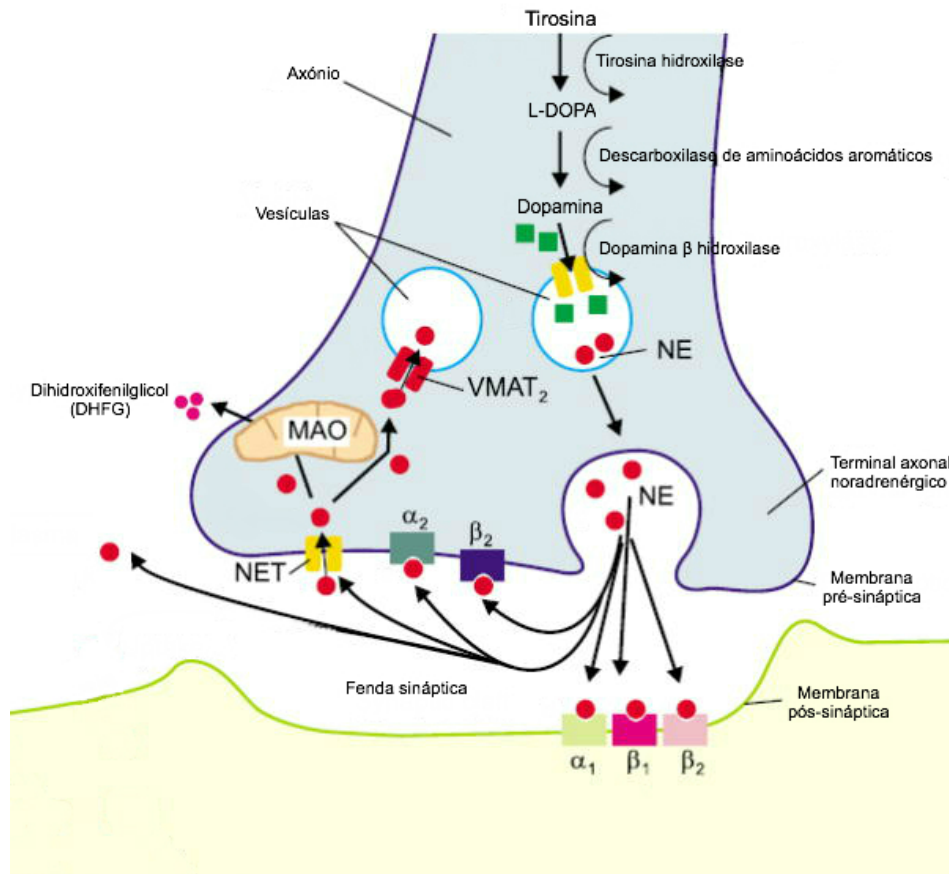


Figura 4 – Neurotransmissão noradrenérgica. Adaptado de Zhou, 2004.

1.2.2.2 Contextualização da hipótese de trabalho

Várias alterações no sistema noradrenérgico de vítimas de suicídio têm sido reportadas, com particular incidência nos adrenoreceptores α_2 . Alguns estudos de ligação, utilizando a técnica de autoradiografia quantitativa de receptores, demonstraram um aumento na densidade dos adrenoreceptores α_2 em diferentes localizações cerebrais de vítimas de suicídio, tais como no *locus coeruleus* (Ordway *et al.*, 1994) e no hipocampo e córtex frontal (González *et al.*, 1994), comparativamente com os controles. González-Maeso *et al.* (2002) demonstrou um aumento significativo na sensibilidade dos adrenoreceptores α_{2A} no córtex frontal de vítimas de suicídio, resultando numa maior atividade dos adrenoreceptores α_{2A} . Além disso, Escribá *et al.* (2004) reportou um aumento significativo dos níveis de RNA mensageiro dos adrenoreceptores α_{2A} no córtex pré-frontal do cérebro de vítimas de suicídio. As alterações encontradas nos níveis dos adrenoreceptores α_{2A} em vítimas de suicídio podem ser consequentes da variabilidade genética presente no gene que codifica para o adrenoreceptor α_{2A} (gene *ADRA2A*).

1.2.2.2.1 Gene *ADRA2A*: polimorfismo C-1291G

O gene *ADRA2A* localiza-se no cromossoma 10q23-q25 (Yang-Feng *et al.*, 1987) e consiste num exão simples, sem intrões, de 3650 pares de bases. Diversas variações genéticas no gene *ADRA2A* foram identificadas (Feng *et al.*, 1998). Particularmente, o polimorfismo C-1291G resulta da substituição de uma base citosina por uma base guanina na posição -1291 e localiza-se na região promotora do gene *ADRA2A* (Figura 5) (Lario *et al.*, 1997).

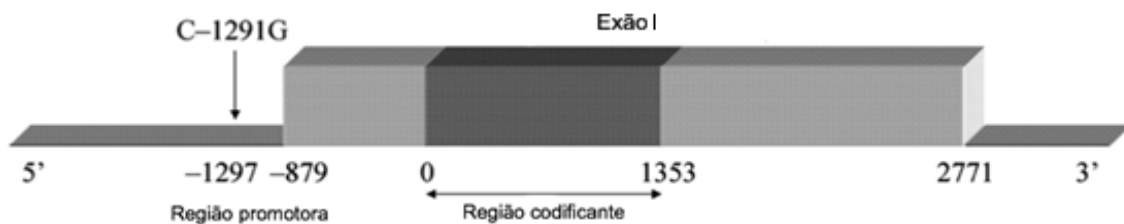


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura do gene *ADRA2A* e localização do polimorfismo C-1291G. Adaptado de Fukutake *et al.* (2008).

Fukutake *et al.* (2008), ao estudar a associação do polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* e o suicídio na população Japonesa, verificou que as frequências do alelo C se encontravam significativamente mais elevadas tanto nas vítimas de suicídio do género feminino como nas vítimas de suicídio violento do género feminino comparativamente com os controlos do mesmo género. Além disso, concluiu ainda que a presença do alelo C pode aumentar o risco de suicídio no género feminino ao afetar a regulação da transcrição do gene *ADRA2A*. Contrariamente, para o género masculino, o estudo de Fukutake *et al.* (2008) não verificou associação entre o polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* e o suicídio. Estes resultados foram consistentes com os previamente obtidos por Sequeira *et al.* (2004) que, ao investigar a associação entre o polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* e o suicídio, não encontrou diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de vítimas de suicídio e a amostra controlo, numa população Caucasiana do género masculino. Estudos adicionais são necessários para esclarecer o papel do gene *ADRA2A* na etiologia do suicídio.

1.3 Considerações gerais de genética

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a unidade básica de hereditariedade que contém a informação genética de um organismo. O DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas dispostas em hélice que são complementares e antiparalelas entre si. As cadeias polinucleotídicas são constituídas por 4 diferentes nucleótidos: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). Cada nucleótido contém um grupo fosfato, uma molécula de açúcar de 5 carbonos (desoxirribose) e uma base azotada (A, C, G, T). As duas cadeias estão unidas por ligações de hidrogénio entre as bases azotadas, emparelhadas de acordo com a regra de complementaridade de bases. Assim, as bases purinas (A e G) apenas emparelham com as bases pirimidinas (T e C, respetivamente) (Ellsworth & Manolio, 1999).

Define-se gene como uma sequência de DNA que contém informação necessária para a codificação de proteínas. Por norma, da estrutura de um gene fazem parte os exões, os intrões e as regiões de regulação como a 5'- *untranslated region* (5'-UTR) e a 3'-UTR. A região 5'-UTR normalmente contém o promotor que regula a expressão genética. Na região promotora existem regiões conservadas, como a TATA *box*, que possuem uma importante função na ligação dos vários componentes essenciais para a transcrição como os fatores de transcrição e a RNA polimerase. A região 3'-UTR contém um codão de terminação que especifica o fim da sequência de codificação e um sinal de poliadenilação envolvido no processamento do RNA mensageiro transcrito (Ellsworth & Manolio, 1999).

O genoma corresponde ao conjunto de toda a informação genética de um organismo. O material genético humano está contido em 46 cromossomas correspondentes a 22 pares de autossomas e a um par de cromossomas sexuais (XY ou XX). Cada par de autossomas consiste em dois cromossomas homólogos que são similares entre si mas podem conter cópias de genes ou outras sequências de DNA que diferem ligeiramente uma da outra (alelos) (Ellsworth & Manolio, 1999). A localização no genoma das formas alternativas de um determinado gene denomina-se de *locus* (Burmeister, 1999).

As variações genéticas presentes no genoma humano podem ser causadas por diversos tipos de mecanismos, nomeadamente substituições, deleções ou inserções de nucleótidos, diferenças no número de repetições sucessivas em *tandem*, entre outras (Nakamura *et al.*, 2009).

Existem várias classes de polimorfismos genéticos: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats* ou minisatélite), STR (*Short Tandem Repeats* ou microsátélite), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e CNV (*Copy-Number Variation*) (Nakamura *et al.*, 2009). Os RFLPs foram o primeiro polimorfismo a ser utilizado como marcador genético (Botstein *et al.*, 1980). Esta classe de polimorfismos caracteriza-se pela utilização de enzimas de restrição que reconhecem e clivam sequências específicas de DNA, os locais de restrição. Os RFLPs resultam da alteração de um par de bases no local de reconhecimento da enzima de restrição utilizada. Deste modo, os locais de restrição alterados vão ser, ou não, reconhecidos pelas enzimas de restrição, resultando em fragmentos de restrição com diferentes tamanhos. O polimorfismo VNTR corresponde a repetições sucessivas em *tandem* de um número variável (9-60 pb) de nucleótidos ao longo da cadeia de DNA. Possuem uma natureza altamente polimórfica uma vez que a variabilidade do número de repetições confere uma grande diversidade alélica (Jeffreys *et al.*, 1985). Os STRs são definidos como curtas sequências de pares de bases repetidas em *tandem* (2-6 pb) existentes na sequência de DNA, estando presentes em múltiplas regiões genômicas (Weber & May, 1989). À semelhança dos VNTRs, os STRs também são extremamente informativos uma vez que são altamente polimórficos. Os SNPs consistem na alteração de um único nucleótido e são a variação genética mais comum presente no genoma humano (90%) (Collins *et al.*, 1998), estimando-se que exista 1 SNP/300 pb. Relativamente aos CNVs, este tipo de polimorfismo corresponde a variações genômicas estruturais que resultam em diferenças no número de cópias de uma determinada localização do genoma.

Os polimorfismos em regiões intrônicas geralmente não produzem alterações na molécula de RNA ou na estrutura e função da proteína resultante. Polimorfismos na região promotora, particularmente nas regiões conservadas como a TATA *box*, não levam a alterações da sequência de aminoácidos da proteína, todavia podem afetar a atividade promotora e, por conseguinte, alterar o nível de expressão genética. Os polimorfismos que ocorrem na região codificante são classificados em dois tipos: polimorfismos sinónimos e polimorfismos não sinónimos. Os polimorfismos sinónimos não resultam na alteração do aminoácido devido à redundância do código genético, enquanto que os polimorfismos não sinónimos podem afetar a estrutura e a função de uma dada proteína (Ellsworth & Manolio, 1999).

O Projeto do Genoma Humano através de um trabalho de cooperação entre laboratórios de diferentes países, possibilitou o mapeamento genético de todo o genoma humano e a sequenciação do DNA (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). O Projeto do Genoma Humano permitiu concluir que apenas cerca de 1,5% do genoma humano é responsável pela codificação de proteínas enquanto que os restantes 98,5% são constituídos por sequências reguladoras ou com função desconhecida. Além disso, verificou-se que cerca de 99,9% do genoma humano é igual entre indivíduos. De seguida surgiu o Projeto HapMap com o objetivo de caracterizar os padrões comuns de variação no âmbito dos 0,1% em que o genoma da população humana difere. Este projeto, através de um consórcio internacional, permitiu a determinação de padrões comuns de variantes genéticas de diferentes populações mundiais (África, Ásia e Europa). Foi possível a construção de um mapa de variantes genéticas e a identificação de haplótipos (combinações de alelos em ligação muito próxima herdados em conjunto) (The International HapMap Consortium, 2003). Os resultados do Projeto HapMap foram publicamente disponibilizados para a comunidade científica de modo a permitir a investigação de genes associados a doenças multifatoriais (The International HapMap Consortium, 2007). Durante a realização do Projeto HapMap foram identificados e comparados cerca de 5,4 milhões de SNPs entre as diferentes populações em estudo (Buchanan *et al.*, 2012). Posteriormente, constituindo uma extensão do Projeto HapMap, surgiu o Projeto dos 1000 genomas. Neste projeto foi sequenciado o genoma de 1092 indivíduos de diferentes populações mundiais que permitiu uma caracterização mais aprofundada da variação do genoma humano (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012).

1.4 Objetivos

Várias evidências demonstram que os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico estão implicados na etiologia do suicídio. Assim, pretende-se determinar as frequências genótípicas e alélicas de variantes genéticas nos genes *HTR2A* (T102C), *SLC6A4* (VNTR Stin2) e *ADRA2A* (C-1291G) na população Portuguesa; investigar a associação entre as variantes genéticas mencionadas nos genes *HTR2A*, *SLC6A4* e *ADRA2A* e o suicídio na população Portuguesa.

2. Materiais e Métodos

2.1 Seleção da amostra

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de sangue de vítimas de suicídio e de controlos, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 18 e 86 anos, da população Portuguesa. Após consulta ao Registo Nacional de Não Dadores (RENDA), recolheram-se cerca de 10 mL de sangue venoso em tubos de colheita com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) no decorrer de autópsias médico-legais realizadas no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

2.2 Extração do DNA genómico

O DNA pode ser extraído a partir de qualquer tecido ou fluido biológico. As células do sangue nucleadas são consideradas o tipo de amostra preferencial devido à facilidade e disponibilidade de obtenção do seu DNA genómico. Existem diversos métodos de extração de DNA a partir de amostras de sangue, sendo os mesmos classificados em quatro distintas categorias: métodos enzimáticos; métodos orgânicos; métodos enzimáticos e orgânicos em simultâneo e métodos de fase sólida (Visvikis *et al.*, 1998). Neste estudo, o DNA genómico das amostras foi extraído através de um método enzimático adaptado de Miller *et al.* (1988). Este método tem como principal característica o *salting out* de proteínas, ou seja, a desidratação e precipitação de proteínas utilizando uma solução saturada de NaCl (Miller *et al.*, 1988).

Para a extração do DNA genómico das amostras em estudo procedeu-se do seguinte modo:

- Adicionou-se cerca de três volumes de uma solução tampão de lise de glóbulos vermelhos (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, Na₂.EDTA.2H₂O 1 mM; pH= 7,4) de modo a promover a hemólise;
- Homogeneizaram-se as amostras e colocaram-se em gelo durante 20 minutos;
- Centrifugaram-se as amostras a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C numa centrífuga refrigerada (Rotanta 460R, Hettich®);
- Adicionou-se cerca de dois volumes da solução tampão de lise de glóbulos vermelhos ao *pellet* obtido;

- Ressuspenderam-se e centrifugaram-se as amostras a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C;
- Adicionou-se 4 mL de solução tampão de lise nuclear (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM; pH= 8,0) ao *pellet* resultante por forma a ocorrer a lise do núcleo dos glóbulos brancos;
- Adicionou-se 250 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (Bio-Rad[®]) a fim de solubilizar as membranas celulares e 30 µL de proteínase K (Roche[®]) de modo a hidrolizar as histonas;
- Incubaram-se as amostras *overnight* a 37°C em agitação constante (Incubadora SI60D, Stuart Scientific[®]);
- Adicionou-se 3 mL de solução saturada de NaCl 6 M, resultando na precipitação das proteínas por *salting out*;
- Centrifugaram-se as amostras a 3750 rpm durante 30 minutos a 25°C;
- Adicionou-se cerca de dois volumes de etanol absoluto ao sobrenadante resultante de modo a ocorrer a precipitação do DNA;
- Lavou-se o DNA em etanol a 70% para remover o excesso de sais;
- Adicionou-se 150-300 µL de uma solução de Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM; pH= 8.0) com o objetivo de solubilizar e conservar o DNA;
- Incubou-se o DNA genómico a 37°C até à sua solubilização;
- Armazenou-se o DNA genómico a 4°C.

2.3 Quantificação e determinação do grau de pureza do DNA genómico

A quantificação de DNA através de espectrofotometria de raios ultravioleta (UV) é possível devido à existência na sua constituição de bases purinas e pirimidinas que absorvem raios UV. Esta metodologia é uma das mais utilizadas na quantificação de DNA, sendo considerada um ponto de referência para outras técnicas (Nicklas & Buel, 2003).

A espectrofotometria baseia-se na Lei de Beer-Lambert que fundamenta que a absorvância é diretamente proporcional ao coeficiente de extinção molar, ao comprimento do percurso ótico e à concentração da amostra: $A = \log(I/I_0) = \epsilon dc$; sendo A – absorvância; I₀ – intensidade da luz incidente; I – intensidade da luz após atravessar a amostra (luz transmitida); ϵ – coeficiente de extinção molar (M⁻¹ cm⁻¹); d –

comprimento do percurso ótico (cm) e c – concentração (M) (Sambrook & Russel, 2001).

Neste estudo, as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria de raios UV (Espectrofotômetro SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, Bio-Rad®). Para tal, foi determinada a absorvância das amostras a um comprimento de onda de 260 nm de modo a permitir o cálculo da concentração de DNA presente nas amostras através da equação:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}) = \frac{\text{Constante de DNA de cadeia dupla} \times \text{Abs } 260 \text{ nm} \times \text{Fator de diluição}}{1000}$$

onde o valor da constante de DNA de cadeia dupla é igual a 50 na medida em que uma solução com 50 µg/mL de DNA de cadeia dupla sujeita a uma luz incidente com comprimento de onda de 260 nm apresenta uma absorvância igual a 1 (Sambrook & Russel, 2001).

Além de se determinar a concentração de DNA presente nas amostras, avaliou-se também o seu grau de pureza. Deste modo, determinou-se a absorvância das amostras a 280 nm, comprimento de onda ao qual existe absorção máxima pelas proteínas, e calculou-se a razão das absorvâncias 260/280 nm. As amostras com valores entre 1,8-2,0 são consideradas puras ou relativamente livres de contaminantes (Nicklas & Buel, 2003).

2.4 Amplificação, digestão e eletroforese

2.4.1 Fundamentação teórica

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986) e proporcionou uma revolução em diferentes áreas da investigação científica. Esta técnica consiste na amplificação exponencial *in vitro* de uma sequência específica de DNA (Saiki *et al.*, 1988). Cada ciclo de PCR é constituído por três etapas: desnaturação, *annealing* e extensão. A etapa da desnaturação (94-95°C) corresponde à separação da cadeia dupla de DNA. Seguidamente, a etapa de *annealing* caracteriza-se pela hibridização do par de oligonucleótidos sintéticos (*primers forward e reverse*) em sequências específicas que flanqueiam o fragmento de DNA a

amplificar. O emparelhamento dos *primers* ocorre à temperatura de *annealing*, otimizada de acordo com os *primers* a utilizar. Na etapa de extensão (72-78°C) a enzima Taq DNA polimerase atua junto dos *primers* e catalisa a extensão da cadeia de DNA pela adição de nucleótidos (Sambrook & Russel, 2001). Esta enzima tem a particularidade de ser uma DNA polimerase termoestável proveniente da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988). Deste modo, em cada ciclo de PCR existe uma duplicação da quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior, resultando no aumento exponencial do fragmento de DNA pretendido em aproximadamente 2^n , sendo n o número de ciclos (Saiki *et al.*, 1988).

Para a realização da técnica de PCR são utilizados os seguintes componentes: DNA molde, um par de *primers*, desoxinucleótidos trifostato (dNTPs - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), enzima Taq DNA polimerase, solução tampão (Tris-HCl) e magnésio (Mg^{2+}). Este é necessário para a atividade da polimerase utilizada e, como tal, a sua concentração necessita de ser otimizada (Sambrook & Russel, 2001).

As enzimas de restrição reconhecem e catalisam a clivagem de sequências específicas de DNA (locais de restrição). As variações presentes nestes locais podem levar à perda ou à formação de um novo local de clivagem para a enzima de restrição. Deste modo, originam-se fragmentos de diferentes tamanhos moleculares que, ao serem separados através da técnica de eletroforese em gel de agarose, resultam em distintos padrões de migração (Botstein *et al.*, 1980).

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica que permite a separação, identificação e purificação de fragmentos de DNA. O DNA é negativamente carregado a pH neutro o que faz com que, sob a ação de um campo elétrico, migre em direção ao eletrodo de carga positiva (ânodo). Os fragmentos de DNA ao migrarem através do gel de agarose são separados tendo em conta o seu tamanho molecular, sendo que os fragmentos de menor tamanho migram mais rapidamente em direção ao ânodo do que os fragmentos de maior tamanho. Existem também outros fatores que determinam a taxa de migração do DNA através do gel de agarose, tais como: a conformação do DNA, o tipo e a concentração de agarose utilizada, a voltagem aplicada, o tampão eletroforético utilizado e a presença de brometo de etídio no gel (Sambrook & Russel, 2001). Este corante fluorescente apresenta na sua constituição um grupo tricíclico planar que se intercala entre as bases de DNA. Ao ser exposto a luz UV emite fluorescência, permitindo a visualização das bandas eletroforéticas de DNA no gel de agarose (Sambrook & Russel, 2001). Após a realização da eletroforese, o peso molecular dos

fragmentos de DNA é determinado com base nas distâncias de migração do marcador de peso molecular *GeneRuler 100bp DNA ladder* (Thermo Scientific®).

2.4.2 Genotipagem

2.4.2.1 Gene *HTR2A*: polimorfismo T102C

Com base num protocolo adaptado de Warren *et al.* (1993), o DNA para o estudo do polimorfismo T102C, localizado no exão 1 do gene *HTR2A* foi amplificado com as seguintes condições experimentais:

- volume final de reação de 25 µL;
- 150 ng de DNA genómico;
- dNTPs 0,160 mM (Invitrogen®);
- MgCl₂ 2 mM (Invitrogen®);
- 0,4 µM de *primer* F (Invitrogen®);
- 0,4 µM de *primer* R (Invitrogen®);
- tampão da Taq DNA polimerase a 1x (Invitrogen®);
- 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®).

As condições de amplificação foram as seguintes:

- Desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos;
- 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, *annealing* a 61°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos;
- Extensão final a 72°C durante 4 minutos.

Relativamente à digestão enzimática, o produto de amplificação do polimorfismo T102C do gene *HTR2A* foi incubado com a enzima de restrição *MspI* (New England Biolabs®) a 37°C. Os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese horizontal, em tampão TBE 1x, num gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen®). Seguidamente, o gel de agarose foi visualizado no sistema *Gel Doc* (Bio-Rad®) determinando-se o tamanho molecular dos fragmentos com base no marcador de peso molecular *GeneRuler 100bp DNA ladder* (Thermo Scientific®).

2.4.2.2 Gene *SLC6A4*: polimorfismo VNTR Stin2

A amplificação do DNA do polimorfismo VNTR Stin2, localizado no intrão 2 do gene *SLC6A4* foi efetuada após a otimização das seguintes condições experimentais descritas por Lesch *et al.* (1994):

- volume final de reação de 25 µL;
- 100 ng de DNA genómico;
- dNTPs 0,100 mM (Invitrogen[®]);
- MgCl₂ 1,0 mM (Invitrogen[®]);
- 10 µM de *primer* F (Invitrogen[®]);
- 10 µM de *primer* R (Invitrogen[®]);
- tampão da Taq DNA polimerase a 1x (Invitrogen[®]);
- 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]).

A amplificação realizou-se nas seguintes condições:

- Desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos;
- 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 57°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 2 minutos.

Após a amplificação do DNA genómico procedeu-se à técnica de eletroforese horizontal num gel de agarose a 3,0% previamente corado com brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen[®]) e utilizando o tampão TBE 1x. Terminada a eletroforese, visualizou-se o gel de agarose no sistema *Gel Doc* (Bio-Rad[®]) e o tamanho molecular dos produtos de amplificação foi determinado com base no marcador de peso molecular *GeneRuler 100bp DNA ladder* (Thermo Scientific[®]).

2.4.2.3 Gene *ADRA2A*: polimorfismo C-1291G

Após a otimização do protocolo descrito por Lario *et al.* (1997), amplificou-se o DNA para o estudo do polimorfismo C-1291G localizado na região promotora do gene *ADRA2A*, com as seguintes condições:

- volume final de reação de 25 µL;

- 100 ng de DNA genómico;
- dNTPs 200 μ M (Invitrogen[®]);
- MgCl₂ 1,5 mM (Invitrogen[®]);
- 0,5 μ M de *primer* F (Invitrogen[®]);
- 0,5 μ M de *primer* R (Invitrogen[®]);
- tampão da Taq DNA polimerase a 1x (Invitrogen[®]);
- 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]).

A reação de PCR realizou-se utilizando as seguintes condições de amplificação:

- Desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos;
- 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 63°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto;
- Extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Posteriormente, o produto de amplificação do polimorfismo C-1291G foi digerido com a enzima de restrição *MspI* (New England Biolabs[®]) a 37°C. Os fragmentos resultantes da digestão enzimática foram separados em tampão TBE 1x através da técnica de eletroforese horizontal num gel de agarose a 3,5% previamente corado com brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen[®]). Após o término da eletroforese, observou-se o gel no sistema de visualização *Gel Doc* (Bio-Rad[®]) e o tamanho molecular dos fragmentos foi determinado tendo em conta as distâncias de migração do marcador de peso molecular *GeneRuler 100bp DNA ladder* (Thermo Scientific[®]).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados recorrendo ao *Primer of Biostatistics program* (versão 3.01) (Glantz, 1992).

3. Resultados e Discussão

3.1 Gene *HTR2A*: polimorfismo T102C

Para o estudo do polimorfismo T102C do gene *HTR2A*, seguiu-se a metodologia previamente descrita em 2.4.2.1 do capítulo Materiais e Métodos.

Os homozigóticos *wild-type* (genótipo T/T), os homozigóticos para o alelo mutante (C/C) e os heterozigóticos (T/C) foram determinados por digestão enzimática com a enzima de restrição *MspI*. Os homozigóticos T/T não apresentam local de restrição para a enzima de restrição de modo que se origina um fragmento de 342 pb. Os homozigóticos C/C possuem local de restrição para a enzima de restrição, originando a clivagem do fragmento de 342 pb em fragmentos de 126 pb e 216 pb. Os heterozigóticos T/C caracterizam-se pela apresentação de três fragmentos: 126 pb, 216 pb e 342 pb (Figura 6).

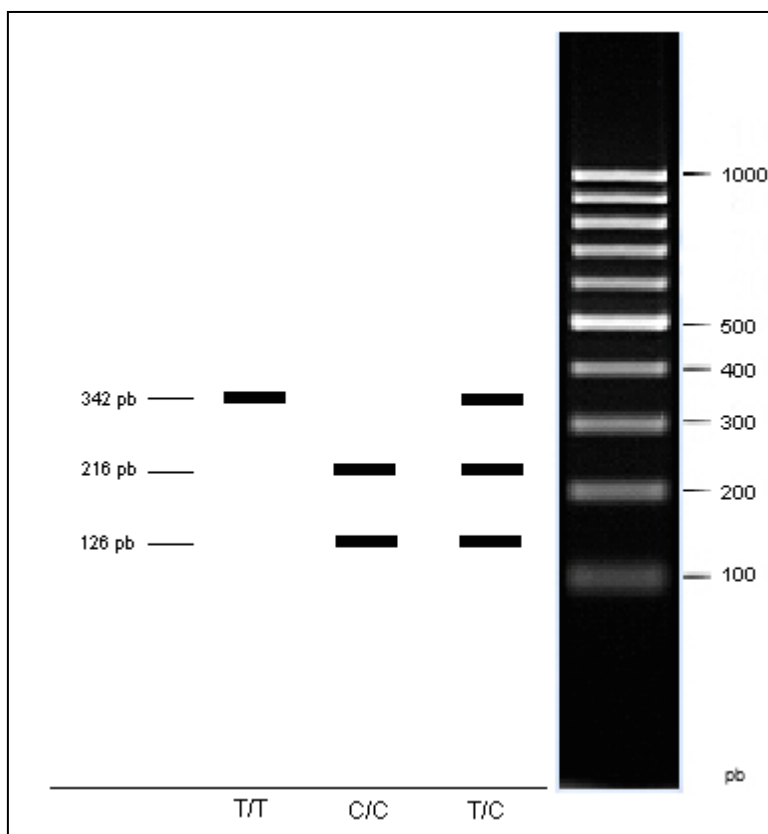


Figura 6 – Representação esquemática dos fragmentos de restrição esperados para os indivíduos homozigóticos *wild-type* (T/T), homozigóticos para o alelo mutante (C/C) e heterozigóticos (T/C) relativamente ao polimorfismo T102C do gene *HTR2A*.

As frequências genóticas e alélicas relativas ao polimorfismo T102C do gene *HTR2A* das vítimas de suicídio e do grupo controlo estão representadas na tabela I.

Tabela I – Distribuição das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo T102C do gene *HTR2A* nas vítimas de suicídio e nos indivíduos controlo.

	Genótipos			Alelos	
	T/T	T/C	C/C	T	C
Suicídio (n=187)	37 (0,198)	102 (0,545)	48 (0,257)	176 (0,471)	198 (0,529)
Controlos (n=189)	50 (0,265)	84 (0,444)	55 (0,291)	184 (0,487)	194 (0,513)
	$\chi^2 = 4,150$; df = 2; p = 0,126			$\chi^2 = 0,14$; df = 1; p = 0,708	

O alelo C do polimorfismo T102C do gene *HTR2A* é o alelo mais frequente na população Portuguesa, tal como na população Europeia (Tsai *et al.*, 1999). O genótipo T/C é o genótipo predominante quer nas vítimas de suicídio quer no grupo controlo, estando contudo a frequência deste genótipo mais elevada nas vítimas de suicídio comparativamente com os controlos (0,545 e 0,444, respetivamente). Por outro lado, o genótipo com a menor frequência nas vítimas de suicídio é o genótipo T/T (0,198). A análise dos resultados permite verificar que não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as vítimas de suicídio e o grupo controlo relativamente às frequências genóticas ($\chi^2 = 4,150$; **df**= 2; **p**= 0,126) e alélicas ($\chi^2 = 0,14$; **df**= 1; **p**= 0,708) do polimorfismo T102C do gene *HTR2A*.

Alguns estudos detetaram que o alelo C do polimorfismo T102C do gene *HTR2A* é um alelo de risco para o comportamento suicida (Du *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2001; Vaquero-Lorenzo *et al.*, 2008), todavia os resultados do presente estudo não apoiam esta hipótese na medida em que a frequência do alelo C nas vítimas de suicídio (0,529) foi em muito semelhante à frequência observada no grupo controlo (0,513). Outros estudos verificaram um excesso do genótipo C/C no grupo de indivíduos que tentaram cometer suicídio comparativamente com os controlos (Vaquero-Lorenzo *et al.*,

2008; Wrzosek *et al.*, 2011). Contudo, no presente estudo, o genótipo C/C obteve uma menor frequência nas vítimas de suicídio (0,257) do que no grupo controle (0,291).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os resultados dos estudos de associação reportados que investigaram a associação entre o polimorfismo T102C do gene *HTR2A* e a consumação do suicídio (Du *et al.*, 1999; Bondy *et al.*, 2000; Crawford *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2001). Por outro lado, encontram-se em desacordo relativamente aos resultados alcançados por alguns estudos que reportaram associação do polimorfismo em estudo e o comportamento suicida, mais propriamente com a ideação suicida (Du *et al.*, 2000) e as tentativas de suicídio (Arias *et al.*, 2001; Vaquero-Lorenzo *et al.*, 2008; Saiz *et al.*, 2008; Wrzosek *et al.*, 2011; González-Castro *et al.*, 2013).

3.2 Gene *SLC6A4*: polimorfismo VNTR Stin2

As condições de genotipagem utilizadas para o polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4*, presentes em 2.4.2.2 do capítulo Materiais e Métodos, permitiram a diferenciação entre os indivíduos homocigóticos para o alelo de 10 repetições (10/10), homocigóticos para o alelo de 12 repetições (12/12) e heterocigóticos (10/12). A variante 10/10 caracteriza-se pelo fragmento de 267 pb, enquanto que para a variante 12/12 é visualizado um fragmento de 300 pb. A variante 10/12 apresenta ambos os fragmentos de 267 pb e 300 pb (Figura 7).

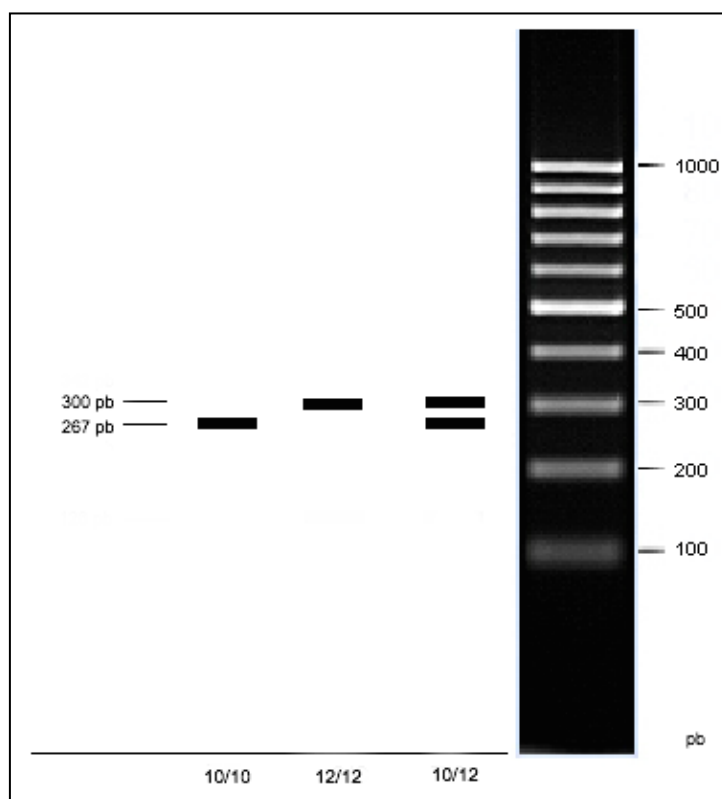


Figura 7 – Representação esquemática dos fragmentos de amplificação esperados para os indivíduos homocigóticos para o alelo de 10 repetições (10/10), homocigóticos para o alelo de 12 repetições (12/12) e heterocigóticos (10/12) relativamente ao polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4*.

Na tabela II estão representadas as frequências genóticas e alélicas relativas ao polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4* das vítimas de suicídio e do grupo controlo.

Tabela II – Distribuição das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4* nas vítimas de suicídio e nos indivíduos controlo

	Genótipos			Alelos	
	10/10	10/12	12/12	10	12
Suicídio (n=180)	29 (0,161)	86 (0,478)	65 (0,361)	144 (0,400)	216 (0,600)
Controlos (n=182)	30 (0,165)	84 (0,461)	68 (0,374)	144 (0,396)	220 (0,604)
	$\chi^2 = 0,097$; df = 2; p = 0,953			$\chi^2 = 0,002$; df = 1; p = 0,964	

Ao analisar a tabela II verifica-se que não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas quer para a distribuição genotípica ($\chi^2= 0,097$; $df= 2$; $p= 0,953$) quer para a distribuição alélica ($\chi^2= 0,002$; $df= 1$; $p= 0,964$) entre as vítimas de suicídio e o grupo controlo relativamente ao polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4*.

Os alelos mais frequentes na população Portuguesa do polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4* são o alelo de 12 repetições (alelo 12), seguido do alelo de 10 repetições (alelo 10), não tendo sido observado o alelo de 9 repetições (alelo 9). As frequências alélicas obtidas quer nas vítimas de suicídio quer nos controlos relativamente ao alelo 12 (0,600 e 0,604, respetivamente) e ao alelo 10 (0,400 e 0,396, respetivamente) estão de acordo com as frequências esperadas para estes alelos na população Europeia (56-66% e 32-42%, respetivamente). Relativamente às frequências genotípicas, observa-se que o genótipo mais comum na população Portuguesa é o genótipo constituído pelos alelos de 10 e de 12 repetições (heterozigótico 10/12).

Alguns estudos de associação reportaram diferentes efeitos do alelo 10 no comportamento suicida. De Luca *et al.* (2006) verificou um efeito protetor do alelo 10 do polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4* para o comportamento suicida. Por outro lado, Lopez de Lara *et al.* (2006) observou que o alelo 10 pode estar envolvido na predisposição para o comportamento suicida. Contudo, os resultados do presente estudo não apoiam nenhuma das duas hipóteses relativas ao papel do alelo 10 no comportamento suicida.

Os resultados do presente estudo sugerem que o polimorfismo VNTR Stin2 do gene *SLC6A4* não está associado ao suicídio na população Portuguesa. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos de associação reportados que não verificaram associação entre o polimorfismo em estudo e o comportamento suicida (Yen *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2005; Pungercic *et al.*, 2006; Saiz *et al.*, 2008; Zupanc *et al.*, 2010).

3.3 Gene *ADRA2A*: polimorfismo C-1291G

As condições de genotipagem do polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* encontram-se descritas em 2.4.2.3 do capítulo Materiais e Métodos. A digestão enzimática com a enzima de restrição *MspI* permitiu diferenciar indivíduos

homozigóticos *wild-type* (genótipo C/C), homozigóticos para o alelo mutante (G/G) e heterozigóticos (C/G) (Figura 8). A variante G/G é caracterizada pela ausência de local de restrição para a enzima *MspI*, sendo definida pela presença de uma banda de 174 pb. A variante C/C apresenta local de restrição para a enzima *MspI* que origina a clivagem do fragmento de 174 pb em fragmentos de 53 pb e 121 pb. A variante C/G apresenta fragmentos de 53 pb, 121 pb e 174 pb. Em todas as variantes foram verificados ainda quatro fragmentos constantes: 5 pb, 62 pb, 116 pb e 165 pb.

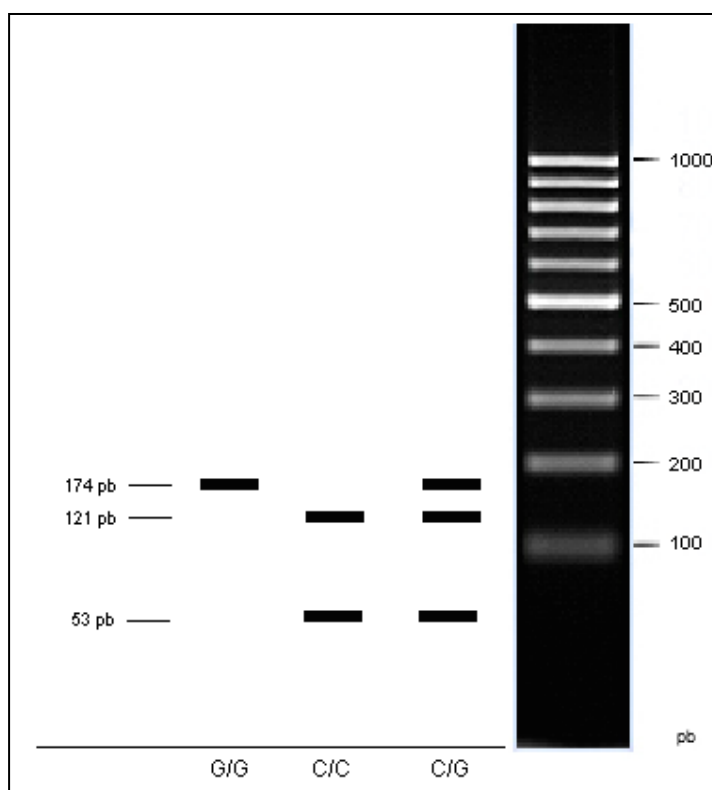


Figura 8 – Representação esquemática dos fragmentos de restrição esperados para os indivíduos homozigóticos para o alelo mutante (G/G), homozigóticos *wild-type* (C/C) e heterozigóticos (C/G) relativamente ao polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A*.

Na tabela III, estão representadas as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* das vítimas de suicídio e do grupo controlo.

Tabela III – Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* nas vítimas de suicídio e nos indivíduos controle.

	Genótipos			Alelos	
	C/C	C/G	G/G	C	G
Suicídio (n=237)	128 (0,540)	91 (0,384)	18 (0,076)	347 (0,732)	127 (0,268)
Controlos (n=254)	150 (0,591)	90 (0,354)	14 (0,055)	390 (0,768)	118 (0,232)
	$\chi^2= 1,660$; df= 2 ; $p= 0,436$			$\chi^2= 1,479$; df= 1 ; $p= 0,224$	

Ao analisar os resultados, constata-se que a frequência do alelo C é menor nas vítimas de suicídio (0,732) comparativamente ao grupo controle (0,768), encontrando-se em concordância com a frequência do alelo C esperada na população Caucasiana (0,71) (Small *et al.*, 2006). A frequência mais elevada do alelo G nas vítimas de suicídio (0,268) em comparação com os controles (0,232) repercutiu-se igualmente nas distribuições genótípicas, uma vez que tanto a frequência do genótipo C/G (0,384) como do genótipo G/G (0,076) das vítimas de suicídio se encontram ligeiramente aumentadas relativamente às frequências dos mesmos genótipos pertencentes ao grupo controle (0,354 e 0,055, respetivamente). O genótipo predominante nas vítimas de suicídio e no grupo controle é o genótipo C/C, sendo a frequência deste genótipo inferior nas vítimas de suicídio (0,540) comparativamente com a frequência observada no grupo controle (0,591).

Comparando os resultados obtidos na amostra de vítimas de suicídio e na amostra do grupo controle, verifica-se que não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas relativamente à distribuição genotípica ($\chi^2= 1,660$; **df= 2**; $p= 0,436$) e à distribuição alélica ($\chi^2= 1,479$; **df= 1**; $p= 0,224$) entre ambos os grupos em estudo.

Para além do presente estudo, existem apenas mais dois estudos de associação efetuados entre o polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* e o suicídio, um na população Caucasiana (Sequeira *et al.*, 2004) e outro na população Japonesa (Fukutake *et al.*, 2008), sendo que apenas o último dos mesmos revelou associação ao suicídio.

Apesar da existência de várias evidências que demonstram níveis alterados dos adrenoreceptores α_{2A} no cérebro de vítimas de suicídio, os resultados do presente estudo parecem indicar que o polimorfismo C-1291G do gene *ADRA2A* não está associado ao suicídio na população Portuguesa.

Capítulo IV

Conclusão

4. Conclusão

Os resultados obtidos não revelaram associação entre os polimorfismos nos genes *HTR2A* (T102C), *SLC6A4* (VNTR Stin2) e *ADRA2A* (C-1291G) e o suicídio na população Portuguesa.

Capítulo V

Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- Anguelova, M., Benkelfat, C. & Turecki, G. (2003). A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Molecular Psychiatry* 8: 646-653.
- Antypa, N., Serretti, A. & Rujescu, D. (2013). Serotonergic genes and suicide: A systematic review. *European Neuropsychopharmacology* 23(10): 1125-1142.
- Arango, V., Ernsberger, P., Marzuk, P. M., Chen, J.-S., Tierney, H., Stanley, M., Reis, D. J. & Mann, J. J. (1990). Autoradiographic Demonstration of Increased Serotonin 5-HT₂ and β -Adrenergic Receptor Binding Sites in the Brain of Suicide Victims. *Archives of General Psychiatry* 47: 1038-1047.
- Arango, V., Underwood, M. D., Gubbi, A. V. & Mann, J. J. (1995). Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Research* 688: 121-133.
- Arias, B., Gastó, C., Catalán, R., Gutiérrez, B., Pintor, L. & Fañanas, L. (2001). The 5-HT_{2A} Receptor Gene 102T/C Polymorphism Is Associated With Suicidal Behavior in Depressed Patients. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 105: 801-804.
- Åsberg, M., Träskman, L. & Thorén, P. (1976). 5-HIAA in the Cerebrospinal Fluid: A Biochemical Suicide Predictor?. *Archives of General Psychiatry* 33: 1193-1197.
- Bah, J., Lindström, M., Westberg, L., Mannerås, L., Ryding, E., Henningsson, S., Melke, J., Rosén, I., Träskman-Bendz, L. & Eriksson, E. (2008). Serotonin transporter gene polymorphisms: Effect on serotonin transporter availability in the brain of suicide attempters. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 162: 221-229.
- Bondy, B., Kuznik, J., Baghai, T., Schüle, C., Zwanzger, P., Minov, C., de Jonge, S., Rupprecht, R., Meyer, H., Engel, R. R., Eisenmenger, W. & Ackenheil, M. (2000). Lack of Association of Serotonin-2A Receptor Gene Polymorphism (T102C) With Suicidal Ideation and Suicide. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 96: 831-835.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.

- Brent, D. A. & Mann, J. J. (2005). Family Genetic Studies, Suicide, and Suicidal Behavior. *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)* 133C: 13-24.
- Buchanan, C. C., Torstenson, E. S., Bush, W. S. & Ritchie, M. D. (2012). A comparison of cataloged variation between International HapMap Consortium and 1000 Genomes Project data. *Journal of the American Medical Informatics Association* 19: 289-294.
- Burmeister, M. (1999). Basic Concepts in the Study of Diseases with Complex Genetics. *Biological Psychiatry* 45: 522-532.
- Chen, K., Yang, W., Grimsby, J. & Shih, J. C. (1992). The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron-exon gene. *Molecular Brain Research* 14: 20-26.
- Collins, F. S., Brooks, L. D. & Chakravarti, A. (1998). A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Research* 8: 1229-1231.
- Correa, H., De Marco, L., Boson, W., Viana, M. M., Lima, V. F. S., Campi-Azevedo, A. C., Noronha, J. C. M., Guatimosim, C. & Romano-Silva, M. A. (2002). Analysis of T102C 5HT_{2A} Polymorphism in Brazilian Psychiatric Inpatients: Relationship With Suicidal Behavior. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22(5/6): 813-817.
- Crawford, J., Sutherland, G. R. & Goldney, R. D. (2000). No Evidence for Association of 5-HT_{2A} Receptor Polymorphism With Suicide. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 96: 879-880.
- De Luca, V., Tharmalingam, S., King, N., Strauss, J., Bulgin, N. & Kennedy, J. L. (2005). Association study of a novel functional polymorphism of the serotonin transporter gene in bipolar disorder and suicidal behaviour. *Psychopharmacology* 182: 128-131.
- De Luca, V., Zai, G., Tharmalingam, S., de Bartolomeis, A., Wong, G. & Kennedy, J. L. (2006). Association study between the novel functional polymorphism of the serotonin transporter gene and suicidal behaviour in schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology* 16: 268-271.
- Direção-Geral da Saúde. (ed.) (2013). Portugal – Saúde Mental em números – 2013. Programa Nacional para a Saúde Mental 1-104.
- Du, L., Bakish, D., Lapierre, Y. D., Ravindran, A. V. & Hrdina, P. D. (2000). Association of Polymorphism of Serotonin 2A Receptor Gene With Suicidal

- Ideation in Major Depressive Disorder. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 96: 56-60.
- Du, L., Faludi, G., Palkovits, M., Demeter, E., Bakish, D., Lapierre, Y. D., Sótonyi, P. & Hrdina, P. D. (1999). Frequency of Long Allele in Serotonin Transporter Gene Is Increased in Depressed Suicide Victims. *Biological Psychiatry* 46: 196-201.
- Dwivedi, Y. (ed.) (2012). *The Neurobiological Basis of Suicide (Frontiers in Neuroscience)*. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Ellsworth, D. L. & Manolio, T. A. (1999). The Emerging Importance of Genetics in Epidemiologic Research. I. Basic Concepts in Human Genetics and Laboratory Technology. *Annals of Epidemiology* 9(1): 1-16.
- Ertugrul, A., Kennedy, J. L., Masellis, M., Basile, V. S., Jayathilake, K. & Meltzer, H., Y. (2004). No association of the T102C polymorphism of the serotonin 2A receptor gene (HTR2A) with suicidality in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 69: 301-305.
- Escribá, P. V., Ozaita, A. & García-Sevilla, J. A. (2004). Increased mRNA Expression of α_{2A} -Adrenoceptors, Serotonin Receptors and μ -Opioid Receptors in the Brains of Suicide Victims. *Neuropsychopharmacology* 29: 1512-1521.
- Feng, J., Sobell, J. L., Heston, L. L., Goldman, D., Cook, E., Kranzler, H. R., Gelernter, J. & Sommer, S. S. (1998). Variants in the α_{2A} AR Adrenergic Receptor Gene in Psychiatric Patients. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 81: 405-410.
- Fiskerstrand, C. E., Lovejoy, E. A. & Quinn, J. P. (1999). An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Letters* 458: 171-174.
- Fukutake, M., Hishimoto, A., Nishiguchi, N., Nushida, H., Ueno, Y., Shirakawa, O. & Maeda, K. (2008). Association of α_{2A} -adrenergic receptor gene polymorphism with susceptibility to suicide in Japanese females. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32: 1428-1433.
- Gaysina, D., Zainullina, A., Gabdulhakov, R. & Khusnutdinova, E. (2006). The Serotonin Transporter Gene: Polymorphism and Haplotype Analysis in Russian Suicide Attempters. *Neuropsychobiology* 54: 70-74.
- Glantz, S. A. (1992). *Primer of biostatistics: the program*. McGraw-Hill, New York.

- González, A. M., Pascual, J., Meana, J. J., Barturen, F., del Arco, C. Pazos, A. & García-Sevilla, J. A. (1994). Autoradiographic Demonstration of Increased α_2 -Adrenoceptor Agonist Binding Sites in the Hippocampus and Frontal Cortex of Depressed Suicide Victims. *Journal of Neurochemistry* 63(1): 256-265.
- González-Castro, T. B., Tovilla-Zárate, C., Juárez-Rojop, I., García, S. P., Velázquez-Sánchez, M. P., Genis, A., Nicolini, H. & Narváez, L. L. (2013). Association of the 5HTR2A gene with suicidal behavior: CASE-control study and updated meta-analysis. *BMC Psychiatry* 13:25.
- González-Maeso, J., Rodríguez-Puertas, R., Meana, J. J., García-Sevilla, J. A. & Guimón, J. (2002). Neurotransmitter receptor-mediated activation of G-proteins in brains of suicide victims with mood disorders: selective supersensitivity of α_{2A} -adrenoceptors. *Molecular Psychiatry* 7: 755-767.
- Grijalba, B., Callado, L. F., Meana, J. J., García-Sevilla, J. A. & Pazos, A. (1996). α_2 -Adrenoceptor subtypes in the human brain: a pharmacological delineation of [³H]RX-821002 binding to membranes and tissue sections. *European Journal of Pharmacology* 310: 83-93.
- Gvion, Y. & Apter, A. (2012). Suicide and Suicidal Behavior. *Public Health Reviews* 34(2): 1-20.
- Hawton, K. & van Heering, K. (2009). Suicide. *The Lancet* 373: 1372-1381.
- Heilä, H., Isometsä, E. T., Henriksson, M. M., Heikkinen, M. E., Marttunen, M. J. & Lönnqvist, J. K. (1997). Suicide and Schizophrenia: A Nation Psychological Autopsy Study on Age- and Sex-Specific Clinical Characteristics of 92 Suicide Victims With Schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* 154(9): 1235-1242.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D. & Lesch, K. P. (1996). Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *Journal of Neurochemistry* 66(6): 2621-2624.
- Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71: 533-554.
- Hranilovic, D., Stefulj, J., Furac, I., Kubat, M., Balija, M. & Jernej, B. (2003). Serotonin Transporter Gene Promoter (5-HTTLPR) and Intron 2 (VNTR) Polymorphisms in Croatian Suicide Victims. *Biological Psychiatry* 54: 884-889.

- Instituto Nacional de Estatística. (2014). Taxa de mortalidade por lesões autoprovocadas intencionalmente (suicídio) por 100 000 habitantes (N.º) por Sexo, http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0003736&contexto=bd&selTab=tab2, 2 de junho de 2014.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431(21): 931-945.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. (1985). Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* 314(7): 67-73.
- Jernej, B., Stefulj, J., Hranilovic, D., Balijsa, M., Skavic, J. & Kubat, M. (2004). Intronic polymorphism of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter: indication for combined effect in predisposition to suicide. *Journal of Neural Transmission* 111: 733-738.
- Judy, J. T., Seifuddin, F., Mahon, P. B., Huo, Y., Goes, F. S., Jancic, D., Schweizer, B., Mondimore, F. M., MacKinnon, D. F., DePaulo, J. R., Gershon, E. S., McMahon, F. J., Cutler, D. J., Zandi, P. P., Potash, J. B. & Willour, V. L. (2011). Association Study of Serotonin Pathway Genes in Attempted Suicide. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 159B: 112-119.
- Kaiser, R., Müller-Oerlinghausen, B., Filler, D., Tremblay, P.-B., Berghöfer, A., Roots, I. & Brockmöller, J. (2002). Correlation Between Serotonin Uptake in Human Blood Platelets With the 44-bp Polymorphism and the 17-bp Variable Number of Tandem Repeat of the Serotonin Transporter. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 114: 323-328.
- Khait, V. D., Huang, Y.-y., Zalsman, G., Oquendo, M. A., Brent, D. A., Harkavy-Friedman, J. M. & Mann, J. J. (2005). Association of Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Binding and the T102C Polymorphism in Depressed and Healthy Caucasian Subjects. *Neuropsychopharmacology* 30: 166-172.
- Lario, S., Calls, J., Cases, A., Oriola, J., Torras, A. & Rivera, F. (1997). Short Report on DNA Marker at Candidate Locus. *Clinical Genetics* 51: 129-130.
- Lesch, K.-P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B. L., Murphy, D. L., Riederer, P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission* 95: 157-162.
- Li, D. & He, L. (2007). Meta-analysis supports association between serotonin transporter (5-HTT) and suicidal behavior. *Molecular Psychiatry* 12: 47-54.

- Li, D., Duan, Y. & He, L. (2006). Association study of serotonin 2A receptor (*5-HT2A*) gene with schizophrenia and suicidal behavior using systematic meta-analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 1006-1015.
- Lopez de Lara, C., Dumais, A., Rouleau, G., Lesage, A., Dumont, M., Chawky, N., Alda, M., Benkelfat, C. & Turecki, G. (2006). STin2 Variant and Family History of Suicide as Significant Predictors of Suicide Completion in Major Depression. *Biological Psychiatry* 59: 114-120.
- Mann, J. J., Stanley, M., McBride, A. & McEwen, B. S. (1986). Increased Serotonin₂ and β -Adrenergic Receptor Binding in the Frontal Cortices of Suicide Victims. *Archives of General Psychiatry* 43: 954-959.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16(3): 1215.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LI: 263-273.
- Murphy, T. M., Ryan, M., Foster, T., Kelly, C., McClelland, R., O'Grady, J., Corcoran, E., Brady, J., Reilly, M., Jeffers, A., Brown, K., Maher, A., Bannan, N., Casement, A., Lynch, D., Bolger, S., Tewari, P., Buckley, A., Quinlivan, L., Daly, L., Kelleher, C. & Malone, K. M. (2011). Risk and protective genetic variants in suicidal behaviour: association with *SLC1A2*, *SLC1A3*, *5-HTR1B* & *NTRK2* polymorphisms. *Behavioral and Brain Functions* 7:22.
- Nakamura, Y. (2009). DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *Journal of Human Genetics* 54: 1-8.
- Nicklas, J. A. & Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376: 1160-1167.
- Ogilvie, A. D., Battersby, S., Bubb, V. J., Fink, G., Harmar, A. J., Goodwin, G. M. & Smith, C. A. D. (1996). Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *The Lancet* 347: 731-733.
- Ono, H., Shirakawa, O., Nishiguchi, N., Nishimura, A., Nushida, H., Ueno, Y. & Maeda, K. (2001). Serotonin 2A receptor gene polymorphism is not associated with completed suicide. *Journal of Psychiatric Research* 35: 173-176.

- Ordway, G. A., Widdowson, P. S., Smith, K. S. & Halaris, A. (1994). Agonist Binding to α_2 -Adrenoceptors Is Elevated in the Locus Coeruleus from Victims of Suicide. *Journal of Neurochemistry* 63(2): 617-624.
- Pandey, G. N., Pandey, S. C., Dwivedi, Y., Sharma R. P., Janicak, P. G. & Davis J. M. (1995). Platelet Serotonin-2A Receptors: A Potencial Biological Marker for Suicidal Behavior. *American Journal of Psychiatry* 152(6): 850-855.
- Preuss, U. W., Koller, G., Bahlmann, M., Soyka, M. & Bondy, B. (2000). No Association Between Suicidal Behavior and 5-HT2A-T102C Polymorphism in Alcohol Dependents. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 96: 877-878.
- Pungercic, G., Videtic, A., Pestotnik, A., Pajnic, I. Z., Zupanc, T., Balazic, J., Tomori, M. & Komel, R. (2006). Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms: a study on Slovenian population of suicide victims. *Psychiatric Genetics* 16(5): 187-191.
- Ramamoorthy, S., Bauman, A. L., Moore, K. R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A. S., Ganapathy, V. & Blakely, R. D. (1993). Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 2542-2546.
- Roy, A. (1983). Family History of Suicide. *Archives of General Psychiatry* 40: 971-974.
- Roy, A., Segal, N. L. & Sarchiapone, M. (1995). Attempted Suicide Among Living Co-Twins of Twin Suicide Victims. *Archives of General Psychiatry* 152(7): 1075-1076.
- Roy, A., Segal, N. L., Centerwall, B. S. & Robinette, D. (1991). Suicide in Twins. *Archives of General Psychiatry* 48: 29-32.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiz, P. A., García-Portilla, M. P., Paredes, B., Arango, C., Morales, B., Alvarez, V., Coto, E., Bascaran, M.-T., Bousoño, M. & Bobes, J. (2008). Association between the A-1438G polymorphism of the serotonin 2A receptor gene and nonimpulsive suicide attempts. *Psychiatric Genetics* 5: 213-218.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

- Schulsinger, F., Kety, S. S., Rosenthal, D. & Wender, P. H. (1979). A family study of suicide. In: Schou M., Stromgren E, editors: *Origin, Prevention and Treatment of Affective Disorders*. New York: Academic Press 277-287.
- Sequeira, A., Mamdani, F., Lalovic, A., Anguelova, M., Lesage, A., Seguin, M., Chawky, N., Desautels, A. & Turecki, G. (2004). Apha 2A adrenergic receptor gene and suicide. *Psychiatry Research* 125: 87-93.
- Shen, Y., Li, H., Gu, N., Tan, Z., Tang, J., Fan, J., Li, X., Sun, W. & He, L. (2004). Relationship between suicidal behavior of psychotic inpatients and serotonin transporter gene in Han Chinese. *Neuroscience Letters* 372: 94-98.
- Small, K. M., Brown, K. M., Seman, C. A., Theiss, C. T. & Liggett, S. B. (2006). Complex haplotypes derived from noncoding polymorphisms of the intronless α_{2A} -adrenergic gene diversify receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(14): 5472-5477.
- Sparkes, R. S., Lan, N., Klisak, I., Mohandas, T., Diep, A., Kojis, T., Heinzmann, C. & Shih, J. C. (1991). Assignment of a Serotonin 5HT-2 Receptor Gene (*HTR2*) to Human Chromosome 13q14-q21 and Mouse Chromosome 14. *Genomics* 9: 461-465.
- Stanley, M. & Mann, J. J. (1983). Increased Serotonin-2 Binding Sites in Frontal Cortex of Suicide Victims. *The Lancet*: 214-216.
- Tan, E. C., Chong, S. A., Chan, A. O. M. & Tan, C. H. (2002). No Evidence for Association of the T102C Polymorphism in the Serotonin Type 2A Receptor With Suicidal Behavior in Schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 114: 321-322.
- The 1000 Genomes Project Consortium. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491: 56-65.
- The International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature* 426(18/25): 789-794.
- The International HapMap Consortium. (2007). A second generation human haplotype map over 3.1 million SNPs. *Nature* 449(7164): 851-861.
- Tsai, S.-J., Hong, C.-J., Hsu, C.-C., Cheng, C.-Y., Liao, W.-Y., Song, H.-L. & Lai, H.-C. (1999). Serotoni-2A receptor polymorphism (102T/C) in mood disorders. *Psychiatry Research* 87: 233-237.

- Turecki, G., Ernst, C., Jollant, F., Labonté, B. & Mechawar, N. (2012). The neurodevelopmental origins of suicidal behavior. *Trends in Neurosciences* 35(1): 14-23.
- Turecki, G., Brière, R., Dewar, K., Antonetti, T., Lesage, A. D., Séguin, M., Chawky, N., Vanier, C., Alda, M., Joober, R., Benkelfat, C. & Rouleau, G. A. (1999). Prediction of Level of Serotonin 2A Receptor Binding by Serotonin Receptor 2A Genetic Variation in Postmortem Brain Samples From Subjects Who Did or Did Not Commit Suicide. *American Journal of Psychiatry* 156(9): 1456-1458.
- Vaquero-Lorenzo, C., Baca-Garcia, E., Diaz-Hernandez, M., Perez-Rodriguez, M. M., Fernandez-Navarro, P., Giner, L., Carballo, J. J., Saiz-Ruiz, J., Fernandez-Piqueras, J., Baldomero, E. B., de Leon, J. & Oquendo, M. A. (2008). Association Study of Two Polymorphisms of the Serotonin-2A Receptor Gene and Suicide Attempts. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 147B: 645-649.
- Visvikis, S., Schlenck, A. & Maurice, M. (1998). DNA Extraction and Stability for Epidemiological Studies. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36(8): 551-555.
- Warren, J. T., Peacock, M. L., Rodriguez, L. C. & Fink, J. K. (1993). An *MspI* polymorphism in the human serotonin receptor gene (HTR2): detection by DGGE and RFLP analysis. *Human Molecular Genetics* 2(3): 338.
- Weber, J. L. & May, P. E. (1989). Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *The American Journal of Human Genetics* 44: 388-396.
- World Health Organization_a. (2012). Public Health Action for the Prevention of Suicide – A Framework. WHO Press. 1-22.
- World Health Organization_b. (2012). World Suicide Prevention Day – Suicide Prevention Across the Globe: Strengthening Protective Factors and Instilling Hope. International Association for Suicide Prevention. 1-3.
- Wrzosek, M., Łukaszewicz, J., Wrzosek, M., Serafin, P., Jakubczyk, A., Klimkiewicz, A., Matsumoto, H., Brower, K. J. & Wojnar, M. (2011). Association of polymorphisms in *HTR2A*, *HTR1A* and *TPH2* genes with suicide attempts in alcohol dependence: a preliminary report. *Psychiatry Research* 190(1): 149-151.

- Wu, K. C.-C., Chen, Y.-Y. & Yip, P. S. F. (2012). Suicide Methods in Asia: Implications in Suicide Prevention. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 9: 1135-1158.
- Yang-Feng, T. L., Kobilka, B. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Francke, U. (1987). Chromosomal assignment of genes for an alpha-adrenergic receptor (ADRAR) and for another member of this receptor family coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. (Abstract). *Cytogenetics and Cell Genetics* 46: 722-723.
- Yen, F.-C., Hong, C.-J., Hou, S.-J., Wang, J.-K. & Tsai, S.-J. (2003). Association Study of Serotonin Transporter Gene VNTR Polymorphism and Mood Disorders, Onset Age and Suicide Attempts in a Chinese Sample. *Biological Psychiatry* 48: 5-9.
- Yoon, H.-K. & Kim, Y.-K. (2008). Association between serotonin-related gene polymorphisms and suicidal behavior in depressive patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32: 1293-1297.
- Zhang, J., Shen, Y., He, G., Li, X., Meng, J., Guo, S., Li, H., Gu, N., Feng, G. & He, L. (2008). Lack of association between three serotonin genes and suicidal behavior in Chinese psychiatric patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32: 467-471.
- Zhou, J. (2004). Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. *Drugs Future* 29(12): 1235-1244.
- Zupanc, T., Pregelj, P., Tomori, M., Komel, R. & Paska, A. V. (2010). No Association Between Polymorphisms in Four Serotonin Receptor Genes, Serotonin Transporter Gene and Alcohol-Related Suicide. *Psychiatria Danubina* 22(4): 522-527.