

Agradecimentos

Este trabalho como também todo o meu percurso académico não seriam possíveis sem a contribuição de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de exprimir o meu agradecimento e profundo reconhecimento:

À Professora Doutora Alda Cardoso, orientadora deste projecto, o meu muito obrigado pelo referencial humano e profissional que constitui, por toda a disponibilidade, acolhimento, atenção, amizade e conhecimentos transmitidos ao longo deste ano.

Um agradecimento à Professora Doutora Alda Cardoso, responsável pela Unidade de Genética Clínica e Molecular da Delegação Centro do INMLCF, por me ter proporcionado todas as condições logísticas para o desenvolvimento da minha dissertação de Mestrado e ao Professor Duarte Nuno Vieira, presidente do Instituto Nacional de Medicina Legal. Um agradecimento também a todos os patologistas forenses e técnicos do Instituto Nacional de Medicina Legal que procederam à selecção das amostras.

À Andreia Marques por toda a ajuda, disponibilidade e amizade no decorrer deste projecto. Agradeço também à Sandra, à Márcia e ao Pedro, por todo o acompanhamento ao longo da minha jornada na Unidade de Genética e Clínica Molecular do Instituto de Medicina Legal.

Aos meus amigos de curso que sempre me acompanharam, por todos os bons momentos partilhados. Um especial agradecimento à Cláudia por todo o suporte, carinho e companhia, principalmente no decorrer deste ano.

À minha família, em especial aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e me ajudaram a perseguir os meus objectivos, pela compreensão, pelos imensos sacrifícios suportados e pelo constante encorajamento. A eles dedico o meu trabalho.

À minha irmã Sandra, por todos os bons momentos partilhados, por todo o carinho e apoio.

Por último e não menos importante, um agradecimento ao Pedro, por toda a compreensão, incentivo, carinho, e por fazer do meu percurso académico uma jornada fantástica.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais sobre o comportamento suicida.....	1
1.2 Epidemiologia.....	1
1.3 Factores de risco.....	3
1.4 Componente genética e neurobiologia do suicídio.....	4
1.5 Considerações gerais de genética.....	5
1.5.1 Genoma, DNA, genes e alelos.....	5
1.5.2 Tipos de variantes genéticas.....	6
1.5.3 Estratégia de mapeamento genético.....	11
1.5.4 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	12
1.6 Fusão de membranas e transmissão sináptica.....	13
1.6.1 Proteínas SNAREs.....	14
1.7 Genes candidatos: Proteínas SNAREs.....	18
1.8 Objectivos.....	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1 Selecção e recolha da amostra.....	21
2.2 Extracção do DNA genómico.....	22
2.3 Quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA.....	23
2.4 Reacção em cadeia da polimerase.....	24
2.4.1 Fundamentos teóricos da técnica de reacção da polimerase em cadeia.....	24

2.4.2 Condições da reacção da polimerase em cadeia	26
2.4.2.1 Polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i>	26
2.4.2.1 Polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i>	26
2.5 Digestão com enzimas de restrição	27
2.5.1 Fundamentos teóricos das enzimas de restrição	27
2.5.2 Condições da digestão com enzimas de restrição	27
2.5.2.1 Polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i>	27
2.5.2.2 Polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i>	27
2.6 Electroforese em gel de agarose.....	28
2.6.1 Fundamentos teóricos da electroforese em gel de agarose	28
2.6.2 Condições da electroforese em gel de agarose	30
2.6.2.1 Polimorfismo intrão 7 do gene da <i>STX1A</i>	30
2.6.2.2 Polimorfismo T1069C do gene da <i>SNAP-25</i>	30
2.7 Análise estatística	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Análise do polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i>.....	31
3.2 Análise do polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i>.....	38
4. CONCLUSÃO.....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Lista de figuras

Figura 1: Representação gráfica da evolução das taxas de suicídio em todo o mundo, desde 1950 e estimativas previstas para o ano 2020.....	2
Figura 2: <i>Restriction fragment length polymorphism</i> (RFLP).....	7
Figura 3: Imagem representativa do polimorfismo <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (VNTR).	7
Figura 4: <i>Short Tandem Repeats</i> (STR), constituídos por curtas sequências repetitivas de nucleótidos, de dois a seis pares de bases.....	8
Figura 5: Imagem representativa de um <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP).....	9
Figura 6: <i>Copy Number Variation</i> (CNV).....	9
Figura 7: Imagem gráfica representativa das frequências genotípicas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	12
Figura 8: Imagem ilustrativa do ciclo da vesícula sináptica.....	14
Figura 9: A) Representação esquemática da estrutura das proteínas SNARE sinápticas: SNAP-25, STX 1 e VAMP (sinaptobrevina). B) Representação esquemática da estrutura cristalina do Complexo SNARE.....	16
Figura 10: Imagem ilustrativa do mecanismo de fusão das vesículas sinápticas mediado pelas proteínas do complexo SNARE.....	17
Figura 11: Imagem representativa dos fundamentos da técnica de PCR.....	25
Figura 12: Representação esquemática da técnica de electroforese.....	29
Figura 13: Representação esquemática da localização cromossómica do gene <i>STX1A</i> no cromossoma 7.....	31
Figura 14: Representação esquemática da estrutura do gene <i>STX1A</i> e localização do polimorfismo T/C no intrão 7.....	31

Figura 15: Imagem do perfil electroforético obtido resultante da separação dos produtos da digestão com a enzima <i>HpyCH4IV</i> , relativos ao polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i>	32
Figura 16: Representação gráfica das distribuições (%) genóticas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene <i>STX1A</i> na análise de género, para o sexo masculino.....	35
Figura 17: Representação gráfica das distribuições (%) genóticas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene <i>STX1A</i> na análise de género, para o sexo feminino.....	35
Figura 18: Representação gráfica das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene <i>STX1A</i> , em vítimas de suicídio violento e controlos.....	36
Figura 19: Representação gráfica das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene <i>STX1A</i> , em vítimas de suicídio não violento e controlos.....	37
Figura 20: Representação esquemática da localização do gene <i>SNAP-25</i> no cromossoma 20.....	38
Figura 21: Representação esquemática da estrutura do gene <i>SNAP-25</i> e localização do polimorfismo T1069C na região 3'UTR.....	38
Figura 22: Imagem da electroforese dos fragmentos resultantes da digestão com a enzima <i>DdeI</i> , para o polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i>	39
Figura 23: Representação gráfica das distribuições (%) genóticas e alélicas do polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i> entre casos de suicídio e controlos masculinos.....	41
Figura 24: Representação gráfica das distribuições (%) genóticas e alélicas do polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i> , entre casos de suicídio e controlos femininos.....	42

Figura 25: Representação gráfica das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, em vítimas de suicídio violento e controles.....43

Figura 26: Representação gráfica das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene *SNAP-25*, em vítimas de suicídio não violento e controles.....44

Lista de tabelas

Tabela I: Distribuições genótípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i> , na amostra total de suicídios e na amostra total de controlos.....	32
Tabela II: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i> na amostra de suicídios e na amostra de controlos.....	33
Tabela III: Distribuições genótípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i> , relativas à análise de género.....	34
Tabela IV: Distribuições genótípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene <i>STX1A</i> , na amostra de suicídio violento e na amostra de suicídio não violento.....	36
Tabela V: Distribuições genótípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i> , na amostra total de suicídios e na amostra total de controlos.....	39
Tabela VI: Distribuição genotípica e alélica, com as respectivas frequências, do polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i> em suicídios e controlos.....	40
Tabela VII: Distribuições genótípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i> , relativas à análise de género.....	41
Tabela VIII: Distribuições genótípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo T1069C do gene <i>SNAP-25</i> , na amostra de suicídio violento e na amostra de suicídio não violento.....	43

Lista de abreviaturas

μl	microlitro
A	Adenina
AAA⁺	ATPases associadas a várias actividades celulares
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina
CNV	<i>Copy number variation</i>
df	Número de graus de liberdade
dNTPs	Desoxinucleótidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DZ	Dizigóticos
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
G	Guanina
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
Kb	Kilobases
MZ	Monozigóticos
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive fusion protein</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacção de Polimerase em Cadeia
PGM	Projecto Genoma Humano
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico

RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
SNAP	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein</i>
SNAP-25	Proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa
SNAP-25	Gene que codifica a proteína SNAP-25
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor</i>
STX1A	Sintaxina1A
STX1A	Gene que codifica a proteína Sintaxina 1A
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
T	Timina
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
WHO	Organização Mundial de Saúde
VAMP	Sinaptobrevina
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>

Resumo

O suicídio constitui um grave problema de saúde pública, com taxas crescentes a nível global. Nos últimos 50 anos o suicídio aumentou em cerca de 60%, sendo actualmente uma das causas líderes de morte em todo o mundo. O suicídio é um fenómeno complexo, resultante da interacção de vários factores de predisposição, entre os quais os factores genéticos desempenham um papel importante. Dada a elevada prevalência deste fenómeno, a identificação dos factores que poderão contribuir para a sua susceptibilidade torna-se crucial, no sentido de, futuramente contribuir para a identificação de indivíduos de risco e consequentemente diminuir as taxas de suicídio. Várias evidências sugerem que as proteínas do complexo SNARE, particularmente a SNAP-25 e STX1A estão implicadas na etiologia do suicídio. No entanto, até à data não foram realizados estudos genéticos a nível mundial, no sentido de se investigar uma eventual associação entre os genes da maquinaria exocitótica e o suicídio. Assim, no presente trabalho investigou-se o papel dos genes *SNAP-25* e *STX1A* na etiologia do suicídio na população portuguesa e realizámos também análises de género e de método utilizado para consumar o suicídio.

Para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, os resultados obtidos não revelam diferenças estatisticamente significativas para as distribuições genotípicas e alélicas quer para a amostra total (distribuições genotípicas: $X^2=1,568$; $df=2$; $p=0,456$, distribuições alélicas $X^2=1,325$; $df=1$; $p=0,250$), quer para a amostra fragmentada por género [distribuições genotípicas (suicídio sexo masculino: $X^2=0,790$; $df=2$; $p=0,674$; suicídio sexo feminino: $X^2=1,240$; $df=2$; $p=0,538$); distribuições alélicas (suicídio sexo masculino: $X^2=0,678$; $df=1$; $p=0,410$, suicídio sexo feminino: $X^2=0,540$; $df=1$; $p=0,479$)] e método de suicídio [distribuições genotípicas (suicídio violento: $X^2=2,300$; $df=2$; $p=0,317$, suicídio não violento: $X^2=0,019$; $df=2$; $p=0,990$), distribuições alélicas (suicídio violento: $X^2=1,967$; $df=1$; $p=0,161$, suicídio não violento: $X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,974$)]. À semelhança do gene da *STX1A*, os resultados são negativos para as distribuições genotípicas e alélicas no que diz respeito ao polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, na amostra total (distribuições genotípicas: $X^2=1,352$; $df=2$; $p=0,509$, distribuições alélicas: $X^2=0,072$; $df=1$; $p=0,788$) e estratificada por género [distribuições genotípicas (suicídio sexo masculino: $X^2=0,970$; $df=2$; $p=0,616$, suicídio sexo feminino: $X^2=0,271$; $df=2$; $p=0,873$), distribuições alélicas (suicídio sexo masculino: $X^2=0,132$; $df=1$; $p=0,716$, suicídio sexo feminino: $X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,976$)] e método

[distribuições genóticas (suicídio violento: $X^2=2,077$; $df=2$; $p=0,345$, suicídio não violento: $X^2=0,043$; $df=2$; $p=0,972$), distribuições alélicas (suicídio violento: $X^2=0,135$; $df=1$; $p=0,714$, suicídio não violento: $X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,973$)].

Os resultados obtidos revelam que os genes *STX1A* e *SNAP-25* não desempenham um papel directo na etiologia do suicídio na amostra estudada da população portuguesa. Apesar dos resultados negativos, este estudo é pioneiro relativamente à investigação dos genes da maquinaria exocitótica no suicídio, o que permitirá desencadear a investigação das variantes genéticas estudadas noutras populações mundiais, bem como de novas variantes a nível global, no sentido de se esclarecer o papel dos genes da maquinaria exocitótica na etiologia do suicídio, contribuindo desta forma para identificar grupos de risco e consequentemente diminuir as taxas de suicídio.

Palavras-Chave: Suicídio; Genética; Proteínas SNAREs; Estudos de associação; Genes *STX1A*, *SNAP-25*

1. Introdução

1.1 Considerações gerais sobre o comportamento suicida

O comportamento suicida inclui ideação suicida, tentativas de suicídio e suicídio propriamente dito (Tsai et al., 2011). A ideação suicida inclui ideias, pensamentos e desejos de acabar com a própria vida. As tentativas de suicídio podem ser definidas como acções tomadas para acabar com a própria vida não apresentando no entanto um resultado fatal (Turecki et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), o suicídio “é o resultado de um acto deliberadamente iniciado e realizado por uma pessoa, com total conhecimento ou expectativa do seu resultado fatal” (WHO, 2005). O comportamento suicida pode ser visto como um contínuo, ao longo do qual se evidencia um gradiente de heterogeneidade e severidade, sendo o suicídio considerado um grupo mais homogéneo do que as tentativas de suicídio (Turecki, 1999). Tanto as ideações como as tentativas de suicídio constituem factores altamente preditivos de um futuro suicídio. De facto, cerca de 50% dos suicídios, apresentam um historial de prévias tentativas de suicídio (Isometsä e Lonngvist, 1998).

O suicídio é uma das principais causas de morte em todo o mundo e, dado a sua elevada prevalência e significativo impacto social, é considerado um grave problema de saúde pública. O modelo biológico relativo ao suicídio foi pela primeira vez contextualizado na década de 60 do século passado, seguindo-se uma série de estudos com o intuito de compreender melhor este fenómeno. No entanto, apesar do imenso progresso alcançado, ainda não se identificaram exactamente os mecanismos neurobiológicos implicados na etiologia do suicídio (Ernst et al., 2009).

1.2 Epidemiologia

O suicídio é um grave problema de saúde pública, com taxas crescentes a nível global. Anualmente ocorrem cerca de 1 milhão de mortes por suicídio em todo o mundo, o que corresponde a uma taxa de 16 por cada 100.000 habitantes. Só nos últimos 50 anos, registou-se um aumento de aproximadamente 60% para a taxa de suicídio (WHO, 2007). De facto, a nível global, o suicídio encontra-se entre as dez causas líderes de morte (Levi et al., 2003). Em alguns países apresenta-se como a terceira principal causa de morte numa faixa etária compreendida entre os 15-44 anos de

idade (WHO, 2007). De acordo com a WHO, é estimado que no ano 2020 cerca de 1,53 milhões de pessoas morrerão por suicídio, o que corresponde a uma morte em cada 20 segundos (Bertolote e Fleischmann, 2005).

De acordo com estudos epidemiológicos, observam-se acentuadas diferenças nas taxas de suicídio entre os diversos países e regiões, sendo as mais baixas detectadas nos países da América Central e do Sul. Nos Estados Unidos, Europa ocidental e Ásia são encontradas taxas intermédias. Por outro lado, a Europa Oriental apresenta as maiores taxas de suicídio (Nock et al., 2008). Apesar de as taxas de suicídio da China e da Índia se apresentarem dentro e abaixo da média global, respectivamente, cerca de 30% do total de suicídios são consumados nestes dois países, devido à sua elevada população (Bertolote e Fleischmann, 2005). Convém salientar a possibilidade de as estimativas das taxas de suicídio se encontrarem abaixo do valor real. Em alguns países, muitos suicídios não são provavelmente reportados. Diferentes razões podem contribuir para que muitos suicídios não sejam correctamente registados. Entre estes destacam-se a heterogeneidade dos procedimentos de registo de morte (o que pode levar a erros de classificação do suicídio em acidentes ou mortes indeterminadas) e diferentes valores culturais e sociais (o que pode resultar na omissão destes casos) (Hawton e van Heeringen, 2009).

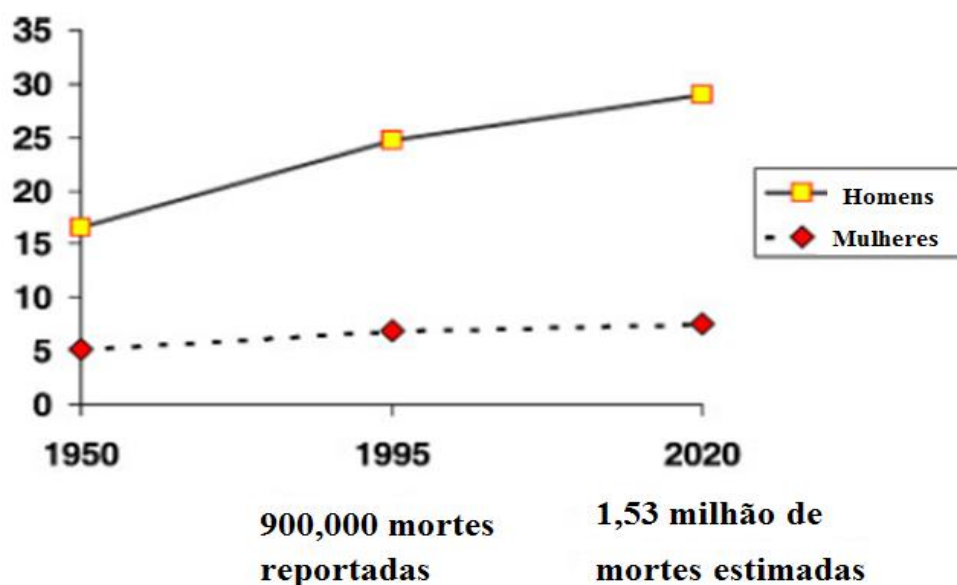


Figura 1: Representação gráfica da evolução das taxas de suicídio em todo o mundo, desde 1950 e estimativas previstas para o ano 2020. Estima-se que no ano 2020 ocorram 1,53 milhões de mortes por suicídio. Adaptado de Bertolote e Fleischmann (2005).

Registam-se também acentuadas diferenças por faixa etária e por género (Hawton e van Heeringen, 2009). As taxas de suicídio são normalmente mais altas nas pessoas com idades mais avançadas. Contudo, nos últimos anos esta situação tem-se alterado, observando-se um aumento das taxas para a faixa etária mais jovem. Isto torna-se ainda mais preocupante se tivermos em conta o actual envelhecimento da população, com a população de idosos a aumentar a taxas superiores relativamente à dos jovens (Bertolote e Fleischmann, 2002). No que se refere às diferenças de género no suicídio, as taxas de suicídio são duas a quatro vezes superiores nos homens comparativamente com as mulheres (Hawton e van Heeringen, 2009).

Em Portugal, o suicídio também segue as tendências globais, aumentando cada vez mais com o decorrer dos anos (SPS, 2013). Estatísticas recentes apontam para uma taxa de mortalidade de 11,5 por cada 100.000 habitantes (WHO, 2011). Os homens são mais afectados que as mulheres, sendo a distribuição por género de 15,6 por 100 mil habitantes para os homens e de 4 por 100 mil habitantes para as mulheres. Isto corresponde a um rácio de aproximadamente 4 entre homens e mulheres (WHO, 2011).

Considerando as estimativas mencionadas, é imperativo investigar factores de risco biológicos associados ao suicídio, que no seu conjunto contribuirão para identificar grupos de risco bem como o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o comportamento suicida.

1.3 Factores de risco

O suicídio é um fenómeno complexo, resultante de factores de risco distais e proximais. Os factores de risco distais aumentam a susceptibilidade à ocorrência de suicídio, enquanto os proximais actuam como precipitantes. Entre os factores distais incluem-se: história familiar de suicídio, componente genética, modificações epigenéticas, traços de personalidade, adversidades no início da vida e abuso crónico de substâncias psicoactivas. Por sua vez, os factores proximais incluem factores de risco como: presença de doenças somáticas/mentais, crises psicossociais, eventos stressantes recentes e acessibilidade a meios de consumir o suicídio. Factores sociodemográficos, como o género, educação, crenças religiosas, podem também ser considerados como moderadores entre os factores de risco proximais e distais (Turecki et al., 2012).

Por exemplo, a presença de uma doença mental evidencia-se como um dos principais factores de risco (Bondy, 2006). Vários estudos estimam que cerca de 90% dos suicídios consumados apresentavam um distúrbio mental, sendo a depressão *major*, o abuso de álcool ou substância psicoactivas os distúrbios mais prevalentes (Isometsä, 2001; Arsenault-Lapierre et al., 2004). Certos traços de personalidade, como a agressividade e a impulsividade também têm sido associados ao comportamento suicida. De facto, uma série de estudos corroboram uma relação entre a presença de comportamentos agressivos/impulsivos e o suicídio (Dumais et al. 2005; Turecki, 2005; Mann et al., 2008).

1.4 Componente genética e neurobiologia do suicídio

Os factores genéticos na etiologia do suicídio são evidenciados pelos estudos familiares, de gémeos e de adopção. Os estudos familiares do suicídio baseiam-se na comparação entre as taxas de suicídio nas famílias de vítimas de suicídio, com as taxas de suicídio nos parentes de indivíduos controlos (Brent e Mann, 2005). Uma série de estudos familiares e de história familiar mostrou que o suicídio agrega em famílias, e que esta agregação é independente da transmissão de doenças psiquiátricas (Runeson e Asberg, 2003; Brent e Mann, 2005; Tidemalm et al., 2011). No entanto factores ambientais como um ambiente familiar hostil, imitação, abusos sexuais ou físicos, perda de um parente próximo, também podem contribuir para a agregação familiar do suicídio (Brent e Melhem, 2008). Isoladamente estes estudos, não permitem, portanto, inferir sobre a hereditariedade do suicídio, uma vez que não possibilitam a distinção entre os factores genéticos e os ambientais (Brent e Mann, 2005). Os estudos de gémeos também sugerem que a componente genética está implicada no suicídio. Nestes estudos são comparadas taxas de concordância para o suicídio entre gémeos monozigóticos (MZ) e gémeos dizigóticos (DZ). Em vários estudos, reportou-se uma taxa de concordância para o suicídio bastante superior em gémeos MZ comparativamente com os gémeos DZ, o que é consistente com a influência genética no suicídio (Roy, 1993; Roy e Segal, 2001; Voracek e Loibl, 2007). Os estudos de adopção permitem separar a parte genética da ambiental. Nestes estudos, são comparadas as taxas de suicídio entre os parentes biológicos e os parentes adoptivos de indivíduos adoptados que consumaram suicídio. Em vários estudos de adopção foram reportadas taxas de concordância para o suicídio mais elevadas nos parentes biológicos do que nos adoptivos, sugerindo que os factores

genéticos desempenham um papel importante na etiologia do suicídio (Roy et al., 1999; Brent e Mann, 2005; Brent e Melhem, 2008)

A contribuição genética no suicídio resulta da interação de múltiplos genes de efeito *minor*, que interagem não só entre si, mas também com os diversos factores ambientais (Bondy, 2006).

Estudos a nível mundial reportaram alterações em vários sistemas de neurotransmissores associadas ao suicídio (Brezo et al., 2008; Costanza et al., 2013). Consequentemente, os estudos de genética molecular para identificar possíveis genes de susceptibilidade para o suicídio focaram-se nestes sistemas, sendo o sistema serotoninérgico o principal alvo de investigação (Mann et al., 2008; Ernst et al., 2009). Neste âmbito, foram investigados genes do transportador de serotonina (5-HTT), dos receptores de serotonina e de enzimas responsáveis pelo metabolismo da serotonina (Brezo et al., 2008) e até ao momento os genes *5-HTT* e da triptofano hidroxilase (TPH) têm sido implicados na etiologia do suicídio em diferentes populações mundiais (Brezo et al., 2008; Ernst et al., 2009).

1.5 Considerações gerais de genética

1.5.1 Genoma, DNA, genes e alelos

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a unidade básica da hereditariedade, contendo a informação genética de um organismo. O DNA consiste num hélice antiparalela de duas cadeias lineares constituídas por 4 nucleótidos distintos: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T). Cada nucleótido é constituído por um grupo fosfato, um açúcar de 5 carbonos (desoxirribose) e uma base nitrogenada (A,T,C,G). As duas cadeias estão unidas por ligações de hidrogénio entre bases especificamente pareadas. O pareamento das bases segue a regra de complementaridade: A-T e C-G. Deste modo cada par de base inclui uma purina (A ou G) e uma pirimidina (C ou T) (Reid-Lombardo e Petersen, 2010).

Os genes consistem em sequências de DNA que contêm a informação necessária para codificar proteínas. Da estrutura do gene fazem parte exões (regiões que contêm informação necessária para codificar a sequência de aminoácidos da proteína resultante), intrões (regiões que não codificam aminoácidos sendo removidas do mRNA

após síntese) e regiões reguladoras (5'UTR e 3'UTR) (Ellsworth e Manolio, 1999). Os alelos definem-se como formas alternativas de um gene e a sua posição no genoma é designada *locus*. O termo genótipo é atribuído à combinação de dois alelos num locus específico (Burmeister, 1999).

O material genético humano nuclear está distribuído por 23 pares de cromossomas, 22 pares de autossomas e 1 par de cromossomas sexuais (XX ou XY). Ao conjunto de toda a informação genética de um indivíduo é atribuído a designação de genoma. Este consiste em cerca de 3,2 biliões de pares de bases e apenas 0,1% diferem entre indivíduos, sendo os restantes 99,9% partilhados pela população, cuja função de cerca de 98,5% é desconhecida (Burton et al., 2005; Blaxter, 2010)

1.5.2 Tipos de variantes genéticas

Um polimorfismo pode ser caracterizado como a coexistência de duas ou mais variantes alélicas numa mesma população, sendo a frequência de pelo menos um dos alelos igual ou superior a 1% (Burmeister, 1999). Caso a frequência de um dos alelos seja inferior a este valor, a variante é considerada uma mutação. Os polimorfismos apresentam-se como uma fonte de variabilidade genética, sendo a análise de marcadores polimórficos actualmente reconhecida como uma técnica crucial para a identificação de genes responsáveis por doenças mendelianas e doenças multifactoriais complexas. Existem vários tipos de polimorfismos, que variam desde modificações num único nucleótido, até alterações em grande escala (Nakamura, 2009; Reid-Lombardo e Petersen, 2010).

O primeiro polimorfismo de DNA descoberto, *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP), foi identificado através da técnica de Southern Blot de DNA genómico submetido a clivagem por enzimas de restrição. Em 1980 Botstein et al. descreveram pela primeira vez este polimorfismo e propuseram um método para mapeamento génico completo a partir dos RFLPs (Botstein et al., 1980). As enzimas de restrição correspondem a endonucleases que reconhecem e catalisam a clivagem de sequências específicas de DNA - locais de restrição. Os RFLPs resultam de variações nucleotídicas nestes locais. Como consequência, novos locais de restrição são criados, ou então eliminados, resultando em diferentes tamanhos de fragmentos de restrição (Nakamura, 2009).

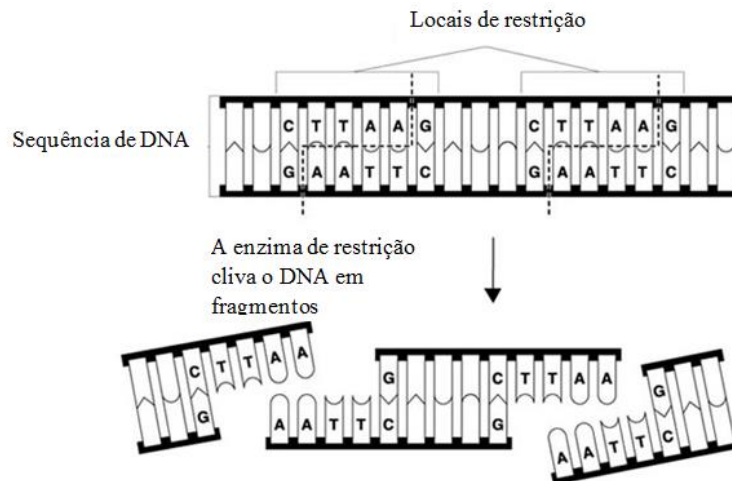


Figura 2: *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Os RFLPs resultam em diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA digerido por uma determinada enzima de restrição, como consequência de uma substituição de base na sequência reconhecida e clivada pela endonuclease (local de restrição).

O polimorfismo *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) resulta de um arranjo em sequência de múltiplas cópias de uma sequência de DNA, denominada unidade de repetição (Nakamura et al., 1987). As unidades de repetição geralmente apresentam um tamanho entre 10 e 100 pares de bases. Devido à sua natureza altamente polimórfica, evidenciam-se como marcadores genéticos muito informativos, sendo utilizados no mapeamento de locus de doenças utilizando famílias. Estas variações encontram-se ao longo de todo o genoma humano, variando o número de unidades de repetição de indivíduo para indivíduo (Nakamura, 2009).

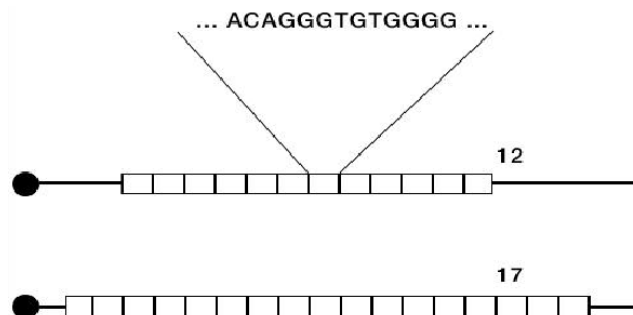


Figura 3: Imagem representativa do polimorfismo *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR). Esta variante genética resulta de um arranjo em sequência de múltiplas cópias de uma sequência de DNA com 10 a 100 pb.

Os *Short tandem repeat polymorphisms* (STRs) foram descritos pela primeira vez por Weber e May (1989) e consistem em sequências repetitivas de DNA entre 2 a 6 pares de bases. A variabilidade do número de unidades repetitivas confere uma grande diversidade de alelos. Os STRs podem assim apresentar mais de uma dezena de alelos diferentes, sendo consequentemente marcadores altamente informativos (Weber e May, 1989; Nakamura, 2009).

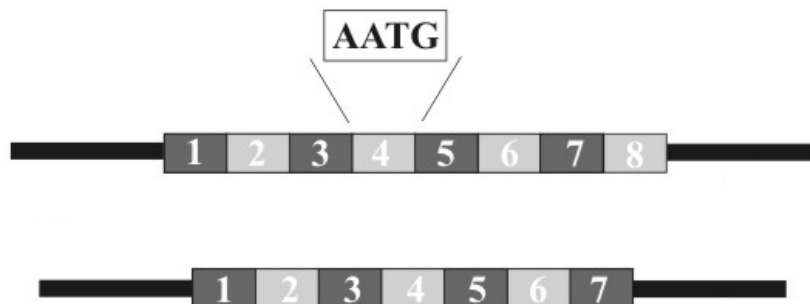


Figura 4: *Short Tandem Repeats* (STR), constituídos por curtas sequências repetitivas de nucleótidos, de dois a seis pares de bases

Os tipos mais frequentes de polimorfismos são os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) que consistem numa variação num único nucleótido na sequência de DNA genómico entre indivíduos da mesma espécie ou pares de cromossomas. Na maioria dos casos, os SNPs são marcadores genéticos bialélicos e apresentam-se densamente distribuídos pelo genoma nuclear, estando presentes em cada 300-1000 pb (Brookes, 1999; Nakamura 2009) e até ao momento já estão identificados 11 milhões de SNPs (The International HapMap Consortium, 2007). Nas regiões codificantes podem resultar numa alteração da sequência de aminoácidos, SNP não sinónimo, ou não resultar numa modificação da sequência peptídica, SNP sinónimo (Bochud, 2012). Os SNPs apresentam elevada capacidade de análise em grande escala e boa capacidade de automatização.



Figura 5: Imagem representativa de um *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Neste exemplo os nucleótidos A-T são substituídos por C-G. Consequentemente são gerados dois potenciais alelos neste local. Legenda: A-adenina; T-timina; C-citosina; G-Guanina; bp-pares de bases.

O genoma contém também outros tipos de variações estruturais designadas *Copy number variations* (CNVs), que incluem deleções/inserções, translocações e inversões. Estas variações podem ir desde alguns milhares de pares de bases até vários milhões, abrangendo cerca de 13% do genoma humano (Redon et al., 2006; Stankiewicz e Lupski, 2010).

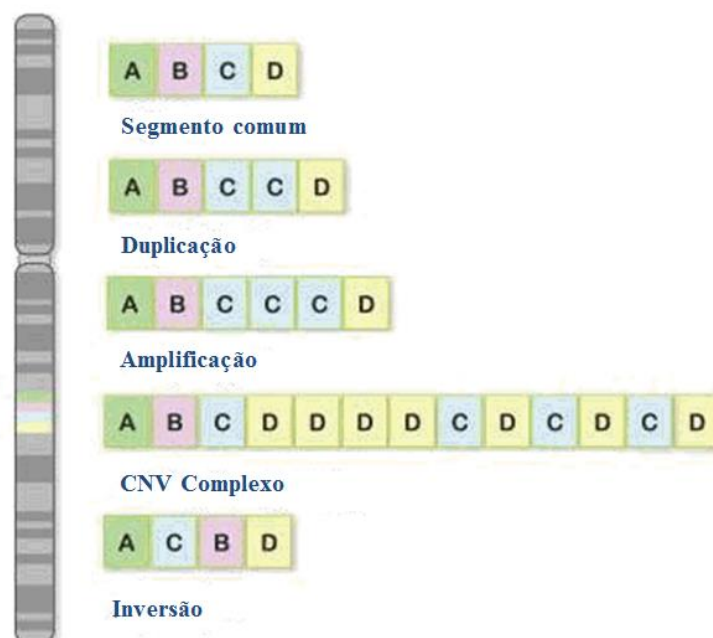


Figura 6: *Copy number variation* (CNV). Estas variantes genéticas resultam de diferenças no número de cópias de uma região genómica específica, abrangendo deleções, duplicações, amplificações, inversões e combinações complexas destas alterações (CNV complexo). Adaptado de Estivill e Armengol (2007).

Dependendo da sua localização no gene os polimorfismos podem afectar a função e estrutura proteica, a regulação da expressão de um gene e o processamento/estabilidade do RNAm. Os polimorfismos que ocorrem nas regiões codificantes podem ser categorizados em duas classes: polimorfismos não sinónimos que levam a uma alteração da sequência de aminoácidos da proteína e polimorfismos sinónimos, os quais devido à redundância do código genético não levam a alterações na proteína produzida (Marsh, 2007). Nos locais reguladores dos genes (5'UTR, 3'UTR, região promotora, regiões de splicing) os polimorfismos podem potencialmente causar variações na expressão do gene. Nas regiões não codificantes a expressão genética ou a estabilidade do RNAm pode ser afectada como consequência de um polimorfismo (Ellsworth e Manolio, 1999).

A descoberta das variantes genéticas foi imperativa para o desenvolvimento de um dos maiores feitos da história da humanidade, o Projecto Genoma Humano (PGH) que serviu de implementação também ao Projecto HapMap. O PGH resultou de um esforço conjunto de centros de investigação de vários países, incluindo os Estados Unidos, França, Alemanha, Reino Unido, Brasil, Canadá. Os principais objectivos do PGH consistiram no mapeamento de todos os genes do genoma humano e na sequenciação do DNA (The International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Este projecto, concluído em 2003, disponibilizou a informação necessária para o desenvolvimento de estudos genéticos particularmente para doenças multifactoriais complexas. O projecto HapMap consistiu numa coordenação internacional para identificar padrões de sequências de variantes de DNA, encontradas no genoma humano, abrangendo amostras de populações ancestrais da África, Ásia e Europa (The International HapMap Consortium, 2007). Os dados obtidos neste projecto são de acesso público com o intuito de ajudar na investigação de genes associados particularmente a doenças multifactoriais. O conhecimento adquirido permitiu a construção de mapas de variantes genéticas (principalmente SNPs), a identificação de haplótipos (combinações de alelos herdados em conjunto no mesmo cromossoma, descendentes de antecessores comuns) bem como de tags *SNPs* para estes haplótipos (International HapMap Consortium, 2007). O desenvolvimento do projecto HapMap foi particularmente importante na redução dos custos de genotipagem e consequentemente, tornou viável a execução de *Genome Wide Association Studies* (Manolio et al, 2009). Posteriormente, surgiu o Projecto 1000 Genomas que consiste numa extensão do

projecto HapMap, desenvolvida com o intuito de fornecer uma caracterização muito detalhada da estrutura e variação do genoma humano, através da sequenciação do genoma de pelo menos 1000 indivíduos de todo o mundo, como base para a investigação da relação entre genótipo e fenótipo (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010)

1.5.3 Estratégia de mapeamento genético

Para o mapeamento genético podem ser utilizadas duas abordagens distintas: estudos de linkage e estudos de associação (Burmeister, 1999). A capacidade de identificar regiões genómicas que contêm genes que predisõem para a doença, torna a análise de linkage a primeira abordagem a ser utilizada para a investigação genética de um traço ou doença (Teare e Barrett, 2005). O estudo de linkage é utilizado para o mapeamento de gene major subjacentes a doenças mendelianas, que testam a co-segregação de um determinado marcador e o locus da doença. (Burmeister, 1999). Contudo, a análise de linkage apresenta várias limitações para o estudo genético de traços ou doenças complexas, as quais não seguem padrões de hereditariedade simples. A susceptibilidade às doenças complexas é determinada pelo efeito cumulativo de múltiplos genes, e a análise de linkage não tem poder estatístico suficiente para detectar genes de efeito minor (Maestrini, 2000; Sham et al., 2008).

Como abordagem alternativa para o estudo das doenças complexas surgiram os estudos de associação, os quais permitem a detecção de genes de efeito minor. No modelo *case-control* dos estudos de associação são comparadas as frequências alélicas ou genotípicas entre uma população de casos (indivíduos afectados) não relacionados e uma população de controlos (indivíduos não afectados) não relacionados (Marian, 2012). Um dos maiores obstáculos neste tipo de modelo consiste na escolha do grupo controlo apropriado que se equipare/combine com a população de casos. Na selecção deste grupo devem-se considerar parâmetros como o sexo, idade ou background genético. Destes estudos podem resultar associações falso-positivas como resultado de misturas étnicas tanto nos controlos como nos casos. Tal problema pode ser minimizado combinando controlos e casos por etnia ou focando estes estudos num único subgrupo étnico (Cardon e Bell, 2001).

1.5.4 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Em 1908 Hardy e Weiberg (Hardy, 1908; Weinberg, 1908), individualmente, constataram que as frequências alélicas de uma população poderiam ser utilizadas para calcular as proporções genóticas esperadas num equilíbrio, através de uma simples função. Seja p a frequência de um alelo (A) e q a frequência do alelo alternativo (a), então a frequência genotípica esperada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), num locus com dois alelos, será p^2 para o genótipo AA, $2pq$ para o genótipo Aa e q^2 para o genótipo aa. Tanto a soma das frequências genóticas como a das frequências alélicas deve ser 1. No caso de dois alelos, o HWE pode então ser descrito pela seguinte função binomial:

$$(p + q)^2 = q^2 + 2pq + p^2 = 1$$

Para que se mantenham as proporções de Hardy-Weinberg, são necessárias as seguintes condições numa população: não ocorrer selecção, não ocorrer mutação, a população ser grande, e o acasalamento aleatório.

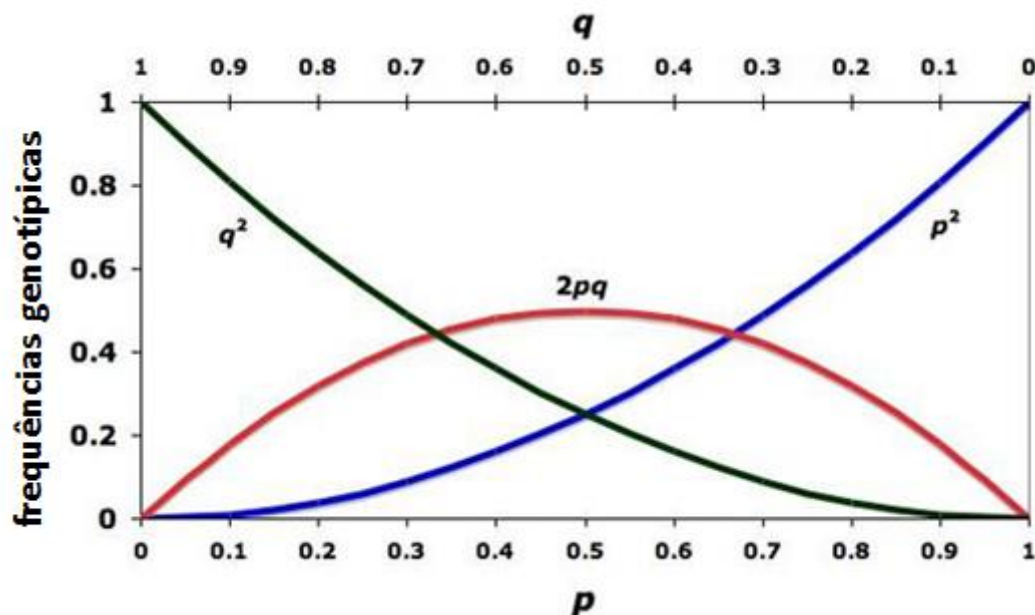


Figura 7: Imagem gráfica representativa das frequências genóticas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genóticas esperadas para o equilíbrio, podem ser obtidas em função das frequências alélicas p e q . Legenda: p – frequência de um alelo; q – frequência do alelo alternativo.

Os desvios do HWE podem ser calculados utilizando um teste do Chi-quadrado, comparando desta forma as frequências genotípicas observadas e as frequências esperadas de acordo com Hardy-Weinberg. Sendo k o respectivo número de alelos, o número de graus de liberdade (df) nesta análise é dado por $k(k - 1)/k$ (Wittke-Thompson et al., 2005). No entanto, quando a amostra é pequena o teste do Chi-quadrado deve ser substituído por testes exactos (Wigginton et al., 2005). Um desvio significativo deste equilíbrio pode resultar de várias razões, como erros de genotipagem, selecção da população, estratificação da população ou do modelo de amostragem em estudo. O teste HWE apresenta-se portanto como um método frequentemente utilizado para controlo da qualidade genotípica (Xu et al., 2002).

1.6 Fusão de membranas e transmissão sináptica

A fusão de membranas é um processo fundamental na fisiologia celular, estando implicada em mecanismos como a biogénese de membranas, tráfego intracelular, e secreção celular. Particularmente, a fusão de membranas permite o tráfego de moléculas entre os diversos compartimentos celulares, assegurando desta forma a sobrevivência e o funcionamento da célula sem comprometer no entanto a estrutura e integridade dos organelos. A nível dos neurónios a fusão das membranas é crucial para a transmissão sináptica. As vesículas que contêm os neurotransmissores na célula pré-sináptica fundem com a membrana plasmática, libertando o seu conteúdo na fenda sináptica. Todo este processo envolve vários passos. As vesículas contendo os neurotransmissores são direccionadas para locais alvo na membrana pré-sináptica designados zonas activas (*docking*). São então submetidas a várias reacções que as tornam funcionais para a exocitose (*priming*). Após uma abertura dos canais de cálcio em resposta a um potencial de acção, as vesículas fundem com a membrana pré-sináptica, libertando os neurotransmissores (exocitose). Posteriormente as vesículas são re-endocitadas, e recicladas para posterior acumulação de neurotransmissores (Südhof, 2004; Südhof e Rizo, 2011).

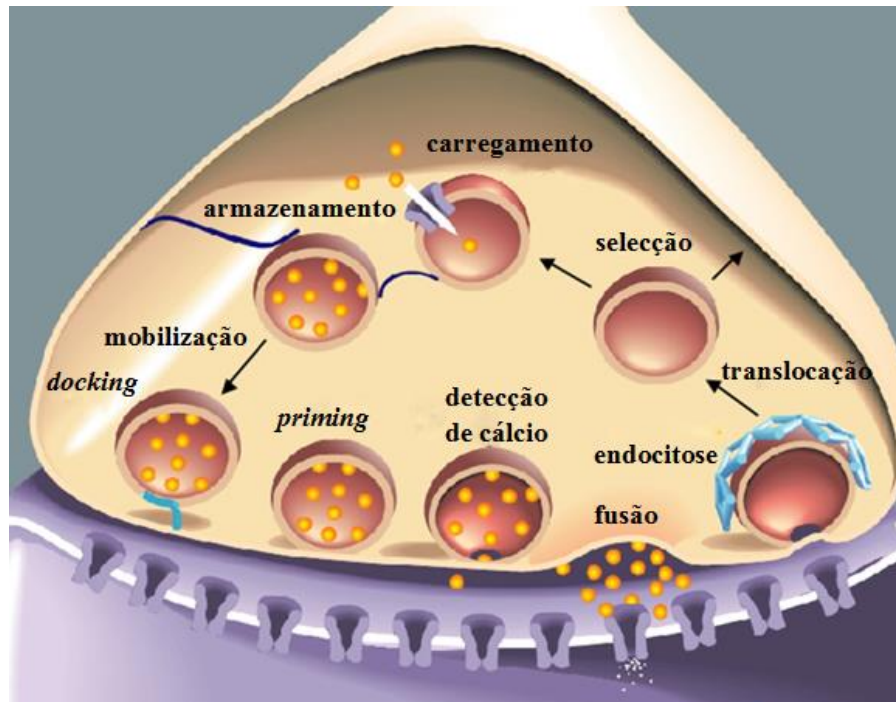


Figura 8: Imagem ilustrativa do ciclo da vesícula sináptica. As vesículas da célula pré-sináptica contêm neurotransmissores, sendo posteriormente acopladas nas zonas activas (*docking*) e submetidas a várias reacções de *priming*, ficando aptas para a exocitose mediada pelo cálcio. Em resposta a despolarização, ocorre a fusão das vesículas com a membrana plasmática (exocitose). Os neurotransmissores são libertados na fenda sináptica, permitindo a transmissão da informação. As vesículas são então reendocitadas e recicladas. Imagem adaptada de Richmond (2007).

1.6.1 Proteínas SNAREs

As proteínas *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor* (SNAREs) foram descobertas pela primeira vez em leveduras, e uma década mais tarde em mamíferos. Esta descoberta abriu novos caminhos para entender o mecanismo associado à fusão de membranas. As proteínas sinápticas Syntaxina 1A (STX1A) (Bennett et al., 1992), SNAP-25 (proteína associada ao sinaptossoma de 25kDa) (Oyler et al., 1989) e VAMP (proteína associada à membrana vesicular, também conhecida como sinaptobrevina) (Trimble et al., 1988) foram as primeiras proteínas da família SNARE a serem descobertas.

Vários estudos evidenciaram as SNAREs sinápticas como componentes moleculares envolvidos na exocitose. Mostrou-se que tanto a toxina botulínica como o tétano (neurotoxinas bacterianas), para além de inibirem a exocitose clivam também as

proteínas SNAREs sinápticas (Blasi et al., 1993, Link et al., 1992). Além disso, registou-se que as proteínas SNAP-25, STX1A e VAMP formam um complexo estável de estequiometria 1:1:1 (Fasshauer et al., 1998; Poirier et al., 1998).

A STX1A e a VAMP encontram-se ancoradas às membranas através de um domínio transmembranar. A SNAP-25 está periféricamente ligada à membrana por palmitoilação (Sorensen, 2006) e encontra-se implicada nos mecanismos de crescimento axonal e plasticidade sináptica (Osen-Sand et al., 1993). As proteínas SNARE caracterizam-se pela presença de uma cadeia de 60-70 aminoácidos altamente conservada em α -hélice, o *motif* SNARE. A VAMP e a STX1A contêm na sua estrutura um *motif*. Por outro lado a SNAP-25, tal como os seus homólogos, inclui dois *motifs* (Jahn, 2004; Rizo e Südhof, 2012). Durante a exocitose os *motifs* SNARE destas três proteínas interagem entre si, formando um feixe de quatro α -hélices enroladas, denominado complexo central. A formação deste complexo está associada a uma grande libertação de energia, a qual é utilizada para iniciar o mecanismo de fusão. As âncoras transmembranares da VAMP e da STX1A estão localizadas no terminal C do complexo (Hanson et al., 1997; Sutton et al., 1998). Esta disposição sugere que a formação do complexo ocorre de forma semelhante a um feixe, direccionada do terminal N para o terminal C. A formação em paralelo do complexo SNARE segundo esta direcção, suporta fortemente a hipótese de que a formação do complexo promove a fusão através da aproximação das duas membranas apostas, ultrapassando desta forma as barreiras energéticas impostas pelas forças electrostáticas repulsivas entre camadas lipídicas (Hanson et al., 1997; Sorensen, 2006). O complexo é formado fundamentalmente por interacções hidrofóbicas, no entanto existe uma camada hidrofílica central que é composta por 3 resíduos de glutamina e um de arginina. As proteínas SNAREs são assim classificadas em Q-SNARES que apresentam um resíduo central de glutamina (SNAP-25 e STX1A), ou em R-SNARES que possuem um resíduo central de arginina (VAMP) (Fasshauer et al., 1998). Este complexo é estável a temperaturas de 90°C (Yang et al., 1999) e resiste tanto à digestão por proteases (Poirier et al., 1998) como à desnaturação pelo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Hayashi et al., 1994).

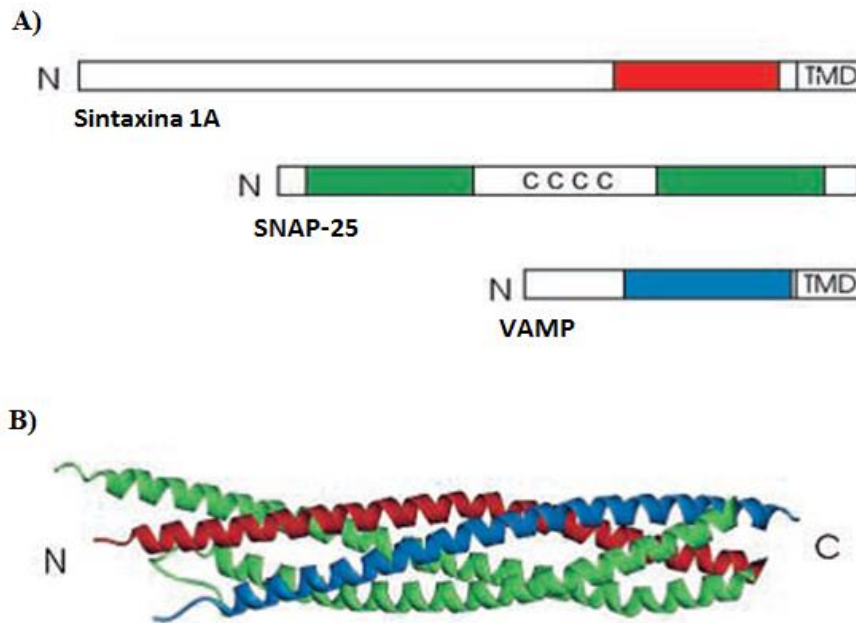


Figura 9: A) Representação esquemática da estrutura das proteínas SNARE sinápticas: SNAP-25, STX1A e VAMP (sinaptobrevina). A SNAP-25 possui 2 motifs, entre os quais se incluem quatro resíduos de cisteína palmitoilados que permitem o seu ancoramento na membrana sináptica. Tanto a VAMP como a STX1A encontram-se ligadas à membrana através de domínios transmembranares no terminal C. Legenda: TMD- domínios transmembranares; CCCC- resíduos de cisteína palmitoilados. B) Representação esquemática da estrutura cristalina do Complexo SNARE. O Complexo é formado pela associação dos *motifs* da SNAP-25 (verde), STX1A (vermelho) e VAMP (azul). As hélices orientam-se paralelamente do domínio N até ao C. Adaptado de Bruns e Jahn (2002).

A reciclagem dos componentes do complexo central é mediada pela acção conjugada do *N-ethylmaleimide sensitive factor* (NSF) e do cofactor α -, β ou γ - *Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein* (SNAP) (Jahn e Südhof, 1999). O NSF pertence à família AAA⁺, ATPases associadas a várias actividades celulares, e possui um sítio de ligação a ATP com actividade catalítica (Ogura e Wilkinson, 2001). A proteína adaptadora SNAP liga-se com elevada afinidade ao complexo central, o que por sua vez permite o recrutamento e a ligação da chaperona NSF. Através da hidrólise de ATP, o NSF cataliza então a dissociação do complexo termodinamicamente estável. Podem ser necessários vários ciclos de hidrólise de ATP, para fornecerem energia suficiente para a dissociação do complexo (Janh e Scheller,

2006). Após a ocorrência de exocitose, a VAMP é re-endocitada e reciclada. Os componentes do complexo SNARE são deste modo reciclados, ficando disponíveis para promoverem novos ciclos de exocitose (Barnerjee et al., 1996; Mayer et al., 1996).

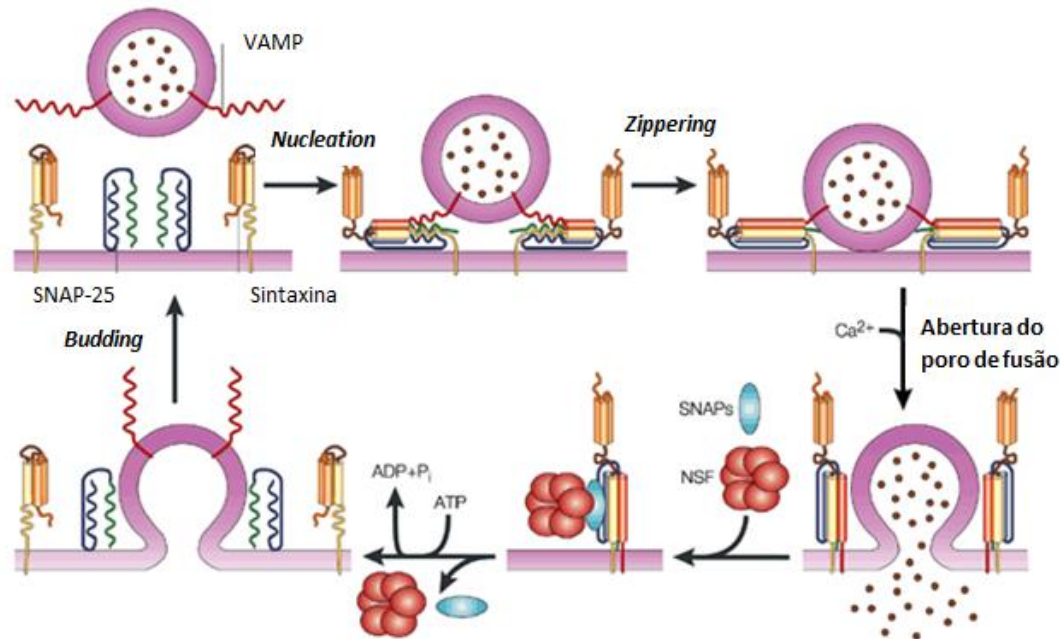


Figura 10: Imagem ilustrativa do mecanismo de fusão das vesículas sinápticas mediado pelas proteínas do complexo SNARE. Para se iniciar a formação do complexo SNARE é necessário uma alteração da conformação da Sintaxina (*Nucleation*). O complexo SNARE é então formado através da associação de 4 α -hélices enroladas dos *motifs* derivados da STX1A, SNAP-25 e VAMP. A formação do complexo aproxima as duas membranas que se fundem, permitindo a libertação dos neurotransmissores pelo poro de fusão. O complexo é posteriormente dissociado pela acção conjugada do NSF e do cofactor SNAP, através da hidrólise de ATP. Adaptado de Rizo e Südhof (2002).

Estudos recentes têm investigado o número de complexos SNAREs requeridos para o processo de fusão de membranas. A estequiometria exacta dos complexos de fusão permanece controversa. Estudos realizados neste âmbito com recurso a diferentes metodologias apontam para números diferentes. No entanto, o facto de apenas muito poucos serem necessários é comum em todos eles (Mohrmann R., 2010; van den Bogaart et al., 2010; Sinha et al., 2011).

A fusão das vesículas sináptica é modulada também pela interacção de outras proteínas com as SNAREs. Destas, destacam-se a Munc18, as complexinas e a sinaptotagmina. A Munc18 ao ligar-se à STX1A regula a função e a formação do complexo SNARE. Por outro lado, as complexinas parecem ter funções quer inibitórias, quer promotoras na fusão das membranas, ligando-se também ao complexo SNARE. A sinaptotagmina, outra das proteínas major que interage com as proteínas da família SNARE, funciona como um sensor de cálcio. Na presença de um influxo de Ca^{2+} mediado pelo potencial de acção promove a fusão da vesícula com o terminal pré-sináptico, através da sua interacção com o complexo SNARE (Rizo e Rosenmund, 2008).

1.7 Genes candidatos: Proteínas SNAREs

Genericamente, um gene candidato é um gene envolvido nas vias patogénicas de interesse que se pensam estar envolvidas na fisiologia da doença ou traço de interesse (Tsai et al., 2011). Como referido anteriormente, a genética do suicídio resulta de uma interacção entre vários genes de susceptibilidade e factores ambientais. Por exemplo, os genes de vários sistemas de neurotransmissores, de proteínas implicadas na adesão neuronal e na função sináptica podem ser candidatos para a etiologia do suicídio. De facto vários estudos de associação com genes candidatos, particularmente de sistemas de neurotransmissores foram realizados até ao momento, mas os resultados (Costanza et al., 2013) são inconclusivos, com excepção do gene *TPH* e do transportador da serotonina, carecendo de estudos adicionais com novos genes.

As sinapses são as unidades fundamentais da transmissão de informação no cérebro como descritas anteriormente. Qualquer alteração num dos passos envolvidos no mecanismo de transmissão sináptica, pode resultar em alterações ao nível da libertação dos neurotransmissores, que por sua vez estão implicadas nas doenças psiquiátricas. De facto, uma série de estudos sugerem que alterações nas proteínas SNAREs estão envolvidas em diversas doenças mentais (Corradini et al., 2009; Waites e Garner, 2011). Uma vez que o suicídio está associado a doenças mentais, alterações nestas proteínas poderão também estar implicadas na etiologia do suicídio. Por exemplo, um estudo *post-mortem* investigou a desregulação das proteínas SNAREs e suas interacções, no córtex pré-frontal de vítimas de suicídio com esquizofrenia e ou

depressão. Nos subgrupos de suicídio como causa de morte, a SNAP-25 e a VAMP estavam presentes em níveis mais elevados, reportando-se também uma maior probabilidade de formação do complexo SNARE heterotrimérico *in vitro* comparativamente com as formas monoméricas e heterodiméricas (Honer et al., 2002). Particularmente importante, num estudo realizado com microarrays foram detectadas alterações nos níveis de expressão de vários genes das proteínas sinápticas, em indivíduos com depressão e suicídio, como por exemplo o gene da SNAP-25 e STX1A (Sequeira et al., 2007; Tochigui, 2008; Sequeira et al., 2009; Fiori, 2012).

Além disso, estudos de *linkage* efectuados em famílias com doentes com esquizofrenia e doença bipolar, de várias populações mundiais revelaram *linkage* na região cromossómica 20p12.3-11 que inclui a localização do gene SNAP-25 (Moises et al., 1995; Lewis et al., 2003). Num estudo também efectuado em famílias Irlandesas foi reportada uma associação entre o gene SNAP-25 e a esquizofrenia, quer para análise de marcadores individuais como também análises baseadas em haplótipos, apesar de a tentativa de replicação destes resultados usando casos não relacionados não obteve sucesso. (Fanous et al., 2009). Relativamente ao gene da STX1A, um estudo de associação com base em famílias nucleares com doentes com esquizofrenia revelou associação entre o gene STX1A e a esquizofrenia (Wong et al., 2004).

Face ao exposto, genes das proteínas da maquinaria excitotónica são candidatos promissores para etiologia do suicídio, apesar de até ao momento esta hipótese ainda não ter sido explorada a nível mundial.

1.8 Objectivos

O suicídio é um fenómeno complexo, determinado pela interacção de diversos factores de risco, sendo que os factores genéticos desempenham um papel importante na etiologia do suicídio. Várias evidências sugerem que as proteínas sinápticas da maquinaria excitotóxica poderão estar implicadas na etiologia do suicídio. Contudo, ainda não foram realizados estudos genéticos para testar esta hipótese a nível mundial. Assim, no presente trabalho pretende-se:

- Determinar as frequências genotípicas e alélicas de variantes genéticas nos genes *SNAP-25* e *STX1A*, na População Portuguesa;
- Investigar uma possível associação entre variantes nos genes *SNAP-25* e *STX1A* e o suicídio;
- Analisar diferenças entre o suicídio violento e não violento;
- Realizar uma análise de género.

2. Materiais e Métodos

2.1 Selecção e recolha da amostra

Para este estudo foram seleccionadas amostras de Caucasianos da população portuguesa, de vítimas de suicídio e controlos, após consulta do Registo Nacional de Não Dadores (RENDA). Procedeu-se à colheita de 10 ml de sangue para tubos de vácuo (Vacuteiner), contendo o anticoagulante, o ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA K2E, 0,18mL) para os estudos genéticos. A amostra total é constituída por 624 amostras, das quais 272 são vítimas de suicídio e 352 são controlos, Caucasianos da população portuguesa, seleccionadas no decorrer de autópsias Médico-Legais, no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF). Existem vários métodos violentos e não violentos para consumar o suicídio. O método violento inclui as armas de fogo, enforcamento, afogamento e precipitação. O método não violento inclui ingestão excessiva de medicamentos, intoxicações por insecticidas, entre outras. A amostra de vítimas de suicídio violento e não violento, de ambos os sexos tem idades compreendidas entre 26 e 77 anos. A amostra controlo de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 15 e 88 anos, sem historial de doenças psiquiátricas, dependência de drogas lícitas ou ilícitas, foi seleccionada também no INMLCF.

2.2 Extração do DNA genómico

A extração do DNA assume elevada importância nos estudos genéticos, uma vez que todas as técnicas moleculares subsequentes dependem da qualidade do DNA obtido. A reacção de polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica muito sensível, que depende da qualidade do DNA obtido. Assim, é essencial garantir que o DNA seja obtido em elevadas quantidades e apresente um bom grau de pureza, integridade e isenção de contaminantes ou outras macromoléculas que possam interferir com a técnica PCR. O DNA pode ser extraído de diversos materiais biológicos tais como urina, sangue, saliva, medula óssea (Santella, 2006). No caso de amostras de sangue, para além da sua boa disponibilidade, permitem também uma grande quantidade e qualidade de DNA genómico (Steinberg et al., 2002). Uma diversidade de métodos para isolamento de DNA encontra-se descrita na literatura. De facto, para a selecção do método adequado é necessário ter em conta factores como a quantidade e o tipo de amostra ou a aplicação a que se destina o DNA (Carpi, 2011). Todos os métodos de isolamento de ácidos nucleicos incluem três etapas fundamentais: ruptura das membranas celulares, lise das proteínas ou outras macromoléculas contaminantes, e isolamento do DNA. Um dos métodos utilizado é o método do fenol-clorofórmio, apesar de vários estudos mostrarem que este protocolo interfere com a técnica de PCR. Surgiram então diversos protocolos alternativos como a extração em gel de sílica, *beads* magnéticas, método enzimático, *salting-out* (Carpi, 2011). O método utilizado neste trabalho foi adaptado do protocolo proposto por Miller et al. (1988). Este método inclui a utilização de proteinase K, detergente aniónico dodecil sulfato de sódio (SDS) e precipitação do DNA na presença de etanol. O SDS é um detergente aniónico que vai dissolver as membranas celulares e desnaturar as proteínas. Por outro lado, a proteinase K digere as proteínas e outras macromoléculas contaminantes. As proteínas semi-digeridas são posteriormente precipitadas segundo o método de *salting-out* com uma solução salina saturada NaCl. Finalmente, o DNA é precipitado em etanol e dissolvido em solução Tris-EDTA (TE). A digestão com proteinase K apresenta um bom rendimento e qualidade quando comparado com outros métodos. Além disso, a pureza e a integridade dos ácidos nucleicos obtidos permitem a aplicação em técnicas moleculares como a PCR e digestão com enzimas de restrição (Santella, 2006).

O DNA foi extraído de amostras de sangue periférico utilizando um método enzimático adaptado de Miller et al. (1988). De modo a promover a hemólise dos glóbulos vermelhos do sangue, as amostras foram colocadas em tubos de Falcon juntamente com 30 mL de solução tampão de lise de glóbulos vermelhos (NH_4Cl 155mM; KHCO_3 10mM; Na_2EDTA 1mM, pH=7,4) (Sigma®). Incubaram-se os tubos durante 20 minutos em gelo e posteriormente procedeu-se a uma centrifugação a 2500 rpm durante 15 minutos a uma temperatura de 4°C (Rotanta 460R, Hettich®). O sobrenadante foi descartado, sendo o pellet ressuspendido em 20 mL de solução tampão lise de glóbulos vermelhos. Seguiu-se uma nova centrifugação a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C (Rotanta 460R, Hettich®). Após a obtenção do pellet foram adicionados 4 mL de solução tampão de lise de glóbulos brancos (Tris-HCl 10 mM; NaCl 400 mM; $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mM, pH=8,0) (Sigma®), 250 μL de detergente SDS a 10% (BioRad®) e 30 μL de proteinase K (20 mg/ml) (Roche®) e as amostras foram incubadas a 37°C no *shaker* (Forma Orbital Shaker, Thermo®) *overnight* sob agitação suave. Após a digestão, foram adicionados 3 mL de uma solução saturada de NaCl (6M) (Sigma®). Seguiu-se uma centrifugação durante 30 minutos, a 3750 rpm à temperatura de 25°C (Rotanta 460R, Hettich®). Ao sobrenadante obtido foram adicionados aproximadamente dois volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA genómico, sendo este lavado em etanol a 70%. Ao DNA obtido adicionou-se uma solução TE (Tris-HCl 10 mM; Na_2EDTA 0,2 mM, pH=8) (Sigma®) numa quantidade variável entre 150 e 350 μL , proporcional à quantidade de DNA obtida. O DNA extraído foi deixado a dissolver em solução TE na estufa *Incubator S160D* (Stuart Scientific®), a uma temperatura de 37°C e sob agitação suave. As amostras foram posteriormente armazenadas e preservadas a uma temperatura de 4°C.

2.3 Quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA

O DNA extraído foi quantificado e avaliado qualitativamente com recurso à técnica de espectrofotometria. O DNA absorve na região ultravioleta do espectro, a 260 nm, enquanto que as proteínas absorvem a 280 nm. Deste modo, a razão $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ permite avaliar o grau de pureza do DNA obtido. As amostras de DNA devem apresentar valores para este rácio no intervalo 1,5 a 2. Rácios abaixo indicam contaminação por proteínas, enquanto rácios superiores revelam contaminação por ácido ribonucleico (RNA) (Sambrook e Russel, 1989). As concentrações do DNA são

obtidas segundo a relação $1 \text{ DO}_{260} = 50 \mu\text{g}$ de DNA de dupla hélice, com recurso à seguinte equação:

$$[DNA](\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}) = \text{DO}_{260} \times \text{Factor de diluição} \times \text{Constante da dupla hélice}$$

As amostras de DNA foram submetidas a leitura da densidade óptica no espectrofotómetro (*SmartSpecTM Plus Spectrophotometer*, BioRad®), utilizando-se um cuvette de quartzo, uma vez que este material não absorve na região ultravioleta.

2.4 Reacção em cadeia da polimerase

2.4.1 Fundamentos teóricos da técnica de reacção da polimerase em cadeia

O princípio da técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na amplificação exponencial de uma determinada sequência de ácidos nucleicos, o DNA molde (Pandit e Li, 2004). A técnica PCR desenvolvida por Kary Mullis permite obter uma grande quantidade de DNA em pouco tempo, sem que a amostra necessite de estar altamente purificada. Esta técnica divide-se em três fases que se repetem genericamente por 25 a 35 ciclos: desnaturação, *annealing* e extensão. A PCR é iniciada por uma fase de desnaturação, na qual ocorre a separação da cadeia dupla do DNA mediada pela temperatura (94°-96°). Segue-se uma diminuição da temperatura entre 55°-65°, que permite que um par de oligonucleótidos (*primers*) se liguem a sequências complementares da cadeia molde. A temperatura é posteriormente elevada a temperaturas próximas de 72°C, permitindo que a DNA polimerase actue junto dos iniciadores catalisando a extensão da cadeia através da adição de nucleótidos do meio (Sambrook e Russel, 1989).

A Taq polimerase é uma enzima termoestável, isolada do *eubacterium Thermus aquaticus*, não sendo inactivada no passo da desnaturação, uma vez que resiste a altas temperaturas. Teoricamente, no final de cada ciclo, a quantidade de DNA duplica uma vez que os produtos de um ciclo servem de molde para o ciclo seguinte (Sambrook e Russel, 1989). A concentração de iões de magnésio assume um papel relevante para a reacção em cadeia da polimerase. Para além de influenciarem a actividade da Taq DNA

polimerase, os íons de magnésio também intervêm na eficiência dos primers. Como os dNTPs se ligam a estes íons, estes devem estar em excesso, de modo a garantir a eficiência deste processo (Sambrook e Russel, 1989).

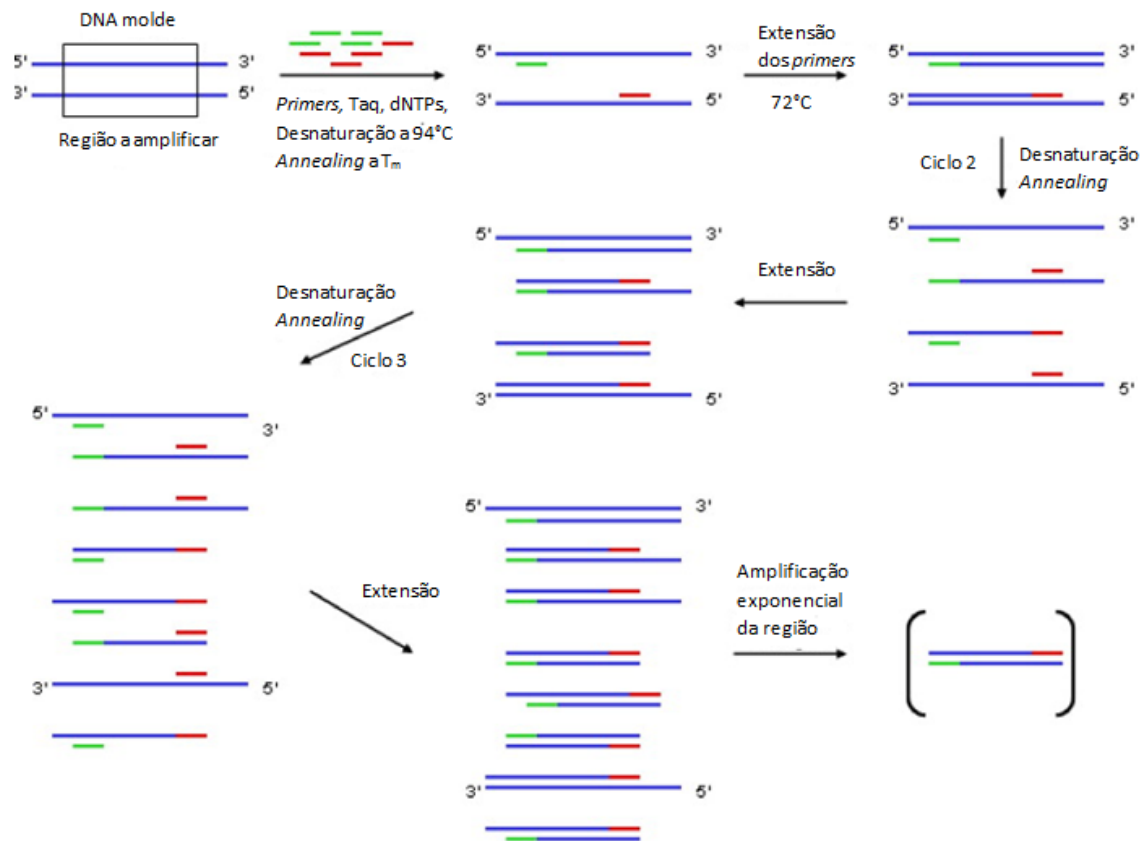


Figura 11: Imagem representativa dos fundamentos da técnica de PCR. Os primers ligam-se a sequências complementares na cadeia de DNA, flanqueando a região de interesse a ser amplificada. Após múltiplos ciclos de desnaturação, annealing e extensão obtém-se a amplificação exponencial da região de interesse. A quantidade final de produto amplificado depende da quantidade inicial de DNA, da quantidade de reagentes e da eficiência da extensão. Legenda: molde de DNA-azul; região a ser amplificada-caixa; primers forward e reverse - vermelho e verde. Adaptado de Pandit e Li. (2004).

Para a técnica de PCR são então necessários dois oligonucleótidos iniciadores, um molde de DNA, os 4 tipos de nucleótidos (dNTPs), enzima Taq Polimerase, cloreto

de magnésio, e uma solução tampão (Tris-HCl) que permita um pH óptimo para a acção da Taq Polimerase (pH=7.4) (Pandit e Li, 2004).

2.4.2 Condições da reacção da polimerase em cadeia

2.4.2.1 Polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*

O gene *STX1A* localiza-se no cromossoma 7q11.2 (Nakayama et al., 1997). O polimorfismo estudado no gene *STX1A* corresponde a uma substituição T/C no intrão 7. O DNA foi amplificado após optimização das condições descritas por Wong et al. (2004). Os primers (Invitrogen®) utilizados foram os seguintes: 5'-CAATGCTGCTGCTGAACTC (*forward*) e 5'-CGCTGACATTTATGTGACC (*reverse*). A PCR foi realizada usando 50 ng de DNA genómico como molde, num volume final de reacção de 25µl contendo 1X a solução tampão (Invitrogen®), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 160 µM (Invitrogen®), 0,2 mM de cada primer (Invitrogen®) e 0,04 U/µl Taq polimerase (Invitrogen®). As condições de amplificação no termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) consistiram numa desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida por 35 ciclos de 30s de desnaturação a 95°C, 30s de *annealing* a 62°C e 30 s de extensão a 72°C. Seguiu-se ainda uma extensão final a 72°C durante 7 minutos.

2.4.2.1 Polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*

O polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* foi amplificado através do método PCR-RFLP, depois de optimizadas as condições baseadas no protocolo descrito por Barr et al. (2000). Os dois oligonucleótidos iniciadores (Invitrogen®) usados para amplificar este segmento de DNA foram: 5'-TTCTCCTCCAAATGCTGTCG-3' (*Forward*) e 5'-CCACCGAGGAGAGAAAATG-3' (*Reverse*). O polimorfismo foi amplificado num termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems®), e para um volume final de 25 µl adicionaram-se 125 ng de DNA genómico, 1X solução tampão (Invitrogen®), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 160 µM (Invitrogen®), 1,6 ng/µL de cada primer (Invitrogen®) e 0,04 U/µl Taq polimerase (Invitrogen®). Após uma pré-desnaturação de 5 minutos a 95°, seguiram-se 35 ciclos de desnaturação (30 s a 94°C), *annealing* (40s a 61°C) e extensão (30 s a 72°C).

2.5 Digestão com enzimas de restrição

2.5.1 Fundamentos teóricos das enzimas de restrição

As enzimas de restrição são endonucleases isoladas a partir de bactérias, que reconhecem e clivam sequências específicas de DNA, geralmente com 4 a 8 pb (Tefferi et al., 2002). O número de fragmentos de restrição depende do número de locais de restrição presentes na cadeia de DNA. Os fragmentos apresentam um número variável de tamanhos e podem, posteriormente ser separados e identificados através de electroforese em gel de agarose (Sambrook e Russel, 1989).

2.5.2 Condições da digestão com enzimas de restrição

2.5.2.1 Polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*

Relativamente ao polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, a digestão dos produtos amplificados ocorreu segundo as condições descritas por Wong et al. (2004). Ao produto resultante da amplificação foi adicionado a enzima *HpyCH4IV* (New England Biolabs®). A digestão ocorreu *overnight* a uma temperatura de 37°C. A endonuclease de restrição *HpyCH4IV* reconhece e cliva a seguinte sequência:

5'-A/CGT-3'

3'-TGC/A-5'

2.5.2.2 Polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*

Para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, o produto resultante da amplificação foi incubado com a enzima *DdeI* (New England Biolabs®), a uma temperatura de 37°C *overnight*. Esta endonuclease de restrição reconhece e cliva a seguinte sequência de nucleótidos:

5'-C/TNAG-3'

3'-GANT/C-5'

2.6 Electroforese em gel de agarose

2.6.1 Fundamentos teóricos da electroforese em gel de agarose

Para separar e identificar os produtos resultantes da digestão de restrição procedeu-se a electroforese em gel de agarose. Esta técnica baseia-se no princípio de que o DNA, sendo negativamente carregado a pH neutro ou alcalino, na presença de um campo eléctrico migra em direcção ao ânodo (pólo positivo). Consequentemente, fragmentos de diferentes tamanhos são separados ao longo do gel, dado que a velocidade de migração depende do tamanho e peso molecular dos ácidos nucleicos (Pandit e Li, 2004).

A agarose é um polissacarídeo não tóxico, extraído de uma alga marinha vermelha. A electroforese em gel de agarose possibilita a separação de ácidos nucleicos com tamanho compreendido entre 0,2 Kb a 50 Kb. A concentração do gel apresenta-se como um parâmetro relevante. Uma concentração elevada corresponde a uma menor porosidade, e consequentemente menores os fragmentos de DNA que se conseguem separar (Sambrook e Russel, 1989).

Os tampões mais utilizados no processo electroforético são o Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o Tris-Borato-EDTA (TBE). No entanto o TAE possui menor capacidade tamponante em comparação com o TBE. O tampão para além de ajustar os valores de pH, actua como electrólito que ao garantir a manutenção da corrente eléctrica, torna-se essencial para a mobilidade electroforética. Às amostras são adicionados *loading dyes*, os quais possuem na sua constituição componentes de elevada densidade e corantes. Os elementos de elevada densidade garantem que o DNA seja carregado nos poços por acção da força gravítica, enquanto que os corantes facilitam a inserção do DNA nos poços devido à adição de cor e permitem monitorizar a mobilidade electroforética uma vez que migram no gel a velocidades conhecidas. Para a determinação dos tamanhos dos fragmentos de DNA são utilizados marcadores de peso molecular (*ladders*), que permitem por comparação determinar o tamanho dos fragmentos (Sambrook e Russel, 1989).

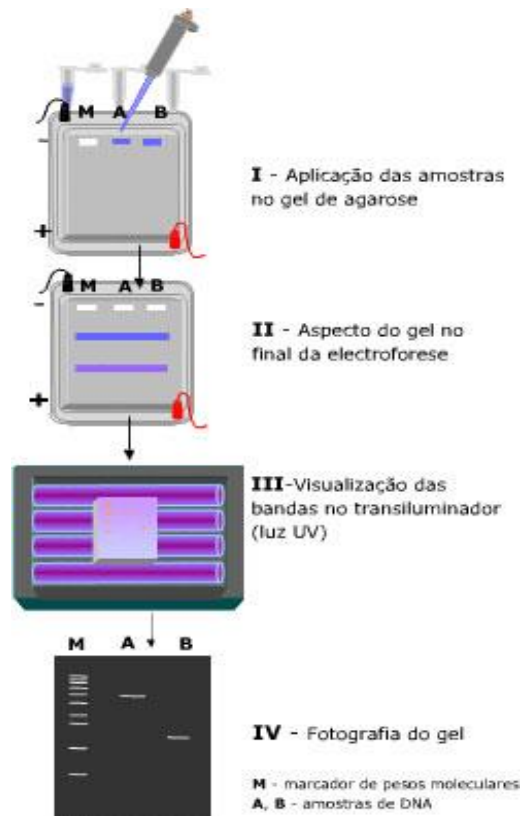


Figura 12: Representação esquemática da técnica de electroforese. As amostras de DNA coradas com o loading dye são carregadas nos poços do gel de agarose corado com brometo de etídio (I). Sob a aplicação de uma corrente eléctrica, o DNA migra em direcção ao pólo positivo de acordo o seu peso molecular. No final da corrida electroforética o gel apresenta um aspecto semelhante ao representado em II. As bandas de DNA podem ser posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta num transiluminador (III) Legenda: M- marcador de pesos moleculares (ladder); A,B -amostras de DNA.

Os géis de agarose podem ser corados com brometo de etídio ($C_{21}H_{20}BrN_3$), que se intercala nas bases do DNA e, na presença de luz ultra-violeta (260 e 360 nm), emite fluorescência na região vermelho-alaranjado do espectro visível. A fluorescência emitida pelo brometo de etídio é directamente proporcional à quantidade de DNA (Pandit e Li, 2004).

2.6.2 Condições da electroforese em gel de agarose

2.6.2.1 Polimorfismo intrão 7 do gene da *STX1A*

Relativamente ao polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, aos fragmentos resultantes da digestão com a enzima de restrição foi adicionada uma solução corante (xileno cianol 0,025% (m/V) (Sigma®); azul bromofenol 0,025% (m/V) (Sigma®) e glicerol 30% (m/V) (Invitrogen ®)), procedendo-se posteriormente à sua electroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) (Bio-Rad®). Os géis foram corridos sob uma diferença de potencial de 100 V, imersos em solução TBE 1x (Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM e Na₂EDTA.2H₂O 2 mM, pH=8) num sistema de electroforese horizontal (Bio-Rad®). Por fim os fragmentos foram visualizados num sistema Gel DocTM EQ (Bio-Rad®), sendo os tamanhos determinados por comparação com o marcador de peso molecular Gene RulerTM 100 pb DNA ladder (MBI Fermentas®).

2.6.2.2 Polimorfismo T1069C do gene da *SNAP-25*

Para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, os produtos da digestão com a enzima de restrição foram corados com o corante (xileno cianol 0,025% (m/V) (Sigma®); azul bromofenol 0,025% (m/V) (Sigma®) e glicerol 30% (m/V) (Invitrogen ®). O processo electroforético decorreu num sistema horizontal (Bio-Rad®), em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) (Bio-Rad®). Os géis foram submetidos a uma diferença de potencial de 110 V em solução TBE 1x (Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM e Na₂EDTA.2H₂O 2 mM, pH=8). As bandas de DNA foram visualizadas num sistema Gel DocTM EQ, (Bio-Rad®), sendo os tamanhos determinados por comparação com o marcador de peso molecular Gene RulerTM 100 pb DNA ladder (MBI Fermentas®).

2.7 Análise estatística

A amostra total de 624 indivíduos foi fragmentada e a comparação da distribuição dos génotipos e alelos nos diferentes grupos foi efectuada recorrendo ao teste do Qui-quadrado, usando tabelas de contingência e o *software Primer of Biostatistics program* versão 3.01 (Glantz, 1992). Procedeu-se também à análise do HWE.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise do polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*

O gene *STX1A*, constituído por 10 exões, localiza-se no braço longo (q11.2) do cromossoma 7 (Nakayama et al., 1997) e codifica a proteína *STX1A*, que está envolvida na regulação da exocitose das vesículas sinápticas através da formação do complexo SNARE.

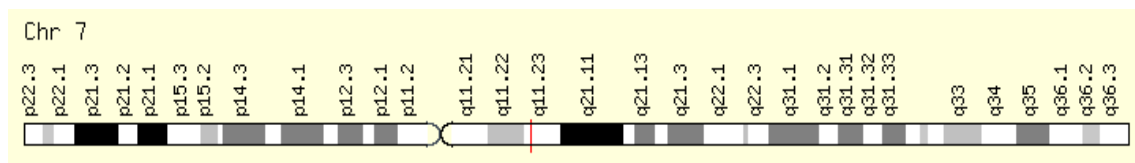


Figura 13: Representação esquemática da localização cromossômica do gene *STX1A* no cromossoma 7.

O polimorfismo no intrão 7 corresponde a uma substituição T por C que ocorre a 52 pb a jusante da extremidade 3' do exão 7 (Tsunoda et al., 2001).

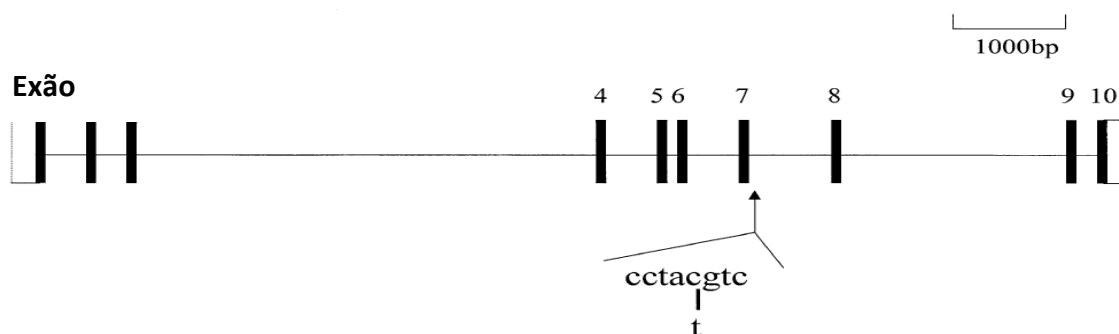


Figura 14: Representação esquemática da estrutura do gene *STX1A* e localização do polimorfismo T/C no intrão 7. Legenda da figura: 1 a 10-exões do gene; bp-pares de bases. Adaptado de Tsunoda et al. (2001).

Para o estudo deste polimorfismo, o DNA foi amplificado segundo a metodologia descrita em 2.4.2.1 do capítulo Materiais e Métodos. Posteriormente o produto amplificado de 312 pb foi incubado com a endonuclease de restrição *HpyCH4IV* de acordo com o protocolo descrito em 2.5.2.1 do capítulo Materiais e Métodos. A electroforese dos produtos digestão revelou a existência de uma banda de 312 pb que corresponde a indivíduos homozigóticos para o alelo T, bandas de

312pb+186pb+126pb que correspondem a indivíduos heterozigóticos TC, e bandas com 126pb+186pb que correspondem aos indivíduos homozigóticos para o alelo C.

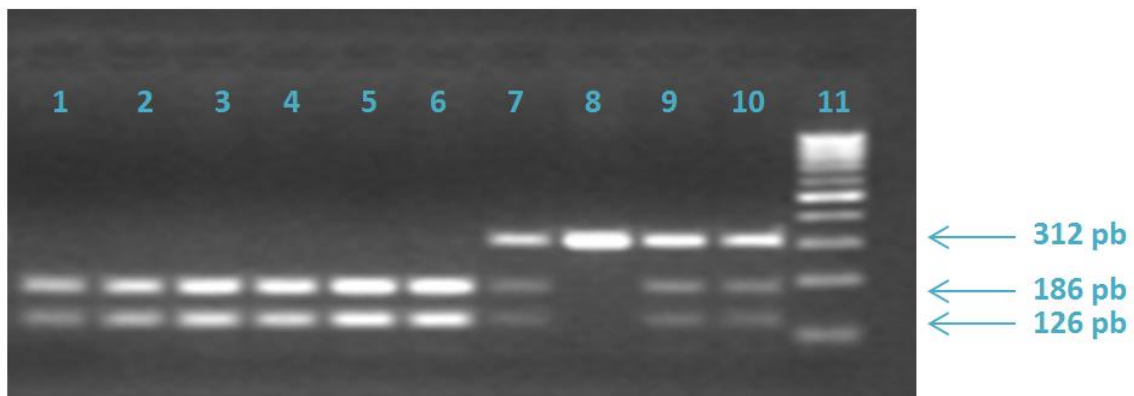


Figura 15: Imagem do perfil electroforético obtido resultante da separação dos produtos da digestão com a enzima *HpyCH4IV*, relativos ao polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose a 2,5%. Legenda: 1,2,3,4,5,6-amostras correspondentes a indivíduos homozigóticos CC; 7,9,10- amostras correspondentes a indivíduos heterozigóticos TC; 8- amostra correspondente a um indivíduo homozigótico TT; 11- marcador de peso molecular de 100 pb.

Na tabela I estão representadas as distribuições genóticas observadas e esperadas segundo o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, bem como os valores obtidos para a análise Chi-quadrado relativa ao HWE.

Tabela I: Distribuições genóticas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, na amostra total de suicídios e na amostra total de controlos.

	Genótipos observados			Genótipos esperados pelo HWE			Valores p
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	
Suicídio	66	142	64	69,00	135,99	67,00	$X^2=0,531$; $df=1$; $p=0,466$
Controlos	77	183	99	79,09	178,83	101,09	$X^2=0,196$; $df=1$; $p=0,658$

A distribuição genotípica neste locus está de acordo com o HWE, tanto para amostra de suicídios ($X^2=0,531$; $df=1$; $p=0,466$) como para a amostra de controles ($X^2=0,196$; $df=1$; $p=0,658$).

Na tabela II encontram-se representadas as distribuições genotípicas e alélicas relativas ao polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, na amostra de suicídio ($n=272$) e na amostra controles ($n=359$).

Tabela II: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A* na amostra de suicídios e na amostra de controles.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	TT	TC	CC	T	C
Suicídio	66 (24,3)	142 (52,2)	64 (23,5)	274 (50,4)	270 (49,6)
Controles	77 (21,4)	183 (51,0)	99 (27,6)	337 (46,9)	381 (53,1)
	$X^2=1,568$; $df=2$; $p=0,456$			$X^2=1,325$; $df=1$; $p=0,250$	

Para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, na amostra de controles a frequência do alelo C (53,1%) foi superior à do alelo T (46,9%). O mesmo não se verificou para as vítimas de suicídio, sendo a frequência do alelo T (50,4%) superior à do alelo C (49,6%). Relativamente às distribuições genotípicas do polimorfismo, no grupo controle, a frequência dos homozigóticos TT foi 21,4%, a frequência dos heterozigóticos TC foi 51,0% e a frequência dos homozigóticos CC foi 27,6%. Nas vítimas de suicídio a frequência dos homozigóticos TT foi 24,3%, a frequência dos heterozigóticos TC foi 52,2% e a frequência dos homozigóticos CC foi 23,5%.

O polimorfismo em estudo foi previamente associado à esquizofrenia (Wong et al., 2004). Tendo em conta a relação entre as doenças mentais e o suicídio, colocou-se a hipótese do gene *STX1A* estar também implicado na susceptibilidade do suicídio. No entanto, a análise estatística dos resultados não revelou diferenças estatisticamente significativas para a distribuição genotípica ($X^2=1,568$; $df=2$; $p=0,456$) e alélica ($X^2=1,325$; $df=1$; $p=0,250$) comparando a amostra de vítimas de suicídio com a amostra

controlo. Os resultados não revelaram evidências de associação entre o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A* e o suicídio na amostra estudada da população portuguesa. Que tenhamos conhecimento, este é o primeiro estudo genético que investigou o gene *STX1A* na etiologia do suicídio.

Vários estudos genéticos relativamente ao suicídio demonstraram que existem diferenças de género (Baca-García et al., 2002). No nosso grupo, uma associação entre o gene *5-HTR6* e o suicídio no sexo masculino foi obtida (Azenha et al, 2009). Além disso, também diferenças nas análises de género foram obtidas na nossa população para os genes *MAO-A* e *COMT* (resultados não publicados). Assim procedeu-se também a uma análise de género e os resultados obtidos estão representados nas figuras 16 e 17. Na tabela III estão também representadas as distribuições genotípicas observadas e as esperadas segundo o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, relativas à análise de género.

Tabela III: Distribuições genotípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, relativas à análise de género.

	Genótipos observados			Genótipos esperados pelo HWE			Valores p
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	
Vítimas suicídio sexo masculino	52	102	51	51,75	102,5	50,75	$X^2=0,005$; $df=1$; $p=0,945$
Controlos sexo masculino	53	116	66	52,43	117,14	65,43	$X^2=0,022$; $df=1$; $p=0,881$
Vítimas suicídio sexo feminino	14	40	13	17,25	33,49	16,25	$X^2=2,529$; $df=1$; $p=0,112$
Controlos sexo feminino	24	67	33	26,66	61,67	35,66	$X^2=0,925$; $df=1$; $p=0,336$

As distribuições dos génotipos estão de acordo com HWE para este polimorfismo, tanto nas amostras de vítimas de suicídio do sexo masculino ($X^2=0,005$; $df=1$; $p=0,945$) e feminino ($X^2=2,529$; $df=1$; $p=0,112$), como nas amostra de controlos do sexo masculino ($X^2=0,022$; $df=1$; $p=0,881$) e feminino ($X^2=0,925$; $df=1$; $p=0,336$).

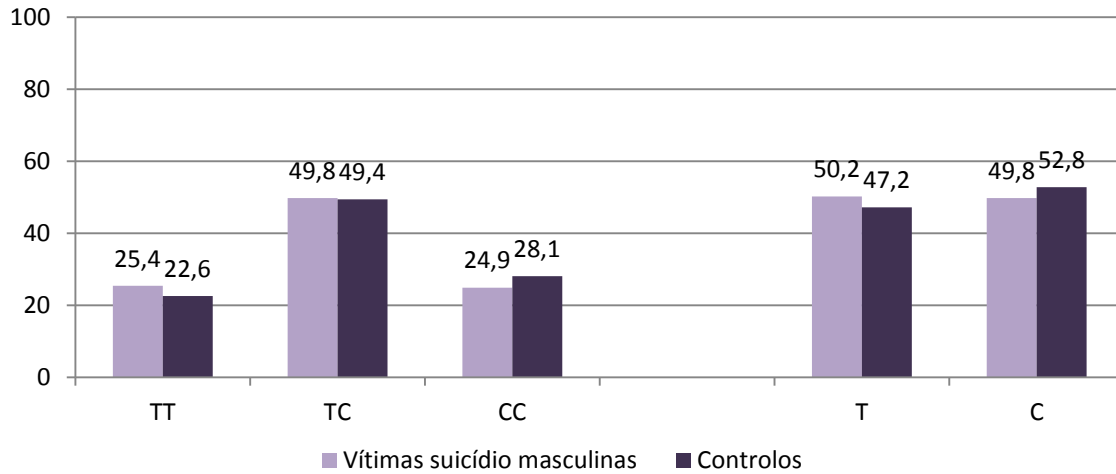


Figura 16: Representação gráfica das distribuições (%) genóticas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene *STX1A* na análise de género, para o sexo masculino.

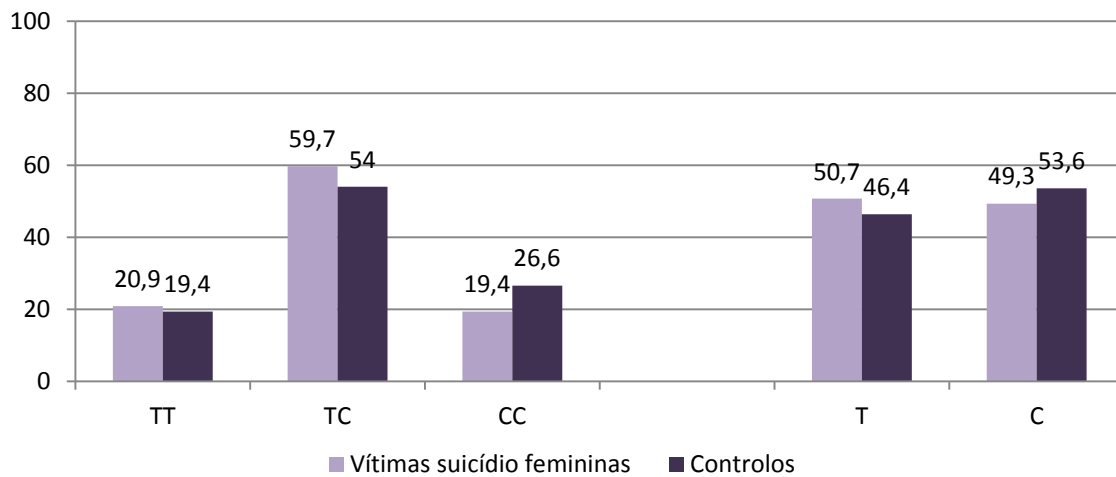


Figura 17: Representação gráfica das distribuições (%) genóticas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene *STX1A* na análise de género, para o sexo feminino.

A análise estatística dos resultados não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre as vítimas de suicídio do sexo masculino ($n=205$) e os controlos do sexo masculino ($n=235$), quer para a distribuição dos genótipos ($X^2=0,790$; $df=2$; $p=0,674$), quer para a distribuição dos alelos ($X^2=0,678$; $df=1$; $p=0,410$). Similarmente, no sexo feminino não foram encontradas diferenças significativas entre as vítimas de suicídio do sexo feminino ($n=67$) e os controlos do sexo feminino ($n=124$), para as distribuições genóticas ($X^2=1,240$; $df=2$; $p=0,538$) e alélicas ($X^2=0,504$; $df=1$; $p=0,478$) do polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*.

Uma vez que o método de suicídio pode ser importante, a amostra de vítimas de suicídio foi estratificada em dois grupos: suicídio violento (n=219) e suicídio não-violento (n=53), no sentido de se identificar diferenças quanto ao método de consumir o suicídio. A distribuição genotípica para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A* está de acordo com o HWE (Tabela IV), tanto na amostra de suicídio violento ($X^2=0,570$; $df=1$; $p=0,450$) como na amostra de suicídio não violento ($X^2=0,032$; $df=1$; $p=0,658$).

Tabela IV: Distribuições genotípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, na amostra de suicídio violento e na amostra de suicídio não violento.

	Genótipos observados			Genótipos esperados pelo HWE			Valores p
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	
Suicídio Violento	55	115	49	57,79	109,42	51,79	$X^2=0,570$; $df=1$; $p=0,450$
Suicídio Não Violento	11	27	15	11,23	26,35	15,33	$X^2=0,032$; $df=1$; $p=0,658$

Nas figuras 18 e 19 encontram-se representadas graficamente as distribuições dos alelos e dos genótipos relativas ao polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, no caso suicídio violento e não-violento, respectivamente.

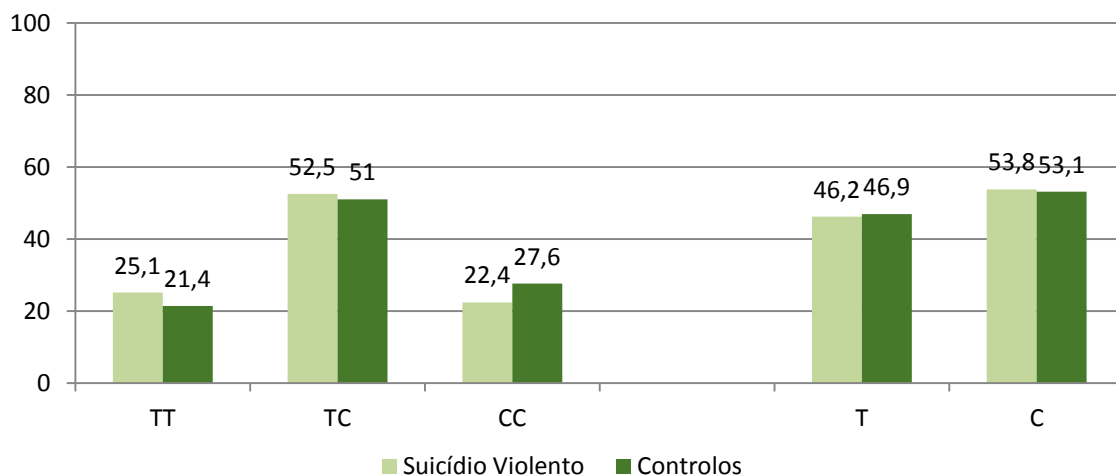


Figura 18: Representação gráfica das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene *STX1A*, em vítimas de suicídio violento e controles.

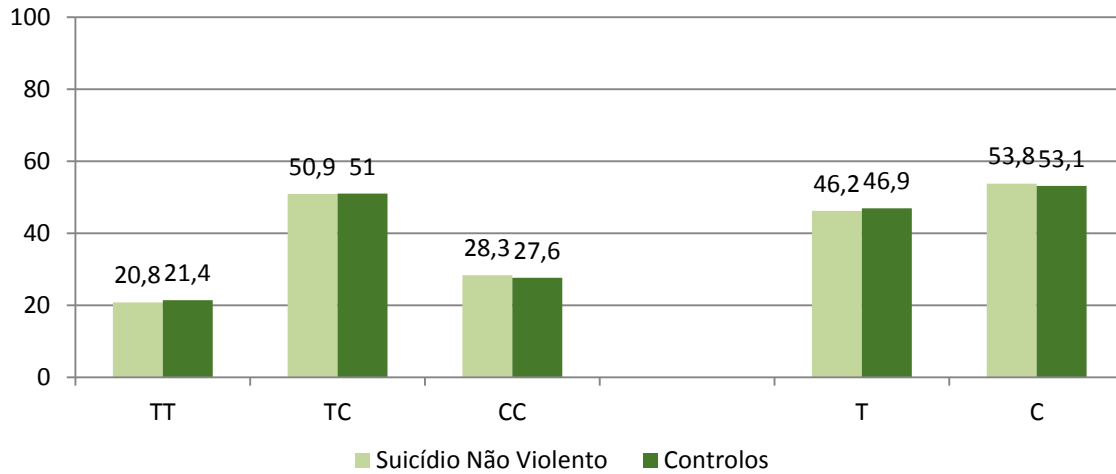


Figura 19: Representação gráfica das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene *STX1A*, em vítimas de suicídio não violento e controlos.

Contudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para qualquer dos dois grupos, tanto para as distribuições genotípicas (suicídio violento: $X^2=2,300$; $df=2$; $p=0,317$; suicídio não-violento; $X^2=0,019$; $df=2$; $p=0,990$) como para as distribuições alélicas (suicídio violento: $X^2=1,967$; $df=1$; $p=0,161$; suicídio não violento: $X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,974$).

À semelhança dos resultados anteriores, a análise tendo em conta o método de suicídio também não revelou diferenças quanto à letalidade do método, sendo que no seu conjunto os resultados parecem sugerir que o polimorfismo do gene *STX1A* não desempenha um papel directo na etiologia do suicídio na amostra estudada. No entanto outras variantes genéticas no gene *STX1A* poderão estar envolvidas, tendo em conta que foram detectadas variações na expressão do gene *STX1A* em vítimas de suicídio (Tochigui, 2008), alterações estas que por sua vez podem interferir no mecanismo de libertação dos neurotransmissores.

3.2 Análise do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*

O gene que codifica a proteína SNAP-25 localiza-se no cromossoma 20p12.2 e a proteína SNAP-25 é componente integral da maquinaria de fusão exocitótica a nível sináptico.

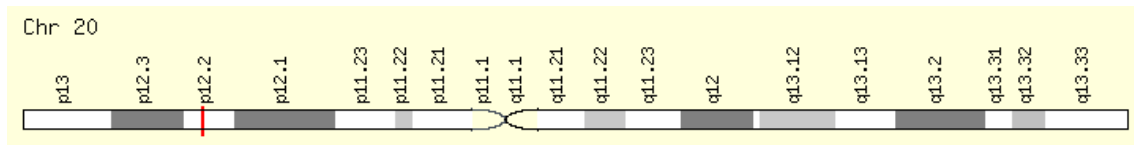


Figura 20: Representação esquemática da localização do gene *SNAP-25* no cromossoma 20.

O gene *SNAP-25* é constituído por 8 exões e 7 intrões e o polimorfismo T1069C, que conduz a uma substituição de uma base T por C, localiza-se na região 3'UTR



Figura 21: Representação esquemática da estrutura do gene *SNAP-25* e localização do polimorfismo T1069C na região 3'UTR. Legenda da figura: ex1- 8 - exões do gene; caixa branca: região 3'UTR. Adaptado de Fenge t al. (2005).

Para o estudo do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, o DNA genómico foi amplificado, segundo o método PCR-RFLP descrito em 2.4.2.2 do capítulo Materiais e Métodos, obtendo-se produtos de 261 pb. O produto amplificado foi digerido com a enzima *DdeI* de acordo com as condições descritas em 2.5.2.2 do capítulo Materiais e Métodos.

O perfil electroforético dos fragmentos de DNA resultantes da digestão com a enzima de restrição permitiu a identificação de uma banda de 261 pb que corresponde aos indivíduos homozigóticos para o alelo T, bandas de 261+228pb (e uma banda de 33

pb que não é visível no perfil electroforético) que correspondem aos indivíduos heterozigóticos TC e uma banda de 228pb que corresponde aos indivíduos heterozigóticos para o alelo C.



Figura 22: Imagem da electroforese dos fragmentos resultantes da digestão com a enzima *DdeI*, para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose a 3%. Legenda: 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 14, 16- amostras correspondentes a indivíduos homozigóticos TT; 2, 7, 8, 9, 13, 15- amostras correspondentes a indivíduos heterozigóticos TC; 17- marcador de peso molecular de 100pb.

Na tabela V estão representadas as distribuições genótípicas observadas e as distribuições genótípicas esperadas segundo o HWE para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*. As distribuições dos genótipos estão de acordo com HWE para este polimorfismo, tanto na amostra total de controlos ($X^2=0,178$; $df=1$; $p=0,673$) como na amostra total de suicídios ($X^2=1,294$; $df=1$; $p=0,255$).

Tabela V: Distribuições genótípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, na amostra total de suicídios e na amostra total de controlos.

	Genótipos observados			Genótipos esperados pelo HWE			Valores p
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	
Suicídio	155	82	16	151,84	88,32	12,84	$X^2=1,294$; $df=1$; $p=0,255$
Controlos	198	113	14	199,29	110,41	15,29	$X^2=0,178$; $df=1$; $p=0,673$

Na tabela VI são apresentadas as frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, para as vítimas de suicídio (n=253) e controlos (n=325).

Tabela VI: Distribuição genotípica e alélica, com as respectivas frequências, do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* em suicídios e controlos.

	Genótipos(%)			Alelos(%)	
	TT	TC	CC	T	C
Suicídio	155 (61,3)	82 (32,4)	16 (6,3)	392 (77,5)	114 (22,5)
Controlos	198 (60,9)	113 (34,8)	14 (4,3)	509 (78,3)	141 (21,7)
	$X^2=1,352; df=2; p=0,509$			$X^2=0,072; df=1; p=0,788$	

No que diz respeito à distribuição alélica do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* na população portuguesa, a frequência do alelo T (78,3%) é cerca de 3,6 vezes superior à do alelo C (21,7%). Nas vítimas de suicídio o alelo T foi identificado em 77,5% dos casos e o alelo C em 22,5%. Relativamente às distribuições genótípicas nos controlos as frequências dos genótipos TT, TC e CC são 60,9%, 34,8% e 4,3%, respectivamente. Para a amostra total do suicídio obteve-se 61,3% para o genótipo TT, 32,4% para o genótipo TC e 6,3% para o genótipo CC.

Como mencionado anteriormente, o suicídio está relacionado com as doenças mentais e num estudo em famílias Irlandesas foi revelada associação entre o gene *SNAP-25* e a esquizofrenia (Fanous, 2009), podendo eventualmente o gene *SNAP-25* desempenhar também um papel na etiologia do suicídio. Assim, procedemos à análise estatística comparando a amostra total de suicídios versus amostra total de controlos e os resultados obtidos são negativos quer para o genótipo ($X^2=1,352; df=2; p=0,509$), quer para os alelos ($X^2=0,072; df=1; p=0,788$), o que sugere que o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* não desempenha um papel importante na etiologia do suicídio na amostra estudada. Até ao momento, não existem estudos genéticos efectuados a nível mundial relativamente ao gene *SNAP-25* e o suicídio.

À semelhança do gene *STX1A* e no sentido de se proceder a uma análise de género efectuou-se a estratificação da amostra e os resultados estão representados na figura 19 e na figura 20 para o sexo masculino e feminino, respectivamente. A distribuição genotípica neste locus está de acordo com o HWE (Tabela VII), nas vítimas de suicídio do sexo masculino ($X^2=1,534$; $df=1$; $p=0,216$) e do sexo feminino ($X^2=0,008$; $df=1$; $p=0,931$), bem como nos controlos do sexo masculino ($X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,976$) e feminino ($X^2=0,460$; $df=1$; $p=0,498$).

Tabela VII: Distribuições genotípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, relativas à análise de género.

	Genótipos observados			Genótipos esperados pelo HWE			Valores p
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	
Vítimas suicídio sexo masculino	112	60	13	108,99	66,01	9,99	$X^2=1,534$; $df=1$; $p=0,216$
Controlos sexo masculino	128	72	10	128,08	71,85	10,08	$X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,976$
Vítimas suicídio sexo feminino	43	22	3	42,88	22,24	2,88	$X^2=0,008$; $df=1$; $p=0,931$
Controlos sexo feminino	70	41	4	71,22	38,56	5,22	$X^2=0,460$; $df=1$; $p=0,498$

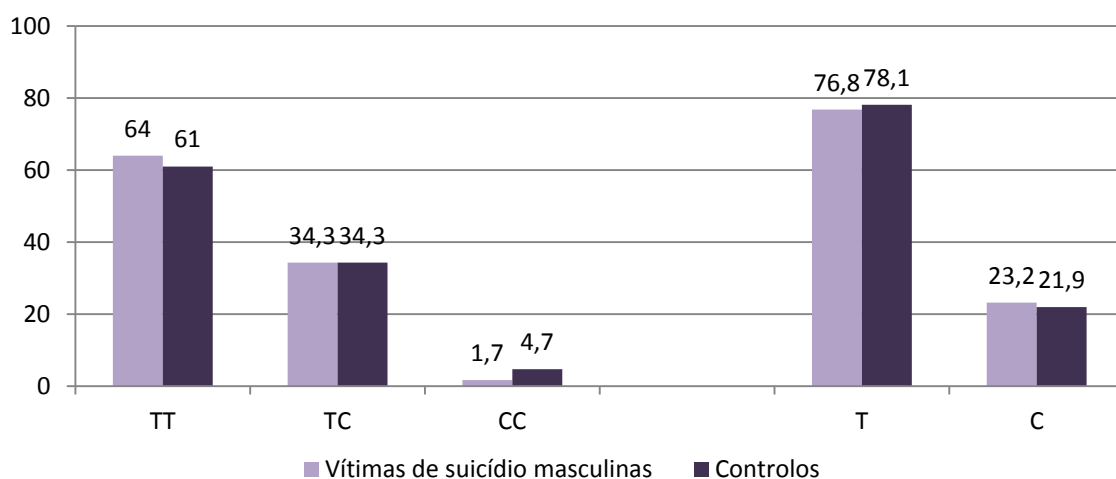


Figura 23: Representação gráfica das distribuições (%) genotípicas e alélicas do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* entre casos de suicídio e controlos masculinos.

A análise estatística dos resultados não revelou diferenças estatisticamente significativas nas frequências genóticas do polimorfismo T1069C ($X^2=0,970$; $df=2$; $p=0,616$), entre as vítimas de suicídio do sexo masculino ($n=175$) e os controles do sexo masculino ($n=210$). Similarmente, obteve-se resultados negativos para as frequências alélicas ($X^2=0,132$; $df=1$; $p=0,716$).

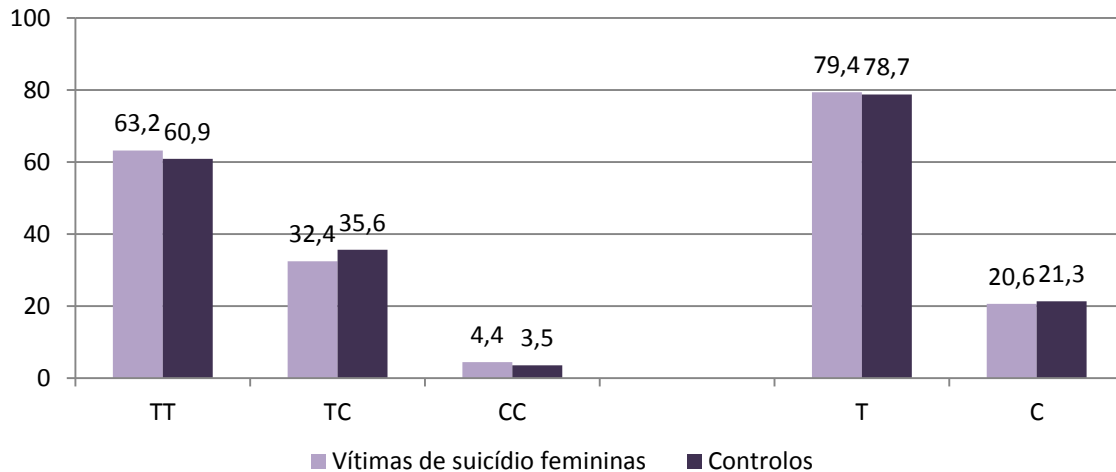


Figura 24: Representação gráfica das distribuições (%) genóticas e alélicas do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, entre casos de suicídio e controlos femininos

Entre as vítimas de suicídios do sexo feminino ($n=69$) e os controlos do sexo femininos ($n=115$), também não são observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências para o polimorfismo T1069C, tanto ao nível dos genótipos ($X^2=0,271$; $df=2$; $p=0,873$), como dos alelos ($X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,976$).

Procedeu-se também a uma análise das diferenças do método utilizado para consumir o suicídio, sendo a amostra de vítimas de suicídio estratificada em suicídio violento ($n=198$) e suicídio não violento ($n=54$). As frequências dos genótipos relativas ao polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* estão de acordo com HWE (Tabela VIII), na amostra de suicídio violento ($X^2=2,025$; $df=1$; $p=0,155$) e na amostra de suicídio não violento ($X^2=0,133$; $df=1$; $p=0,715$).

Tabela VIII: Distribuições genotípicas observadas e esperadas de acordo com o HWE para o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, na amostra de suicídio violento e na amostra de suicídio não violento.

	Genótipos observados			Genótipos esperados pelo HWE			Valores p
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	
Suicídio Violento	121	63	14	117,46	70,09	10,46	$X^2=2,025$; $df=1$; $p=0,155$
Suicídio Não Violento	33	12	2	33,45	18,10	2,45	$X^2=0,133$; $df=1$; $p=0,715$

Nas figuras 18 e 19 são mostradas graficamente as distribuições genotípicas e alélicas do polimorfismo T1069C, nos casos de suicídio violento e não violento, respectivamente.

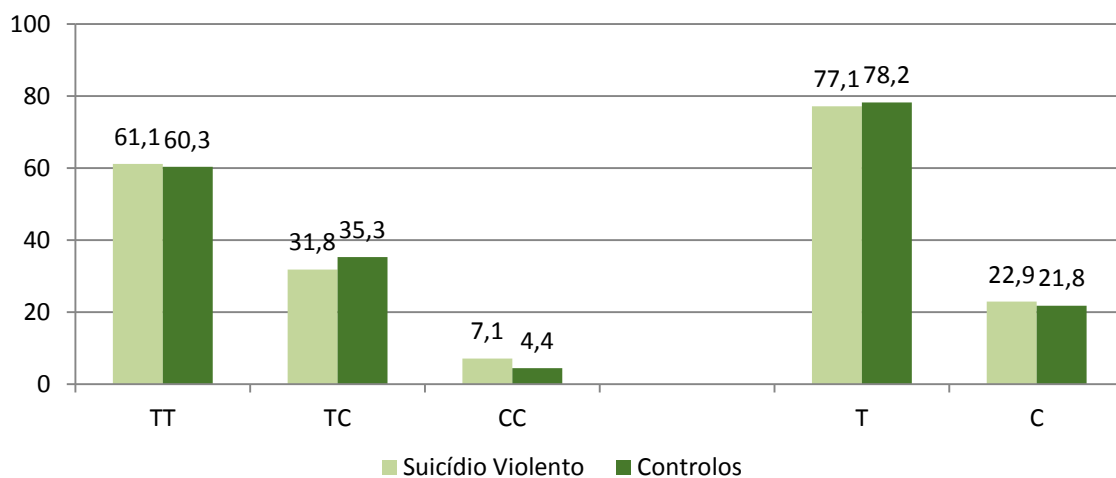


Figura 25: Representação gráfica das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, em vítimas de suicídio violento e controles.

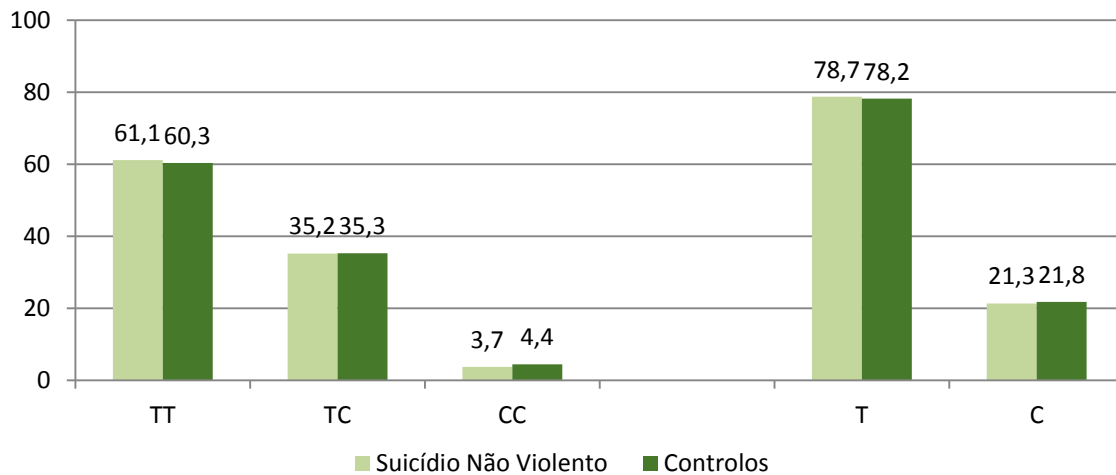


Figura 26: Representação gráfica das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do intrão 7 do gene *SNAP-25*, em vítimas de suicídio não violento e controlos.

A análise estatística dos resultados não revelou diferenças estatisticamente significativas entre o suicídio violento versus controlo e entre o suicídio não violento versus controlo, quer para as frequências genotípicas (suicídio violento: $X^2=2,077$; $df=2$; $p=0,345$; suicídio não violento: $X^2=0,043$; $df=2$; $p=0,972$), quer para as frequências alélicas (suicídio violento: $X^2=0,135$; $df=1$; $p=0,714$; suicídio não violento: $X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,973$).

No seu conjunto os resultados apresentados parecem sugerir que a variante T1069C não desempenha um papel directo na predisposição para o suicídio. Contudo o estudo de outros polimorfismos no gene da *SNAP-25* são cruciais para esclarecer o papel deste gene na etiologia do suicídio, uma vez que estudos de microarrays realizados em vítimas de suicídio revelaram alterações na expressão do gene *SNAP-25* (Sequeira et al., 2009). Além disso, num estudo *post-mortem*, em doentes com esquizofrenia e doentes com depressão, foram detectados níveis elevados de *SNAP-25* e *VAMP* no subgrupo de doentes que consumaram suicídio. Alterações na expressão do gene *SNAP-25*, por sua vez seriam consistentes com modificações nos vários sistemas de neurotransmissão, uma vez que estudos prévios relativos à *SNAP-25* sugerem evidências de que tanto uma diminuição como um aumento da expressão de *SNAP-25* podem resultar em perturbações do normal funcionamento neuronal (Raber et al., 1997;

Owe-Larsson et al, 1999). Face ao exposto, é possível que outras variantes genéticas no gene *SNAP-25* desempenhem um papel na etiologia do suicídio.

4. Conclusão

Várias evidências sugerem que as proteínas sinápticas da maquinaria excitotónica, nomeadamente a SNAP-25 e a STX1A poderão estar implicadas na etiologia do suicídio. Contudo, a nível mundial ainda não foram realizados estudos genéticos para testar esta hipótese. Assim, no presente trabalho investigou-se um potencial envolvimento dos genes SNAP-25 e STX1A da maquinaria excitotónica na etiologia do suicídio na população Portuguesa, utilizando a estratégia do gene candidato.

No que se refere ao polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A*, os resultados são negativos para a distribuição genotípica e alélica, quer na amostra total, quer para a análise de género e método de suicídio. Face aos resultados obtidos, o polimorfismo no intrão 7 do gene *STX1A* parece não desempenhar papel major na etiologia do suicídio.

Em relação ao polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* não se observou diferenças estatisticamente significativas entre a amostra total de vítimas de suicídio versus controlos, para as distribuições genotípicas e alélicas. Similarmente, os resultados das análises de género e método utilizado para consumar o suicídio são negativos. No seu conjunto os resultados parecem sugerir que o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* não desempenha um papel directo na etiologia do suicídio na amostra estudada da população portuguesa.

Uma vez que não existem estudos genéticos efectuados a nível mundial relativamente à maquinaria excitotónica, este estudo é pioneiro e poderá desencadear a investigação não só destas variantes genéticas como de novas variantes nestes genes em diferentes populações mundiais, bem como na população portuguesa, o que será crucial no sentido de esclarecer o papel destes genes na etiologia do suicídio.

5. Referências Bibliográficas

Arsenault-Lapierre G, Kim C, Turecki G. Psychiatric diagnoses in 3275 suicides: a meta-analysis. *BMC Psychiatry* 2004; 4: 34-37.

Azenha D, Alvesa M, Matos R, Santa SF, Silva B, Cordeiro C, Vieira DN, Ambrósio AM. Male specific association between the 5-HTR6 gene 267C/T SNP and suicide in the Portuguese population. *Neurosci Lett* 2009; 466: 128–130.

Baca-García E, Vaquero C, Diaz-Sastre C, Saiz-Ruiz J, Fernández-Piqueras J, León. A Gender-Specific Association between the Serotonin Transporter Gene and Suicide Attempts. *Neuropsychopharmacology* 2002; 26:692-695.

Banerjee A, Barry VA, DasGupta BR, Martin TF. N-ethylmaleimide-sensitive factor acts at a pre-fusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 20223-20226.

Barr CL, Feng Y, Wigg K, Bloom S, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL. Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage. *Mol Psychiatry* 2000; 5: 405–409.

Bennett MK, Calakos N, Scheller RH. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 1992; 257: 255-259.

Bertolote JM, Fleischmann A. Suicide and psychiatric diagnosis: a worldwide perspective. *World Psychiatry* 2002; 1: 181-185.

Bertolote JM, Fleischmann. Suicidal Behavior Prevention:WHO Perspectives on Research. *Am J of Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 133: 8–12.

Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* 1993; 12: 4821-4828.

Blaxter M. Revealing the Dark Matter of the Genome. *Science* 2010; 330:1758-1759.

Bochud M. Genetics for clinicians: From candidate genes to whole genome scans (technological advances). *Best Pract Res Endocrinol Metab* 2012; 26: 119-132.

Bondy B, Buettner A, Zill P. Genetics of suicide. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 336-351.

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314–331.
- Brent DA, Mann JJ. Family genetic studies, suicide and suicide behavior. *Am J Med Genet C: Semin Med Genet* 2005; 133: 13-24.
- Brent DA, Melhem N. Familial Transmission of Suicidal Behavior. *Psychiatr Clin North Am.* 2008; 31: 157–177.
- Brezo J, Klempman T, Turecki G. The Genetics of Suicide: A Critical Review of Molecular Studies. *Psychiatr Clin North Am* 2008; 31:179-203.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177-86.
- Bruns D, Jahn R. Molecular determinants of exocytosis. *Pflugers Arch* 2002; 443: 333–338.
- Burmeister M. Basic Concepts in the Study of Diseases with Complex Genetics. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 522-532.
- Burton PR, Tobin MD, Hopper J. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 2005; 366: 941–51.
- Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2:91-99.
- Carpi FM, Pietro FD, Vincenzetti S, Mignini F and Napolioni1 M. Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2011; 5: 1-7.
- Corradini I, Verderio C, Sala M, Wilson MC and Matteolia M. SNAP-25 in Neuropsychiatric Disorders. *Ann N Y Acad. Sci* 2009; 1152: 93–99.
- Costanza A, D’Orta I, Perroud N, Bukhardt S, Malafosse A, Mangin P, La Harpe R. Neurobiology of suicide: do biomarkers exist? *Int J Legal Med* 2013.
- Dumais A, Lesage AD, Alda M, Rouleau G, Dumont M, Chawky N, Roy M, Mann JJ, Benkelfat C, Turecky G. Risk factors for suicide completion in major depression: a case-control study of impulsive and aggressive behaviors in men. *Am J Psychiatry* 2005; 162: 2116-2124.

Ellsworth D, Manolio TA. The emerging importance of genetics in Epidemiologic Research. I. Basic concepts in human genetics and laboratory technology. *Ann Epidemiology* 1999; 9: 1-16.

Ernst C, Mechawar N, Turecki G. Suicide neurobiology. *Prog Neurobiol* 2009; 89: 315-333.

Estivill X, Armengol L. Copy Number Variants and Common Disorders: Filling the Gaps and Exploring Complexity in Genome-Wide Association Studies. *PLoS Genet* 2007; 3: 1787-1799.

Fanous AH, Zhao Z, van den Oord EJCG, Maher BS, Thiselton DL, Bergen SE, Wormley B, Bigdeli T, Amdur RL, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Riley BP. Association study of SNAP-25 and schizophrenia in Irish family and case-control samples. *Am J Hum Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; 153: 663-674.

Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNARES. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:15781-15786.

Feng Y, Crosbie J, Wigg K, Pathare T, Ickowicz A, Scharchar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Swanson J, Kennedy JL, Barr CL. The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 998-1005.

Fiori LM, Turecki G. Broadening our horizons: gene expression profiling to help better understand the neurobiology of suicide and depression. *Neurobiol of Dis* 2012; 45:14-22.

Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 1997; 90: 523-535.

Hardy GH. Mendelian proportions in a Mixed Population. *Science* 1908; 28:49-50.

Hawton K, van Heeringen K. Seminar: Suicide. *Lancet* 2009; 373:1372-81.

Hayash T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hatal Y, Südhof TC, Niemann H. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* 1994; 13:5051-5061.

Honer WG, Falkai P, Bayer TA, Xie J, Hu L, Li H, Arango V, Mann J, Dwork AJ, Trimble WS. Abnormalities of SNARE mechanism proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness. *Cereb Cortex* 2002; 12: 349-356.

Isometsä ET, Lonngvist JK. Suicide attempts preceding completed suicide. *Br J Psychiatry* 1998; 173: 531-535.

Isometsä ET. Psychological autopsy studies-a review. *Eur Psychiatry* 2001; 16: 379-85.

Jahn R, Südhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 863–911.

Jahn R. Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1014: 170-178.

Jahn R, Scheller RH. SNAREs – engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:631-643.

Levi F, La Vecchia, Lucchini F, Negri E, Saxena S, Maulik PK, Saraceno B. Trends in mortality from suicide, 1965–99. *Acta Psychiatr Scand* 2003; 108: 341–349.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NG, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HMD, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lonngvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt J, Blouin J, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoega T, Helgason T. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, 2 part II: Schizophrenia. 2003 *Am J HumGenet* 73: 34–48.

Link E, Edelmann L, Chou JH, Binz T, Yamasaki S, Eise U, Baumer M, Südhof TC, Niemann H, Jahn R. Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:1017-1023.

Maestrini E, Paul A, Monaco AP, Bailey A. Identifying autism susceptibility genes. *Neuron* 2000; 28: 19-24.

Mann JJ, Arango VA, Avenevoli S, Brent DA, Champagne FA, Clayton P, Currier D, Dougherty DM, Haghghi F, Hodge SE, Kleinman J, Lehner T, McMahon F, Mósicki EK, Oquendo MA, Pandey GN, Pearson J, Stanley B, Terwilliger J, Wenzel A. Candidate endophenotypes for genetic studies of suicidal behavior. *Biol Psychiatry* 2008; 65: 556-563.

Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008; 118: 1590-1605.

Marian A.J. Molecular Genetic Studies of Complex Phenotypes. *Transl Res* 2012; 159: 64–79.

Marsh S, Pharmacogenomics. *Ann of Oncol* 2007; 18 Suppl 9: ix24–ix28.

Mayer A, Wickner W, Haas A. Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p(a-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. 1996; *Cell* 85: 83-94.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.

Moisés HW, Yang L, Kristbjarnarson H, Wiese C, Byerley W, Macciardi F, Arolt V, Blackwood D, Liu X, Sjörgren B, Aschawer HN, Kennedy JL, Zoega T, Ivarsson O, Bui MT, Yu MH, Havsteen B, Commenges D, Weissenbach J, Schwinger E, Gottesman II, Pakstis AJ, Wetterberg L, Kidd KK, Helgason T. An international two-stage genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Nat Genet* 1995; 11: 321-324.

Mohrmann R, de Wit H, Verhage M, Neher E, Sorensen JB. Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes. *Science* 2010; 330:502-505.

Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R.. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235:1616–1622.

Nakamura Y. DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *J Hum Genet* 2009; 54, 1–8.

Nakayama T, Fujiwara T, Miyazawa A, Asakawa S, Shimizu N, Shimizu Y, Mikoshiba K, Akagawa K. Mapping of the Human HPC-1/Syntaxin 1A Gene (STX1A) to Chromosome 7 Band q11.2. *Genomics* 1997; 42: 173-176.

Nock M, Borges G, Bromet EJ, Cha CB, Kessler RC, Lee S. Suicide and Suicidal Behavior. *Epidemiol Rev* 2008; 30:133–154.

Ogura T, Wilkinson AJ. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 2001; 6:575-592.

Osen-Sand A, Catsicas M, Staple JK, Jones KA, Ayala G, Knowles J, Grenningloh G, Catsicas S. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* 1993; 364: 445 - 448

Owe-Larsson B, Berglund MM, kristensson K, Garoff H, Larhammmar D, Brodin L, Low P. Perturbation of the synaptic release machinery in hippocampal neurons by overexpression of SNAP-25 with the Semliki Forest virus vector. *Eur J Neurosci* 1999; 11:1981-1987.

Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Bio.* 1989; 109: 3039-3052.

Pandit SD, Li KCP. Concepts and basic methods in molecular biology. *Acad Radiol* 2004; 11: 686-697.

Poirier MA, Hao JC, Malkus PN, Chan C, Moore MF, King DS, Bennett MK. Protease resistance of syntaxin-SNAP-25-VAMP complexes. Implications for assembly and structure. *J Biol Chem* 1998; 273:11370-11377.

Raber J, Mehta PP, Kreifeldt M, Parsons LH, Weiss F, Bloom FE, Wilson MC. Coloboma hyperactive mutant mice exhibit regional and transmitter-specific deficits in neurotransmission. *J Neurochem* 1997; 68: 176-186.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M,

Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengo L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444–454.

Reid-Lombardo KM, Petersen GM. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: Fundamentals. *Surgery* 2010; 147: 469-474.

Richmond, J. Synaptic function (December 7, 2007), WormBook, ed. The C. elegans Research Community.

Rizo J, Südhof TC. SNAREs and MUNC18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 641-653.

Rizo J, Rosenmund C. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Bio* 2008; 15: 665-674.

Rizo J and Südhof TC. The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices- Guilty as Charged? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28: 279-308.

Roy A, Nielsen D, Rylander G, Sarchiapone M, Segal N. Genetics of Suicide in Depression. *J Clin Psychiatry* 1999; 60: 12-27.

Roy A e Segal NL. Suicidal behavior in twins: a replication. *J Affect Disord* 2001; 66: 71-74.

Roy A. Genetic and biologic risk factors for suicide in depressive disorders. *Psychiatr Q* 1993; 64: 345-358.

Runeson B, Asberg M. Family history of suicide among suicide victims. *Am J Psychiatry* 2003; 160:1525–1526.

Sambrook J and Russel DW. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Santella R. Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genome Amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1585-1587.

Sequeira A, Klempan T, Canetti L, French-Mullen J, Benkelfat C, Rouleau GA, Turecki G. Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 640-655.

Sequeira A, Mamdani F, Ernst C, Vawter MP, Bunney WE, Lebel V, Rehal S, Klempan T, Gratton A, Benkelfat C, Rouleau GA, Mechawar N, Turecki G. Global Brain Gene Expression Analysis Links Glutamatergic and GABAergic Alterations to Suicide and Major Depression. *PLoS ONE* 2009; 4: e6585.

Sham PC, Cherny SS, Kao PYP, Song Y, Chan D, Cheung KMC. MINI-SYMPOSIUM: GENETIC APPROACHES TO DISC DISEASE (iii) Whole-genome association studies of complex diseases. *Current Orthopaedics* 2008; 22: 251-258.

Sinha R, Ahmed D, Jahn R, Klingauf J. Two synaptobrevin molecules are sufficient for vesicle fusion in central nervous system synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 14318-14323.

Sorensen JB, Wiederhold K, Müller EM, Milosevic I, Nagy Gábor, Groot BL, Grubmüller, Fasshauer D. Sequential N- to C- terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *EMBO J* 2006; 25:955-966.

S.P.S. Sociedade Portuguesa Suicidologia Estatística 2013.

Stankiewicz P and Lupski JR. Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. *Annu Rev Med* 2010; 61: 437-455.

Steinberg K, Beck J, Nickerson D, Garcia-Closas M, Gallagher M, Caggana M, Reid Y, Cosentino M, Ji J, Johnson D, Hayes RB, Earley M, Lorey F, Hannon H, Khoury MJ, Sampson E. DNA Banking for Epidemiologic Studies: A Review of Current Practices. *Epidemiology* 2002; 13: 246–254.

Südhof TC, Rizo J. Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:a005637.

Südhof TC. The synaptic vesicle Cycle. *Ann Rev Neurosci* 2004; 27: 509-47.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 1998; 395, 347–353.

- Teare MD, Barrett JH .Genetic linkage studies. *Lancet* 2005; 366:1036-44.
- Tefferi A, Wieben ED, Dewald GW, Whiteman DAH, Bernard ME, Spelsberg T. Primer on biomedical genomics part II: Methods in Molecular Genetics. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 785-808.
- The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population scale sequencing. *Nature* 2010; 467: 1061-1073.
- The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; 449: 851-861.
- The International Human Genome Mapping Consortium. A physical map of the human genome. *Nature* 2001; 409: 934-41.
- Tidemalm D, Runeson B, Waern M, Frisell T, Carlström E, Lichtenstein P, Langström N. Familial clustering of suicide risk: a total population study of 11.4 million individuals. *Psychol Med* 2011; 41, 2527–2534.
- Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Sasaki T, Kato N, Kato T. Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci Res* 2008; 60: 184-191.
- Turecki G. O suicídio e sua relação com o comportamento impulsivo-agressivo. *Rev Bras Psiquiatr* 1999; 21: 18-22.
- Turecki G. Dissecting the suicide phenotype: the role of impulsive-aggressive behaviours. *J Psychiatry Neurosci* 2005; 30: 398-408.
- Turecki G, Ernst C, Jollant F, Labonté B, Mechawar N. The neurodevelopmental origins of suicidal behavior. *Trends Neurosci* 2012; 35: 14-23.
- Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:4538-4542.
- Tsai S, Hong C, Liou Y. Recent molecular genetic studies and methodological issues in suicide research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35: 809-817.
- van den Bogaart G, Holt MG, Bunt G, Riedel D, Wouters FS, Janh R. One SNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 358-364

Voracek M, Loibl LM. Genetics of suicide: a systematic review of twins studies. *Wien Klin Wochenschr* 2007; 119:463-475.

Waites CL, Garner CC. Presynaptic function in health and disease. *Trends Neurosci* 2011; 34: 326-337.

Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388–396.

Weinberg, W. 1908. Über Vererbungsgesetze beim Menschen. *Z. Abst V Vererb* 1908 1: 277-330.

W.H.O. World Health Organization. Burden of Mental Behavioral Disorders: suicide. 2005

W.H.O. World Health Organization. Suicide prevention (SUPRE). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2007.

W.H.O. World Health Organization. Mental health. Suicide rates per 100,000 by country, year and sex. 2011

Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet*. 2005; 76: 887–883.

Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational Inferences about Departures from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 967–986.

Wong AHC, Trakalo J, Likhodi O, Yusuf M, Macedo A, Azevedo M, Klempan T, Pato MT, Honer WG, Pato CN, Tol HHMV, Kennedy JL. Association Between Schizophrenia and the Syntaxin 1A Gene. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 24-29.

Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet* 2002; 111: 573–574.

Yang B, Gonzalez L, Jr., Prekeris R, Steegmaier M, Advani RJ, Scheller RH. SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem* 1999; 274: 5649-5653.