



Maria Helena Correia Dias

# Genética do Suicídio: A Hipótese GABAérgica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Alda Cardoso (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Junho de 2014



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA





FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Helena Correia Dias

# Genética do Suicídio: A Hipótese GABAérgica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Alda Cardoso (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Junho de 2014

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe por provar o contrário”

*Albert Einstein*

“Sei que o tempo caminha veloz,  
Que tudo na vida tem fim,  
Oh Mondego, que segues correndo pra foz  
Não afastes Coimbra de mim  
Sei que a vida terá que seguir,  
Que só tenho de caminhar  
Oh Mondego, eu vejo o mundo ruir  
E Coimbra calada a olhar...”

*TMUC: Canção ao Mondego*

“Não sou da altura que me vêem, mas sim da altura que os meus olhos podem ver”

*Fernando Pessoa*

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Alda Cardoso um muito obrigada por toda a dedicação, ajuda e confiança dada, e por ter permitido a realização do trabalho laboratorial na Unidade de Genética Clínica e Molecular do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses por ter sido a instituição de acolhimento responsável pela elaboração deste trabalho.

À minha mãe Helena, por ser mais uma vez como em todas as etapas da minha vida, o meu porto de abrigo, a minha “mais que tudo”, que me acalma e me guia em todos os meus passos, confiando mais em mim do que eu mesma.

Ao meu Tiago, pela força e companheirismo diário, pela compreensão e dedicação dada em todas as circunstâncias. E por todas as vezes em que um abraço transmitia mais que mil palavras.

Ao meu pai Francisco que me encorajou e me fez sentir que mesmo que não conseguisse, eu era mais importante.

À minha irmã Tita por me mostrar que deveria levar a vida com mais calma e ao Francisco que veio encher a tia de força e alegria.

Ao meu irmão Raúl, por todo o amor e força incondicional que mesmo à distância me transmitia.

Ao Pedro por todos os momentos passados diariamente, e principalmente à Márcia e à Sandra por todas as lágrimas, todo o apoio e ajuda, e por me fazerem acreditar que ia ser capaz.

Aos meus fiéis amigos de todas as datas, dos quais sempre havia uma palavra carinhosa.

## Agradecimentos

Ao Diogo, à Lipa, à Di, à Fábi, à Inês, à Su e ao Ivo, por todo o apoio e força, companheirismo e amor. Por estarem presentes em todos os momentos mais difíceis e por fazerem parte de todos os momentos da minha vida.

A minha avó, presença constante da minha vida, que todos os dias, de alguma forma, me acompanhava e me fazia sentir que todos os sacrifícios têm um reconhecimento merecido, e que só com esforço e trabalho se chega onde se quer chegar.

A Coimbra, a minha fiel companheira dos tempos sós, que nunca me desiluiu, sendo, às vezes, mais do que uma “verdadeira pessoa”, por ter sempre mais para dar do que para receber de mim, e às águas do meu Mondego por me levarem todas as mágoas, um muito obrigada....

Ao Senhor Jesus da Piedade por me permitir concretizar mais este objetivo da minha vida.

A todos, o meu eterno agradecimento.

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| <b>Índice</b> .....   | i   |
| Lista de Figuras..... | iii |
| Lista de Tabelas..... | iv  |
| Abreviaturas.....     | v   |
| Resumo.....           | vii |

## **Capítulo 1- Introdução**

|  |    |
|--|----|
| 1.1- Contextualização geral do comportamento suicida.....                              | 2  |
| 1.2- Fundamentos da Genética.....  | 4  |
| 1.2.1- Projeto do Genoma Humano, Projeto <i>HapMap</i> e Projeto dos 1000 Genomas..... | 6  |
| 1.3- Sistema GABAérgico  |    |
| 1.3.1- Introdução ao sistema.....  | 7  |
| 1.3.2- Hipótese GABAérgica na etiologia do suicídio.....                               | 10 |
| 1.4- Objetivo.....   | 11 |

## **Capítulo 2 - Metodologia**

|   |    |
|---|----|
| 2.1- Amostra.....   | 13 |
| 2.2- Extração do DNA genómico.....  | 13 |
| 2.3- Quantificação e determinação do grau de pureza da amostra de DNA ..... | 14 |
| 2.4- Amplificação do DNA genómico.....                                      | 14 |
| 2.5- Digestão do DNA genómico e enzimas de restrição .....                  | 17 |
| 2.6- Eletroforese.....  | 17 |
| 2.7- Genotipagem  |    |
| 2.7.1. Polimorfismo IVS10+15A>G do gene <i>GABRA1</i> .....                 | 18 |
| 2.7.2. Polimorfismo G3145A do gene <i>GABRG2</i> .....                      | 18 |
| 2.7.3. Polimorfismo C1412T do gene <i>GABRB2</i> .....                      | 19 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.8- Análise estatística.....                          | 20        |
| <b>Capítulo 3- Resultados e Discussão</b>              |           |
| 3.1. Gene <i>GABRA1</i> -Polimorfismo IVS10+15A>G..... | 22        |
| 3.2. Gene <i>GABRG2</i> -Polimorfismo G3145A.....      | 24        |
| 3.3. Gene <i>GABRB2</i> - Polimorfismo C1412T.....     | 26        |
| <b>Capítulo 4- Conclusão.....</b>                      | <b>29</b> |
| <b>Capítulo 5- Perspetivas Futuras.....</b>            | <b>31</b> |
| <b>Capítulo 6- Referências Bibliográficas .....</b>    | <b>33</b> |



**Lista de Figuras**

**Figura 1:** Taxa de mortalidade por suicídio, por 100.000 habitantes.....3

**Figura 2:** Sinapse mediada por recetores metabotrópicos, GPCR e recetores ionotrópicos, *Ligand Gated Ion Channel* (LGIC).....8

**Figura 3:** Estrutura do recetor GABA<sub>A</sub> e de cada subunidade.....9

**Figura 4:** Estrutura do recetor GABA<sub>A</sub> e locais de ligação de diversas substâncias.....10

**Figura 5:** Esquema representativo das três fases do processo de amplificação de DNA, com um total de 20 a 30 ciclos.....16

**Figura 6:** Imagem representativa do gene *GABRA1* e localização do polimorfismo IVS10+15A>G.....22

**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos de digestão com a enzima *AvaII* do polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1*.....22

**Figura 8:** Representação esquemática do gene *GABRG2* com os exões e os intrões.....24

**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de digestão com a enzima *NciI* do polimorfismo G3145A do gene *GABRG2*.....24

**Figura 10:** Diagrama representativo do gene *GABRB2*.....26

**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose a 3,5% dos produtos de digestão com a enzima *BanI* do polimorfismo C1412T da região codificante do gene *GABRB2*.....26

**Lista de Tabelas**

**Tabela I:** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1*, em amostras de vítimas de suicídio e controlos de indivíduos da população portuguesa.....23

**Tabela II:** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo G3145A do gene *GABRG2*, em amostras de vítimas de suicídio e controlos de indivíduos da população portuguesa.....25

**Tabela III:** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo C1412T do gene *GABRB2*, em amostras de vítimas de suicídio e controlos de indivíduos da população portuguesa.....27

**Abreviaturas**

CNV: *Copy Number Variation*

DGS: Direção Geral de Saúde

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

dNTPs: *deoxynucleotide triphosphates*

EDTA: Etilenodiaminotetracético

GABA: *gamma-aminobutyric acid*

GABA<sub>A</sub>: *gamma-aminobutyric acid A receptor*

GABA<sub>B</sub>: *gamma-aminobutyric acid B receptor*

GABA<sub>C</sub>: *gamma-aminobutyric acid C receptor*

GABRA1: *GABA<sub>A</sub> receptor, alpha 1*

GABRA4: *GABA<sub>A</sub> receptor, alpha 4*

GABRA6: *GABA<sub>A</sub> receptor, alpha 6*

GABRG2: *GABA<sub>A</sub> receptor, gamma 2*

GABRB2: *GABA<sub>A</sub> receptor, beta 2*

GABRD: *GABA<sub>A</sub> receptor, delta*

GAD: Descarboxilase do ácido glutâmico

GPCR: *G-Protein Coupled Receptor*

HGP: *Human Genome Project*

LGIC: *Ligand Gated Ion Channel*

mRNA: *messenger RNA*

NaCl: Cloreto de Sódio

NLB: *Nuclear lysis Buffer*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pb: Pares de bases

RBC: *Red Blood Cell*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA: *ribonucleic acid*

Rpm: rotação por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SNC: Sistema Nervoso Central

STRP: *Short Tandem Repeat Polymorphism*

TE: Tris-EDTA

TBE: Tris-borato-EDTA

UTR: *Untranslated Region*

UV: Ultra-Violeta

VNTR: *Variable Number Tandem Repeat*

WHO: *World Health Organization*

**Resumo**

O suicídio é uma das grandes problemáticas dos dias de hoje, atingindo cerca de um milhão de pessoas em cada ano. Estudos familiares, de gémeos e de adoção demonstram que existe uma componente genética de cerca de 30-55% para o comportamento suicida. O estudo dos fatores genéticos que podem predispor os indivíduos para este comportamento pode contribuir para a prevenção de situações de risco.

O sistema GABAérgico tem sido implicado na etiologia do suicídio. Por exemplo, estudos de *microarrays* revelam alterações nos níveis de expressão de genes das subunidades de recetores GABA<sub>A</sub>, em vítimas de suicídio. Contudo, os genes do sistema GABAérgico estão mundialmente pouco estudados em relação à etiologia do comportamento suicida. Neste estudo, investigou-se o papel dos polimorfismos IVS10+15A>G do gene *GABRA1*, G3145A do gene *GABRG2* e C1412T do gene *GABRB2*, na etiologia do suicídio na população portuguesa. Os resultados obtidos não revelaram associação entre os polimorfismos nos genes *GABRA1* (IVS10+15A>G), *GABRG2* (G3145A) e *GABRB2* (C1412T) e o suicídio na amostra de indivíduos da população portuguesa estudada.

**Palavras-chave:** Suicídio; Sistema GABAérgico; Genética; gene *GABRA1*; gene *GABRG2*; gene *GABRB2*.

## **Capítulo 1- Introdução**

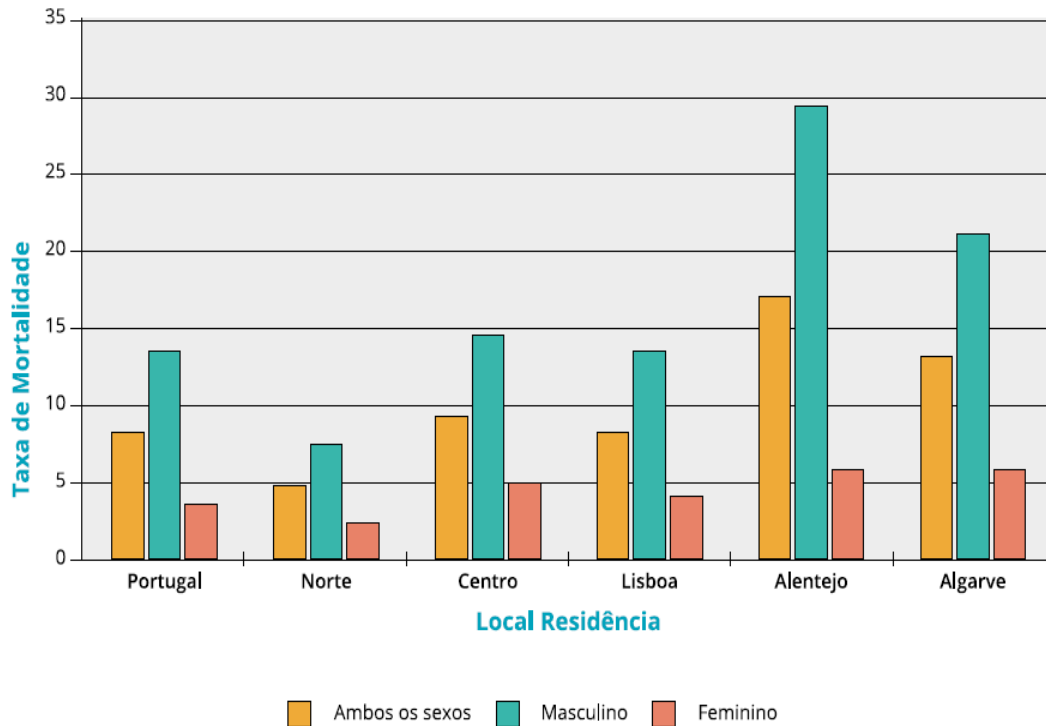
## 1. Introdução

### 1.1. Contextualização geral do comportamento suicida

O suicídio é um grave problema de saúde pública que afeta não só os indivíduos e as suas famílias, como também toda a sociedade em geral. O comportamento suicida engloba as ideias suicidas, com ou sem planeamento específico, as tentativas, de alto ou baixo índice de letalidade, e o suicídio consumado. Este último é considerado do ponto de vista Médico-Legal, uma morte de causa violenta, à semelhança dos homicídios e acidentes (WHO, 2011).

Atingindo cerca de um milhão de pessoas em cada ano, o suicídio é uma problemática atual que tem vindo a aumentar. Estudos epidemiológicos indicam que o suicídio representa uma das principais causas de morte no mundo, tendo sido verificado que as taxas de suicídio aumentaram em 60% em alguns países, nos últimos anos. As tentativas de suicídio são cerca de 20 vezes mais frequentes que o suicídio consumado (WHO, 2012). A nível mundial, o suicídio representa uma taxa de mortalidade global de 16 por 100.000 habitantes, constituindo a terceira causa de morte no grupo etário dos 15-34 anos, e a segunda nos jovens dos 15-19 (DGS, 2013 a). Portugal tem figurado entre os três países da União Europeia onde o suicídio mais aumentou nos últimos anos. Estas taxas atingiram aproximadamente os 9,8 por 100.000 habitantes em 2010, como é corroborado pela figura 1 (Eurostat, 2013; DGS, 2013 b).

Os suicídios consumados são mais frequentes no género masculino do que no feminino (3:1), enquanto as tentativas de suicídio representam (1:2) (DGS, 2013 b). Em Portugal, o suicídio é sobretudo um problema de regiões do Alentejo, como é possível observar no gráfico da figura 1 (DGS, 2013 b). Os meses do ano que apresentam mais casos de suicídio são Fevereiro, Maio e Setembro, e o que apresenta menos casos é Dezembro (Dias *et al.*, 2014).



**Figura 1:** Taxa de mortalidade por suicídio, por 100.000 habitantes. O gráfico apresenta as regiões de Portugal onde se verificam maiores e menores taxas de suicídio, por género. O Alentejo é a região do país que apresenta taxa de suicídio mais significativa, seguindo-se a região Algarvia. O norte do país é a região onde se verificam taxas de suicídio inferiores. Imagem adaptada de DGS (2013 b).

Existem métodos de suicídio violento e não violento. Os indivíduos do sexo masculino optam maioritariamente por métodos de suicídio mais violentos, com alto nível de agressão e impulsividade, recorrendo muitas vezes a armas de fogo. Por outro lado, os indivíduos do sexo feminino escolhem com maior frequência o método de afogamento e precipitação (Ajdacic-Gross *et al.*, 2008; Värnik *et al.*, 2008). O método de suicídio escolhido varia consoante os países ou regiões (Ajdacic-Gross *et al.*, 2008). Em Portugal os métodos mais frequentes, em ambos os sexos, são o enforcamento, as intoxicações por substâncias e as armas de fogo, enquanto os afogamentos, as precipitações e as trucidaciones são os menos frequentes (Dias *et al.*, 2014).

O comportamento suicida é uma doença complexa e multifatorial resultando de interações gene-gene e gene-ambiente (Kendler, 2010; Mandelli e Serretti, 2013). Estudos familiares, de gémeos e de adoção demonstram que existe uma componente



genética de cerca de 30-55% para o comportamento suicida (Arsenault-Lapierre *et al.*, 2004; Voracek e Loibl, 2007; Brent e Melhem, 2008; Pedersen e Fiske, 2010; Petersen *et al.*, 2013).

Além da componente genética, outros fatores podem também contribuir para o comportamento suicida. Entre eles, os acontecimentos recentes na vida do indivíduo, as características de personalidade, entre as quais a agressividade, a impulsividade e o neuroticismo (Turecki 2005; Brezo *et al.*, 2006; 2008), os fatores epigenéticos (Poulter *et al.*, 2008; Labonte e Turecki, 2010), os traumas de infância (Brodsky *et al.*, 2008; Lopez-Castroman *et al.*, 2012) e as psicopatologias. Cerca de 90% dos indivíduos com comportamento suicida apresentam alguma doença psiquiátrica (Arsenault-Lapierre *et al.*, 2004), destacando-se a depressão *major*, a doença bipolar, a esquizofrenia e as doenças de dependência de álcool ou outras substâncias (Fleischmann *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2005; Nock *et al.*, 2010).

## 1.2. Fundamentos da Genética

O modelo tridimensional de dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi proposto por James Watson e Francis Crick (Watson e Crick, 1953). Na estrutura de Watson-Crick, o DNA apresenta duas cadeias constituídas por nucleótidos e enroladas uma na outra. Estas cadeias são antiparalelas e complementares, devido à complementaridade de bases dos nucleótidos. Existem 4 tipos de bases na estrutura do DNA, adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) (Burton *et al.*, 2005).

A molécula de DNA organiza-se em cromossomas, existindo no ser humano 22 pares de cromossomas autossómicos e 1 par de cromossomas sexuais (XX e XY). Cada cromossoma contém um grande número de genes, unidades básicas e funcionais da hereditariedade. Estes codificam proteínas e outros produtos funcionais e estão localizados numa região particular do cromossoma, *locus* (no plural *loci*). Os genes são formados por exões (regiões codificantes), intrões (regiões não codificantes) e regiões reguladoras que flanqueiam o gene: região 5'UTR (*Untranslated region*, regiões não traduzidas) e 3'UTR. Na região 5'UTR encontra-se o promotor, que se situa imediatamente antes do local onde a transcrição é iniciada, e tem como função controlar a transcrição do gene. A região 3'UTR tem o codão de terminação (STOP) e o sinal de poliadenilação do mRNA (Ellsworth e Manolio, 1999).

As formas alternativas de cada gene são denominadas alelos (Healy, 2006), sendo designado como polimorfismo um alelo cuja frequência na população geral é superior a 1% (Burmeister, 1999). Consideram-se diversos tipos de polimorfismos utilizados como marcadores genéticos, *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs), *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), *Variable Number Tandem Repeats* (VNTRs) e *Copy Number Variations* (CNVs) (Nakamura *et al.*, 2009).

Os primeiros polimorfismos a serem utilizados, 1980, foram os RFLPs, que consistem na alteração de uma base. Estes são identificados a partir de endonucleases de restrição que reconhecem o polimorfismo e clivam o DNA em locais específicos, palíndromas, originando fragmentos de diferentes tamanhos (Nakamura *et al.*, 2009). Os VNTRs são sequências que se repetem sucessivamente no genoma humano. São marcadores altamente polimórficos, apresentando vários alelos numa população, sendo por isso bastante informativos (Nakamura *et al.*, 2009). Os STRPs (*Short Tandem Repeat Polymorphisms*) são formadas por sequências de DNA de duas a quatro pares de bases, que se repetem um grande número de vezes (Ellsworth e Manolio, 1999). Os SNPs são os marcadores genéticos mais úteis nos dias de hoje, sendo de extrema importância em análises de genética de populações e permitindo a identificação de genes de suscetibilidade para várias doenças (Nakamura *et al.*, 2009). Representam variações numa única base na sequência de DNA e são as variações genéticas mais comuns do genoma humano, quer em número, quer em frequência (Healy, 2006). Por último, as CNVs representam variações estruturais no genoma dos indivíduos (Nakamura *et al.*, 2009). São sequências de DNA formadas por muitos pares de bases (centenas a milhares), aparecendo em número variável nos indivíduos (Manolio e Collins, 2009).

Os polimorfismos podem localizar-se nos exões, intrões ou regiões promotoras e reguladoras. As alterações genéticas podem estar na origem de algumas doenças. O estudo das doenças complexas baseia-se num modo de transmissão não mendeliano. As doenças mendelianas consistem numa alteração de um único gene, enquanto que as doenças complexas são influenciadas por vários fatores e genes (Tabor *et al.*, 2002). Desta forma, a estratégia mais utilizada para o estudo das doenças complexas é a de associação, a qual permite a identificação de genes candidatos (Mitjans e Arias, 2012). O princípio base da estratégia de associação caso-controlo é o estudo das diferenças estatisticamente significativas entre dois grupos de indivíduos sem relação de parentesco, grupos caso e controlo.

### 1.2.1. Projeto do Genoma Humano, Projeto *HapMap* e Projeto dos 1000 Genomas

*The Human Genome Project* (HGP) foi fundado em 1990 e teve como objetivo o mapeamento completo do genoma humano e a compreensão da estrutura do DNA. Cerca de 99,9% do genoma humano é exatamente igual em todas as pessoas e mais de 50% do genoma é constituído por sequências repetidas que não codificam proteínas. Com este projeto concluiu-se que o genoma humano contém pelo menos 2,85 bilhões de nucleótidos e apenas 20 000 a 25 000 genes codificam proteínas (The International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Posteriormente em 2002, surge *The International HapMap Project*, com o objetivo de determinar as variantes comuns da sequência de DNA do genoma humano, pela caracterização das sequências variantes, das suas frequências e correlações entre elas, em amostras de quatro populações de África, Ásia e Europa (The International HapMap Consortium, 2003). Este projeto englobou três fases com as quais se conseguiu genotipar mais de 3,5 milhões de SNPs e incluir alguma informação de variantes raras do genoma (The International HapMap Consortium, 2003; 2005; 2007; The International HapMap 3 Consortium, 2010). Este projeto deu um contributo para a expansão das bases públicas de dados, servindo como um guia em direção a um mapa abrangente de toda a variação genética humana (The International HapMap 3 Consortium, 2010).

Na maioria dos cromossomas, há uma forte associação entre SNPs, o que leva a que estes alelos sejam herdados em conjunto numa frequência superior à que seria de esperar pelo acaso. A esta forte associação entre alelos em dois ou mais sítios no mesmo cromossoma chama-se *linkage de desequilibrium*. Desta forma, a escolha seletiva e correta de alguns desses SNPs permite caracterizar cada região e inferir a probabilidade do resto dos SNPs comuns dessa região. Estes SNPs representativos são denominados *tagSNPs* (Manolio e Collins, 2009). Através deles é possível identificar os haplótipos comuns na região (The International HapMap Consortium, 2003), ou seja, identificar os conjuntos de alelos que são herdados como uma unidade (Burmeister, 1999).

Com o intuito de reforçar a importância do estudo das variantes estruturais, como as inserções, deleções e CNVs, presentes em menos de 5 % da população, surge em 2008 um outro projeto, *The 1000 Genomes Project* (Manolio e Collins, 2009). O objetivo principal era caracterizar mais de 95% das variantes polimórficas de DNA, com frequência igual ou superior a 1%, em cada um dos grandes grupos populacionais,

Europa, Ásia Oriental e do Sul, África Ocidental e Américas (The 1000 Genomes Project Consortium, 2011). Com a informação obtida com o projeto dos 1000 Genomas, conseguiu-se dados suficientes para validar um mapa de haplótipos de 38 milhões de SNPs, 1,4 milhões de inserções curtas e deleções, e mais de 14 000 longas deleções (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012). Este projeto irá proporcionar uma melhor localização das variantes relacionadas com as doenças, contribuindo para uma melhor compreensão do papel da variação genética na história da humanidade, na evolução e na saúde (The 1000 Genomes Project Consortium, 2011).

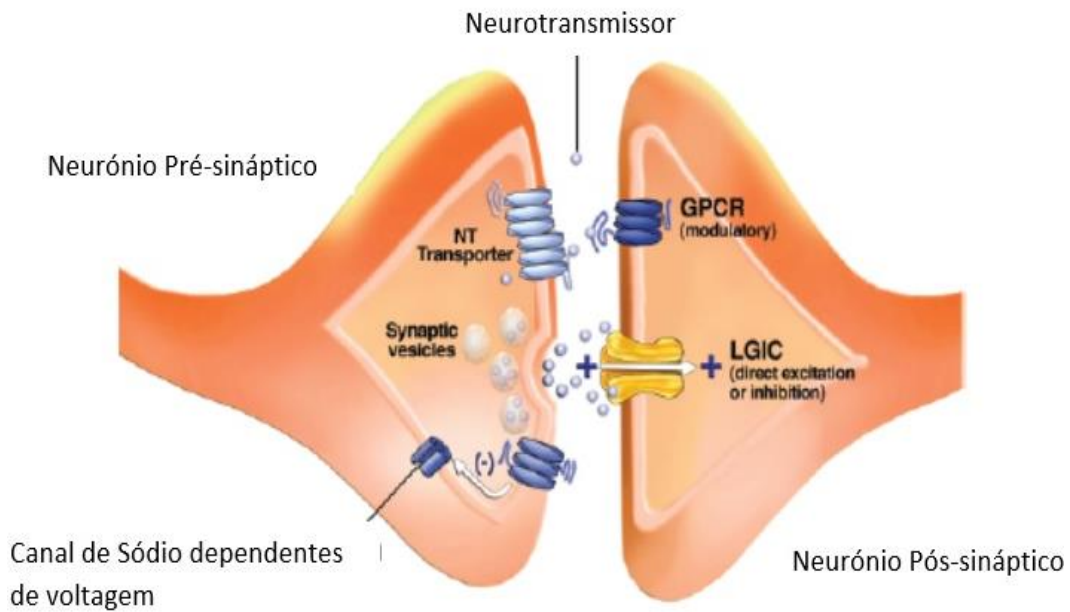
### **1.3. Sistema GABAérgico**

#### **1.3.1 Introdução ao sistema**

O cérebro humano contém cerca de 100 biliões de neurónios, sendo que cerca de 20-30% dos neurónios do Sistema Nervoso Central (SNC) são GABAérgicos (Carver e Reddy, 2013). A inibição GABAérgica ocorre a todos os níveis do SNC, incluindo hipotálamo, córtex cerebral, hipocampo e córtex cerebelar. O GABA (*gamma-aminobutyric acid*) é o maior neurotransmissor inibitório do SNC, sendo formado pela descarboxilação do glutamato através da ação da enzima GAD, descarboxilase do ácido glutâmico. Esta tem duas isoformas (GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>) e necessita de um cofator, o fosfato piridoxal que deriva da vitamina B<sub>6</sub> (D'Hulst *et al.*, 2009).

O GABA é principalmente sintetizado por interneurónios GABAérgicos e tem um papel essencial na regulação da excitabilidade e na plasticidade neuronal durante as fases de maturação do cérebro (Le Mangueresse e Monyer, 2013). É responsável pela ativação de três classes distintas de recetores, os GABA<sub>A</sub> (*gamma-aminobutyric acid A receptor*), os GABA<sub>B</sub> (*gamma-aminobutyric acid B receptor*), e os GABA<sub>C</sub> (*gamma-aminobutyric acid C receptor*). Estes últimos são formados por combinações de subunidades  $\rho 1$ - $\rho 3$ . Os recetores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> são ionotrópicos e os GABA<sub>B</sub> são metabotrópicos. Os recetores GABA<sub>B</sub> são recetores heterodiméricos acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein-coupled receptor*) e modulam canais de Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> (Bettler *et al.*, 2004).

Na figura 2 é possível observar-se o processo de comunicação sináptica através dos recetores ionotrópicos e metabotrópicos.



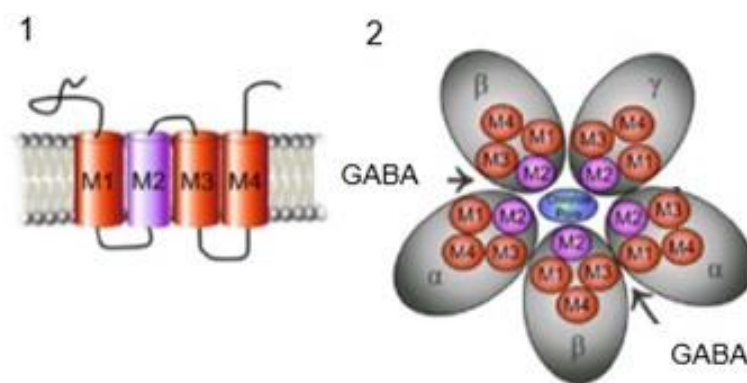
**Figura 2:** Sinapse mediada por receptores metabotrópicos, GPCR e receptores ionotrópicos, *Ligand Gated Ion Channel* (LGIC). Relativamente aos receptores GPCR, o processo designa-se de modulação devido à intervenção das proteínas G. No caso dos receptores ionotrópicos, o processo de comunicação é mediado diretamente pelos canais transmembranares. Imagem adaptada de Lovinger (2008).

Os receptores GABA<sub>A</sub> são proteínas transmembranares intrínsecas formadas por múltiplas subunidades, e fazem parte de uma superfamília pentamérica *cys-loop* denominada de *Ligand Gated Ion Channel* (LGIC) (Olsen e Sieghart, 2009). Estes receptores estão distribuídos por todas as regiões cerebrais, sendo os responsáveis pela mediação da maior parte das ações fisiológicas do GABA (Fritschy e Brüning, 2003).

A nível estrutural os receptores GABA<sub>A</sub> são constituídos por 5 subunidades proteicas, as quais são essenciais para a funcionalidade do canal de iões Cl<sup>-</sup>. No total existem 16 subunidades,  $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ;  $\beta_1$ - $\beta_3$ ;  $\gamma_1$ - $\gamma_3$ ;  $1\delta$ ;  $1\epsilon$ ;  $1\pi$  e  $1\theta$ , podendo haver uma enorme variedade de combinações entre elas (Barnard *et al.*, 1998). Estas subunidades são codificadas por genes diferentes, situados em cinco cromossomas, cromossoma 1, 4, 5, 15 e X (Bailey *et al.*, 1999; Darlison *et al.*, 2005). Aproximadamente 90% dos receptores GABA<sub>A</sub> são constituídos por duas subunidades  $\alpha$ , duas  $\beta$  e uma  $\gamma$  (Sieghart, 2006). Cerca de 60% de todos os receptores GABA<sub>A</sub> são formados pelas subunidades  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ ,

aproximadamente 15-20% têm a composição de  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$  e cerca de 10-15% apresentam a combinação  $\alpha 3\beta \chi 2$ . Em percentagem menor, 5%, encontram-se os recetores formados por  $\alpha 4\beta \chi$  ou  $\alpha 4\beta \chi \delta$  e em menos de 5% os recetores  $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$  (Möhler *et al.*, 2001; Rudolph e Knoflach, 2012).

Cada subunidade é formada por uma longa região hidrofílica no domínio N-terminal extracelular, seguida de 4  $\alpha$ -hélices transmembranares (M) com um grande *loop* intracelular entre M3 e M4 e no fim um pequeno domínio C-terminal extracelular, como evidenciado na figura 3 (Olsen e Sieghart, 2009).

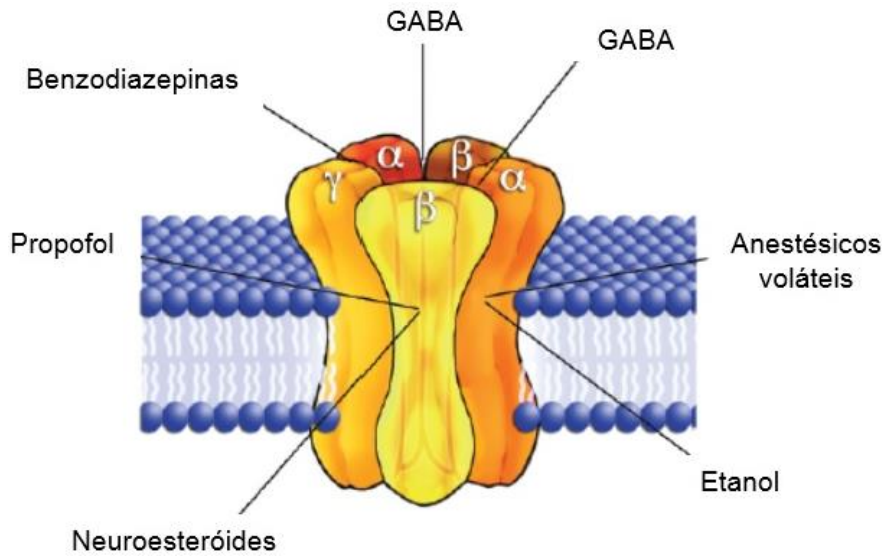


**Figura 3:** Estrutura do recetor GABA<sub>A</sub> e de cada subunidade. O esquema ilustra em 1 a estrutura de cada uma das subunidades do recetor, com 4  $\alpha$ -hélices transmembranares (M1, M2, M3 e M4), e em 2 a estrutura do recetor ionotrópico GABA<sub>A</sub> constituído, neste caso, por duas subunidades  $\alpha$ , duas  $\beta$  e uma  $\gamma$  ( $2\alpha 2\beta \gamma$ ). O local de ligação de GABA situa-se entre a subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Imagem adaptada de Carver e Reddy (2013).

A ligação de duas moléculas de GABA ao recetor GABA<sub>A</sub> altera a estrutura conformacional do canal, permitindo o fluxo de iões cloro, o que desencadeia a hiperpolarização do potencial da membrana da célula.

Os recetores GABA<sub>A</sub>, de acordo com a sua composição em subunidades proteicas, podem apresentar diferentes locais de ligação para substâncias específicas, tais como o sítio de ligação da picrotoxina/barbitúricos, das benzodiazepinas e dos esteroides, como se pode observar na figura 4 (Olsen e Sieghart, 2008). As benzodiazepinas e barbitúricos aumentam a frequência e a duração de abertura do canal de cloro, respetivamente. Por

outro lado, os neuroesteróides aumentam quer a frequência, quer a duração de abertura do canal, aumentando a inibição mediada pelo recetor GABA<sub>A</sub> (Carver e Reddy, 2013).



**Figura 4:** Estrutura do recetor GABA<sub>A</sub> e locais de ligação de diversas substâncias. Imagem adaptada de Lovinger (2008).

### 1.3.2 Hipótese GABAérgica na etiologia do suicídio

Os genes *GABRA1* (*GABA A receptor, alpha 1*), *GABRG2* (*GABA A receptor, gamma 2*) e *GABRB2* (*GABA A receptor, beta 2*) localizam-se no mesmo *cluster* na região cromossómica 5q32-q35 (Johnson *et al.*, 1992; Wilcox *et al.*, 1992; Whiting *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 1999) e codificam respetivamente a subunidade α1, γ2 e β2 do recetor GABA<sub>A</sub>. Estas subunidades encontram-se em todas as regiões cerebrais fazendo parte do subtipo de recetor GABA<sub>A</sub> mais abundante, α1β2γ2 (Whiting *et al.*, 2003; Tricavelli *et al.*, 2012). Estudos *Knockout* quer da subunidade α1, quer da β2 demonstram a perda de 50% dos recetores GABA<sub>A</sub> em cérebros de rato (Sur *et al.*, 2001).

Estudos *postmortem* revelaram uma diminuição da expressão de genes *GABRA1*, *GABRA3* (*GABA A receptor, alpha 3*), *GABRA4* (*GABA A receptor, alpha 4*) e *GABRD* (*GABA A receptor, delta*) nas regiões do córtex pré-frontal em vítimas de suicídio (Merali *et al.*, 2004). Além disso, em estudos de *microarrays* também se verificam alterações na expressão de genes do sistema GABAérgico, em áreas pré-frontais e límbicas de vítimas de suicídio (Choudary *et al.*, 2005; Sequeira *et al.*, 2007; 2009; Klempan *et al.*, 2009).

Com base nas evidências dos estudos referidos, considera-se que os genes *GABRA1*, *GABRG2* e *GABRB2* possam ser bons genes candidatos na etiologia do suicídio.

Os estudos genéticos que averiguam o papel dos genes do sistema GABAérgico na etiologia do comportamento suicida são escassos a nível mundial, existindo poucos estudos de associação caso-controlo (Baca-Garcia *et al.*, 2004; Wasserman *et al.*, 2007).

#### **1.4. Objetivo**

O objetivo deste estudo consiste em investigar o papel dos polimorfismos IVS10+15A>G, G3145A e C1412T dos genes *GABRA1*, *GABRG2*, *GABRB2* respetivamente, na etiologia do suicídio, em indivíduos da população portuguesa.



## **Capítulo 2- Metodología**

## 2. Metodologia

### 2.1. Amostra

No Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses foram recolhidas amostras de sangue de vítimas de suicídio e controlos no decorrer de autópsias médico-legais, consultando previamente o RENNDA (Registo Nacional de Não Dadores). A quantidade de sangue recolhida num tubo com anticoagulante EDTA (Etilenodiaminotetracético, Sigma) (BD Vacutainer® K2E) é cerca de 10 ml por punção venosa. O conjunto de amostras para a análise laboratorial é constituído por vítimas de suicídio e de controlo, de ambos os sexos com idades compreendidas entre 16 e 86 anos.

### 2.2. Extração do DNA genómico

Após a descoberta do DNA, várias técnicas de extração de DNA têm surgido (Carpí *et al.*, 2011) tais como, o método de extração orgânica através da utilização de fenol/clorofórmio, o método de extração em fase sólida e o método de *salting out*. Face às vantagens que este último apresenta tais como o fato de não se usarem solventes orgânicos (Clements *et al.*, 2008) foi selecionado para a extração de DNA do presente trabalho tendo como base o protocolo adaptado descrito por Miller *et al.* (1988). Inicialmente as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de falcon, onde ocorre a hemólise através da adição a cada amostra de 30 ml de uma solução de lise, RBC (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10mM, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 1 mM, a pH=7,4). As amostras foram homogeneizadas e colocadas em gelo, cerca de 15-20 minutos e centrifugadas, numa centrífuga refrigerada (Hettich® Zentrifugen, Rotenta 460R) num programa com as seguintes condições, 15 minutos, 4 °C e 2500 rpm. Após terminada a centrifugação retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se novamente RBC (desta vez 20 ml), ressuspendeu-se o pellet, equilibrou-se novamente as amostras e efetuou-se uma segunda centrifugação com as mesmas condições anteriormente descritas.

Posteriormente, adicionaram-se 4 ml de NLB (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 2 mM, pH=8), e colocou-se 250 µL de SDS (Bio Rad®). O NLB é responsável pela lise dos núcleos dos glóbulos brancos e assim, pela libertação do DNA. Por último, adicionaram-se 30 µL de proteinase K (20mg/µl) (Roche® Applied Science).

As amostras são depois deixadas durante 1 a 2 dias na incubadora (Incubator, SI60D, Bibby-Stuart Scientific) a 37 °C, com agitação constante.

Numa segunda fase do protocolo de extração, adicionou-se 3 ml de uma solução saturada NaCl (6M, Sigma), que irá precipitar as proteínas, e procedeu-se a uma centrifugação com as seguintes condições, 3750 rpm, 25 °C, 30 minutos. Após a rejeição do pellet, adicionou-se cerca de duas vezes o volume de etanol 100% para precipitação de DNA. Seguidamente, procedeu-se à recolha do DNA com uma ansa estéril e à lavagem em etanol a 70%. Ao DNA adicionou-se tampão Tris-EDTA (TE) para conservação e armazenamento a 4 °C (Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 1 mM, pH= 8,0). Por fim, incubou-se o DNA a 37 °C com agitação.

### 2.3. Quantificação e determinação do grau de pureza da amostra de DNA

A quantificação de DNA e determinação da pureza da amostra foi efetuada por espectrofotometria (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad®). Através das leituras das absorvâncias a 260 nm e 280 nm é calculada a concentração do DNA utilizando a fórmula seguinte e a constante da dupla hélice (50 µg/mL):

$$[\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{L} = \text{DO}_{260} \times 0,050 \times \text{Fator de diluição}$$

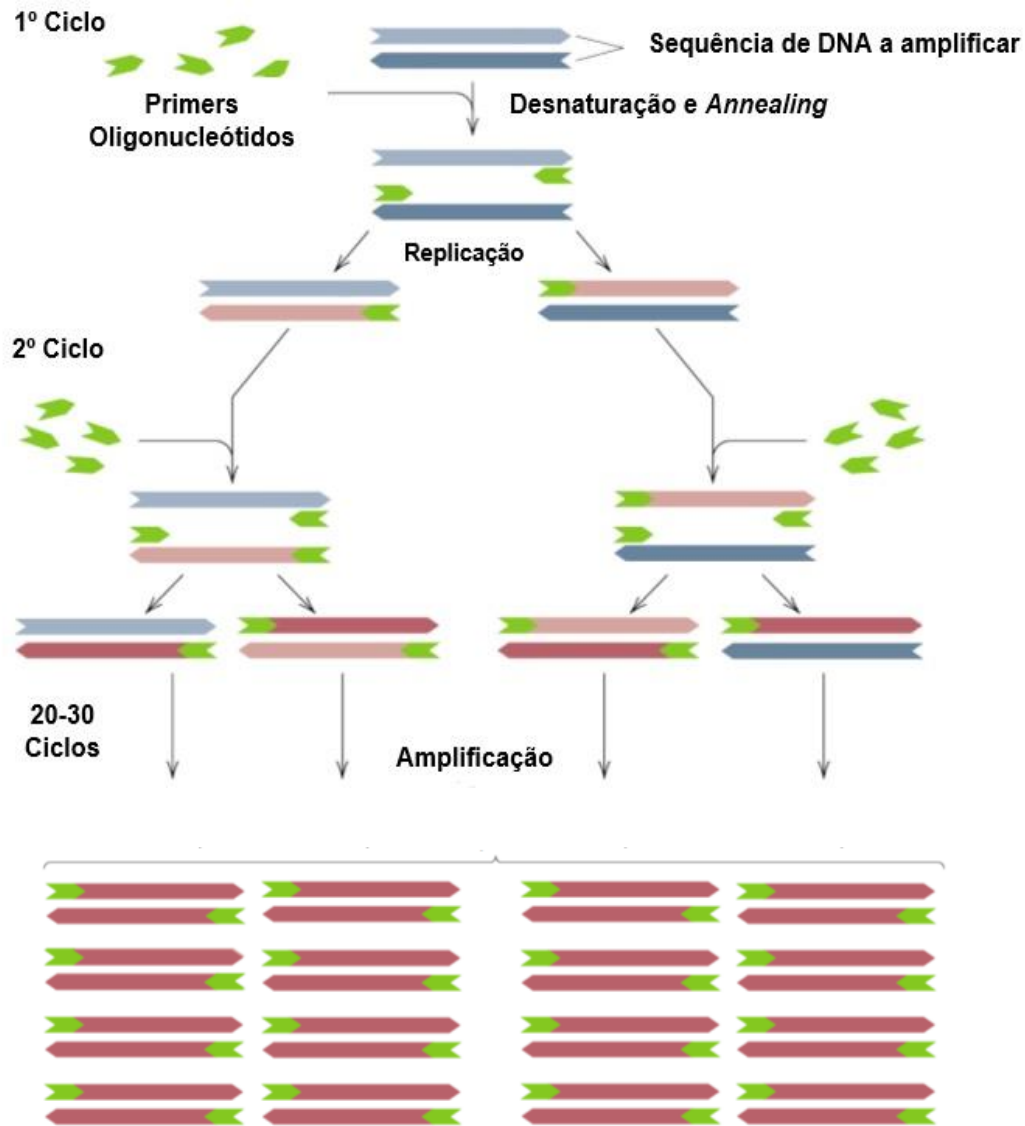
A pureza da amostra foi determinada através da razão ( $A_{260}/A_{280}$ ) e para a amostra estar com elevado grau de pureza, o valor das absorvâncias tem de estar compreendido entre 1,8 e 2. Quando há contaminação por proteínas, a razão entre as absorvâncias tende a ser significativamente menor (<1,8), e no caso de contaminação por RNA, este valor tende a ser maior (>2,0) (Ghatak *et al.*, 2013).

### 2.4. Amplificação do DNA genómico

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite a amplificação de sequências de DNA, obtendo-se um grande número de cópias de DNA com a sequência desejada. Foi criada em 1984 por Kary Mullis, o qual acabou por receber, devido a esta descoberta, o prémio Nobel em 1993 (Bartlett e Stirling, 2003; Joshi e Deshpande, 2010).

A amplificação por PCR é um processo exponencial, sendo o número de cópias de DNA obtido a partir de  $2^n$ , onde o n corresponde ao número de ciclos (Saiki *et al.*, 1988). É um processo bastante sensível, rápido e de alta especificidade, sendo facilmente reproduzível, desde que se tenha em consideração certas condições de temperatura, num determinado período de tempo. Para a correta realização da PCR é necessário que estejam presentes certos componentes: a amostra de DNA *template*, os desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), a enzima termoestável, *Taq DNA polimerase*, o cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), o tampão da *Taq polimerase* ou buffer (Tris-Hcl 10 mM, Kcl 50 mM, pH=8,3) e os dois *primers* ou iniciadores, que delimitam a região-alvo de amplificação e são complementares a esta. Os *primers* são pequenas sequências conhecidas de DNA que apresentam uma extensão variável de 15 a 30 pares de bases (oligonucleótidos sintéticos de cadeia simples). Estes emparelham com a extremidade 3' de cada uma das cadeias a amplificar e quando em excesso podem induzir o aparecimento de produtos inespecíficos e a formação de dímeros de *primers* (Sambrook e Russel, 2001; Bartlett e Stirling, 2003; Lorenz, 2012).

A técnica de PCR consiste em ciclos repetitivos de desnaturação, *annealing* e extensão, num total de 30 a 40 ciclos que são programados num termociclador. A fase inicial de desnaturação com uma temperatura de 94/95°C permite a separação das cadeias de DNA através da quebra das pontes de hidrogénio, pelo que o DNA perde a estrutura de dupla hélice. Na fase de *annealing* ocorre uma descida da temperatura (50-60°C) e a ligação dos *primers* por complementaridade de bases à região da sequência de DNA *template*. Por último, na fase de extensão, a temperatura é aumentada para cerca de 72°C, e a *Taq polimerase* posiciona-se junto dos *primers*. É a partir destes oligonucleótidos que a *Taq polimerase* adiciona os dNTPs que irão constituir as novas cadeias de DNA (Sambrook e Russel, 2001) (figura 5).



**Figura 5:** Esquema representativo das três fases do processo de amplificação de DNA, com um total de 20 a 30 ciclos. Imagem adaptada de Hartl e Jones (2001).

Todos os componentes da técnica de PCR podem interferir com a eficiência do processo, contudo a temperatura de *annealing* e a concentração de magnésio são os fatores mais importantes (Lorenz, 2012). A temperatura de *annealing* é específica para cada par de *primers*, dependendo quer da sequência de nucleótidos destes, quer do seu tamanho (Sambrook e Russel, 2001). Em relação ao magnésio, este é um cofator imprescindível para a ação da *Taq polimerase*, sendo fundamental para a especificidade e quantidade de produto final de amplificação.

## 2.5. Digestão do DNA genómico e enzimas de restrição

A descoberta em 1970, por Smith e Wilcox, de específicas enzimas de restrição, endonucleases, que clivam o DNA em locais específicos, tornou possível a isolamento de fragmentos de DNA de diversos tamanhos (Mullis *et al.*, 1986). As enzimas de restrição eram inicialmente isoladas de bactérias, que as produziam como um mecanismo de proteção contra DNA estranho. A maioria das enzimas de restrição reconhece apenas uma pequena sequência de pares de bases, usualmente 4 a 6 pares de nucleótidos, e liga-se ao DNA clivando cada uma das cadeias. A genotipagem recorrendo à metodologia de PCR-RFLP baseia-se no fato das enzimas reconhecerem locais específicos na sequência de DNA (palíndromas) e clivarem ou não, a sequência consoante o alelo presente (Hartl e Jones, 2001).

## 2.6. Eletroforese

A técnica de eletroforese é um processo simples e eficiente para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA. A separação ocorre de acordo com a carga elétrica e o peso molecular das moléculas (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA tem carga negativa, devido ao grupo fosfato, pelo que mediante a aplicação de um campo elétrico, as moléculas de DNA migram para o ânodo, o qual está carregado positivamente. Desta forma, as bandas de maior peso molecular ficam mais próximas do cátodo (pólo negativo) devido à sua migração mais lenta, e as de menor peso molecular mais afastadas deste (Hartl e Jones, 2001). Na preparação do gel de agarose utiliza-se agarose e uma solução tampão de TBE 1X (Tris-borato-EDTA), a qual apresenta força iónica e pH constantes (Sambrook *et al.*, 1989). Além disso, recorreu-se à utilização de corantes fluorescentes, brometo de etídio (10 mg/ml, Invitrogen™). O brometo de etídio é uma substância cancerígena e altamente tóxica, já que se intercala com as bases de DNA de cadeia dupla (Santella *et al.*, 2006). Esta substância emite fluorescência vermelho-alaranjada quando ligada às bases do DNA, permitindo a visualização e deteção de quantidades de DNA muito pequenas (Sambrook e Russel, 2001). Diversas variáveis podem afetar a migração das amostras de DNA através do gel de agarose nomeadamente, a concentração de agarose, o tamanho dos fragmentos, a própria presença de brometo de etídio no gel, o buffer da eletroforese e ainda, a intensidade da corrente (Sambrook e Russel, 2001).

## 2.7. Genotipagem

### 2.7.1 Polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1*

O polimorfismo IVS10+15A>G localizado no último intrão do gene *GABRA1*, no nucleótido 15, consiste na troca de uma adenina por uma guanina. Este polimorfismo foi estudado pela técnica de PCR-RFLP, segundo as condições propostas por Loh *et al.* (2000), com ligeiras alterações. As condições da PCR para um volume total de 25  $\mu$ L, contendo 25 ng de DNA genómico, foram as seguintes: buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPs 0,125 mM, 0,1  $\mu$ M de *primers* e 0,033 U/ $\mu$ L de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen™). Após uma desnaturação inicial a 95°C durante 3', procedeu-se a um total de 40 ciclos, com desnaturação a 95°C (20"), emparelhamento dos *primers* (*annealing*) a 57°C (30") e extensão das cadeias a 72°C (40"). Por fim, realiza-se uma extensão final a uma temperatura de 72 °C durante 10'.

O produto de amplificação com 165 pb foi então digerido com a enzima de restrição *AvaII* (New England Biolabs®), durante uma noite a 37 °C, e a separação dos fragmentos foi realizada em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1X (Trizma base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, Na<sub>2</sub> EDTA.2H<sub>2</sub>O 2 mM, pH=8). A visualização dos fragmentos de digestão fez-se com luz UV no Gel DOC (BIO-RAD®), utilizando o marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 pb DNA ladder* (Thermo Scientific). Na presença de G em vez de A, a enzima *Avall* corta a sequência em dois fragmentos, um de 141 pb e o outro de 24 pb. Na presença de A não atua, pelo que o fragmento apresenta 165 pb.

### 2.7.2 Polimorfismo G3145A do gene *GABRG2*

No gene *GABRG2*, a variante genética G3145A localizada no intrão 7 consiste numa substituição de uma guanina por uma adenina, e foi estudada tendo como base a técnica adaptada de Loh *et al.* (1999). A amplificação decorreu num volume total de 25  $\mu$ L, contendo 150 ng de DNA genómico, buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPs 0,160 mM, 0,5  $\mu$ M de *primers*, e 0,04 U/ $\mu$ L de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen™). Depois da desnaturação inicial do DNA genómico a 95°C durante 5', procedeu-se a um total de 30 ciclos, englobando cada um destes, uma fase de desnaturação a 95°C (30"), uma de

emparelhamento dos *primers* (*annealing*) a 52°C (30") e uma de extensão a 72°C (40"). Por fim, as amostras foram submetidas a uma extensão final a uma temperatura de 72 °C durante 7'.

O produto de amplificação de 287 pb foi digerido com a enzima de restrição *NciI* (New England Biolabs®) durante uma noite a 37 °C, e a separação dos fragmentos ocorreu por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão TBE 1X (Trizma base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, Na<sub>2</sub> EDTA.2H<sub>2</sub>O 2 mM, pH=8). Os fragmentos de digestão foram visualizados com luz UV no Gel DOC (BIO-RAD®), utilizando o marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 pb DNA ladder* (Thermo Scientific). A troca do nucleótido na posição 3145 origina um local de restrição para a enzima *NciI*. Na presença de A resulta um único fragmento de restrição com 287 pb, e na presença de G resultam dois fragmentos, 263 pb e 24 pb.

### 2.7.3 Polimorfismo C1412T do gene *GABRB2*

O polimorfismo C1412T localiza-se na posição 1412 no último exão do gene *GABRB2*, e a substituição de C→T origina um polimorfismo silencioso ou sinónimo (Ala→Ala). Para a amplificação do DNA seguiu-se um protocolo adaptado de Loh *et al.* (1999) e para um volume total de reação de 25 µL adicionaram-se 100 ng de DNA genómico, buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,67 mM, dNTPs 0,160 mM, 0,3 µM de cada primer e 0,04 U/µL de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen™). Depois da desnaturação inicial do DNA genómico a 95°C durante 5', procedeu-se a um total de 40 ciclos, com desnaturação 95°C (30"), emparelhamento dos *primers* a 57°C (30") e extensão a 72°C (40"). A extensão final das cadeias foi realizada a uma temperatura de 72 °C, durante 4'.

Posteriormente, procedeu-se à digestão do produto de amplificação de 253 pb com a enzima de restrição *BanI* (New England Biolabs®), durante uma noite a 37 °C. A separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose a 3,5% ocorreu em tampão TBE 1X (Trizma base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, Na<sub>2</sub> EDTA.2H<sub>2</sub>O 2 mM, pH=8) e a visualização dos fragmentos de digestão fez-se com luz UV no Gel DOC (BIO-RAD®), utilizando o marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 pb DNA ladder* (Thermo Scientific). Se o nucleótido na posição 1412 é um T, o fragmento de restrição obtido apresenta 253 pb, no caso de ser um C resultam dois fragmentos, 229 pb e 24 pb.



## 2.8. Análise estatística

A nível estatístico realizou-se o teste do  $X^2$  através da fórmula a seguir representada, na qual a frequência de casos observados e esperados se representa por O e E, respetivamente (Pasternak, 2005).

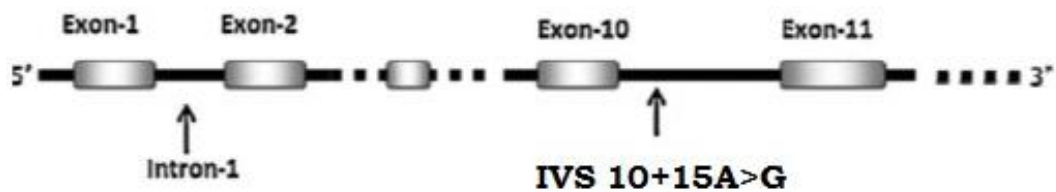
$$X^2 = \sum ((O-E)^2) / E$$

## **Capítulo 3 – Resultados e Discussão**

### 3. Resultados e Discussão

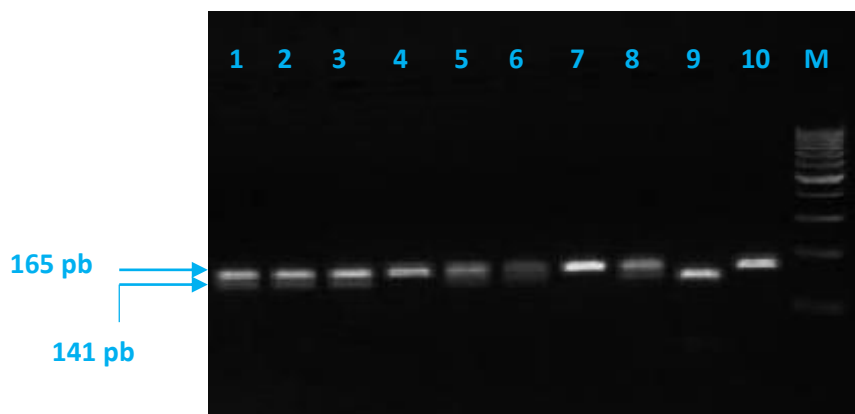
#### 3.1. Gene *GABRA1*- Polimorfismo IVS10+15A>G

A estrutura do gene *GABRA1* e o polimorfismo IVS10+15A>G estão representados na figura 6.



**Figura 6:** Imagem representativa do gene *GABRA1* e localização do polimorfismo IVS10+15A>G. Adaptada de Kumari *et al.* (2010).

O produto de amplificação do gene *GABRA1* apresenta 165 pb. Após a amplificação, procedeu-se à digestão do material genómico com a enzima *Avall* resultando dois fragmentos na presença do alelo G, com 141 pb e 24 pb. Na presença de A obtém-se apenas o fragmento de 165 pb (figura 7).



**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos de digestão com a enzima *Avall* do polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1*. O fragmento de DNA amplificado na PCR com 165 pb foi digerido, resultando

fragmentos de restrição de tamanhos 165 pb e 141 pb + 24 pb. Legenda da figura: heterozigóticos AG com bandas de 165 pb, 141 pb e 24 pb (1,2,3,5,6,8); homozigótico GG com bandas de 141 pb e 24 pb (9); homozigóticos AA com bandas de 165 pb (4,7,10) e (M) marcador de peso molecular *Gene Ruler<sup>TM</sup> 100pb DNA ladder* (Thermo Scientific).

Com o intuito de avaliar a existência ou não de associação do polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1* com o suicídio, procedeu-se à análise estatística através do teste do  $\chi^2$  (tabela I).

**Tabela I:** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1*, em amostras de vítimas de suicídio e controlos de indivíduos da população portuguesa.

|               |    | Suicídio          | Controlo           | Análise estatística                        |
|---------------|----|-------------------|--------------------|--|
| Genótipos (%) | AA | <b>51 (37,8%)</b> | <b>68 (42,5%)</b>  | $\chi^2= 0,686$ ; df=2<br>p= <b>0,710</b>  |
|               | AG | <b>68 (50,4%)</b> | <b>74 (46,3%)</b>  |  |
|               | GG | <b>16 (11,9%)</b> | <b>18 (11,3%)</b>  |  |
| Alelos (%)    | A  | <b>170 (63%)</b>  | <b>210 (65,6%)</b> | $\chi^2= 0,344$ ; df= 1<br>p= <b>0,558</b> |
|               | G  | <b>100 (37%)</b>  | <b>110 (34,4%)</b> |  |

Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos de vítimas de suicídio e controlo, nos genótipos ( $\chi^2= 0,686$ ; df= 2; p= 0,710) e nos alelos ( $\chi^2= 0,344$ ; df= 1; p= 0,558). Como tal, com base na amostra de indivíduos da população portuguesa utilizada, não se verificou associação entre o polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1* e o suicídio (p>0,05).

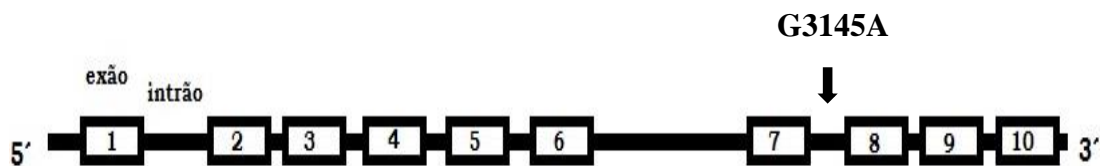
Não existem até ao momento estudos de associação que relacionem o polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1* com o suicídio a nível mundial. Nos estudos de Merali *et al.* (2004) e Sequeira *et al.* (2007) verificam-se alterações da expressão do gene *GABRA1* em vítimas de suicídio. Em estudos *knockout* do gene *GABRA1* em modelos animais demonstra-se a alteração da expressão de mRNA de outras

subunidades do recetor GABA<sub>A</sub>, como o aumento de  $\alpha 2$  e a diminuição de  $\gamma 2$  (Kralic *et al.*, 2002).

Novos estudos devem ser realizados para clarificar o papel do gene *GABRA1* na etiologia do suicídio.

### 3.2. Gene *GABRG2* – Polimorfismo G3145A

Na figura 8 encontra-se representado a estrutura do gene *GABRG2* com o polimorfismo G3145A.



**Figura 8:** Representação esquemática do gene *GABRG2* com os exões e os intrões. Imagem adaptada de Zai *et al.* (2009).

Na investigação do polimorfismo G3145A do gene *GABRG2* conforme o descrito em 2.7.2. do Capítulo da Metodologia, obteve-se um produto de amplificação com 287 pb. Seguidamente, o produto amplificado foi digerido com a enzima de restrição *NciI* obtendo-se os fragmentos de 263 pb e 24 pb, na presença de um alelo G. Na presença do alelo A o fragmento originário apresenta 287 pb (figura 9).



**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de digestão com a enzima *NciI* do polimorfismo G3145A do gene *GABRG2*. O fragmento de DNA amplificado na PCR, com 287 pb, foi digerido pela enzima *NciI*, resultando os fragmentos de restrição de tamanhos 287 pb e 263 pb + 24 pb. Legenda da figura: heterozigóticos GA com bandas de 287 pb, 263 pb e 24 pb

(2,6,8,11,13,14,15,17,19); homozigóticos GG com bandas de 263 pb e 24 pb (1,4,9,16); homozigóticos AA com bandas de 287 pb (3,5,7,10,12,18) e (M) marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100pb DNA ladder* (Thermo Scientific).

Os resultados obtidos relativamente ao polimorfismo G3145A do gene *GABRG2* estão representados na tabela II.

**Tabela II:** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo G3145A do gene *GABRG2*, em amostras de vítimas de suicídio e controlos de indivíduos da população portuguesa

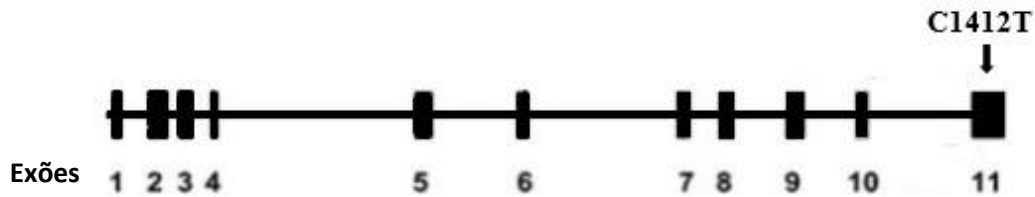
|               |    | Suicídio           | Controlo           | Análise estatística                 |
|---------------|----|--------------------|--------------------|-------------------------------------|
| Genótipos (%) | GG | <b>54 (30,2%)</b>  | <b>65 (35,1%)</b>  | $\chi^2= 3,586$ ; df= 2<br>p= 0,166 |
|               | GA | <b>93 (52%)</b>    | <b>78 (42,2%)</b>  |                                     |
|               | AA | <b>32 (17,9%)</b>  | <b>42 (22,7%)</b>  |                                     |
| Alelos (%)    | G  | <b>201 (56,1%)</b> | <b>208 (56,2%)</b> | $\chi^2= 0,003$ ; df= 1<br>p= 0,956 |
|               | A  | <b>157 (43,9%)</b> | <b>162 (43,8%)</b> |                                     |

De acordo com os dados da literatura, o presente estudo é o primeiro a investigar o polimorfismo G3145A do gene *GABRG2* no suicídio, na população portuguesa. De acordo com os dados fornecidos na tabela, não se verificaram diferenças significativas entre o grupo de vítimas de suicídio e o grupo controlo, quer para a análise das frequências genotípicas ( $\chi^2= 3,586$ ; df= 2; p= 0,166), quer para as frequências alélicas ( $\chi^2= 0,003$ ; df= 1; p= 0,956). Desta forma, não existe associação entre o polimorfismo G3145A do gene *GABRG2* e o suicídio (p>0,05), na amostra de indivíduos da população portuguesa.

No estudo de Klempan *et al.* (2009) verificaram-se alterações na expressão do gene *GABRG2* em vítimas de suicídio com depressão *major*. Assim, o papel do gene *GABRG2* na etiologia do suicídio deve continuar a ser investigado, e novos polimorfismos devem ser incluídos em estudos futuros.

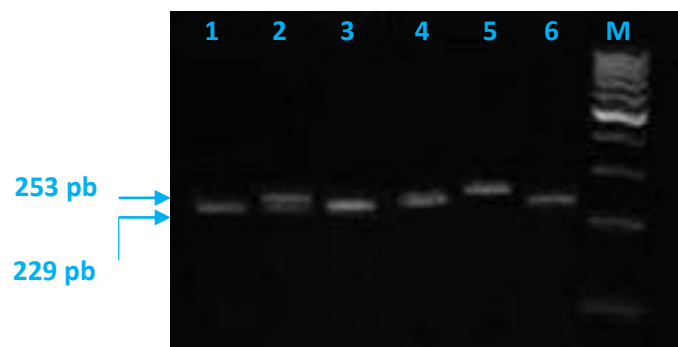
### 3.3. Gene *GABRB2*- Polimorfismo C1412T

A estrutura do gene *GABRB2* e a localização do polimorfismo C1412T está esquematizada na figura 10. O produto de amplificação com 253 pb foi digerido com o recurso à enzima *BanI*, estando os fragmentos de restrição obtidos esquematizados na figura 11.



**Figura 10:** Diagrama representativo do gene *GABRB2*. Imagem adaptada de Zhao *et al.* (2006), o gene *GABRB2* apresenta 11 exões e 10 intrões.

Na presença de uma timina, o fragmento amplificado permanece com 253 pb. Contudo, se o nucleótido presente na posição 1412 é uma citosina, resultam dois fragmentos, 229 pb e 24 pb.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose a 3,5% dos produtos de digestão com a enzima *BanI* do polimorfismo C1412T da região codificante do gene *GABRB2*. O fragmento de DNA amplificado na PCR, com 253 pb, foi digerido com a enzima *BanI*, resultando fragmentos de restrição de tamanhos 253 pb, 229 pb + 24 pb. Legenda da figura: heterozigótico CT com 253 pb, 229 pb e 24 pb (2); homozigóticos CC com 229 pb e 24 pb (1,3, 4, 6); homozigótico

TT com 253 pb (5) e (M) marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100pb DNA ladder* (Thermo Scientific).

A tabela III representa a distribuição genotípica e alélica do polimorfismo do gene *GABRB2* e a respetiva análise estatística.

**Tabela III:** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo C1412T do gene *GABRB2*, em amostras de vítimas de suicídio e controlos de indivíduos da população portuguesa.

|               |    | Suicídio          | Controlo           | Análise estatística                    |
|---------------|----|-------------------|--------------------|--|
| Genótipos (%) | CC | <b>143 (78%)</b>  | <b>146 (82%)</b>   | $\chi^2= 1,975$ ; $df=2$<br>$p= 0,372$ |
|               | CT | <b>36 (19,7%)</b> | <b>26 (14,6%)</b>  |  |
|               | TT | <b>4 (2,2%)</b>   | <b>6 (3,4%)</b>    |  |
| Alelos (%)    | C  | <b>322 (88%)</b>  | <b>318 (89,3%)</b> | $\chi^2= 0,205$ ; $df=1$<br>$p= 0,650$ |
|               | T  | <b>44 (12%)</b>   | <b>38 (10,7%)</b>  |  |

De acordo com os resultados representados, relativamente à análise das frequências genotípicas não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados ( $\chi^2= 1,975$ ;  $df= 2$ ;  $p= 0,372$ ). Em relação às frequências alélicas também não se verificou diferenças significativas ( $\chi^2=0,205$ ;  $df= 1$ ;  $p= 0,650$ ). Assim sendo, não existe associação entre o polimorfismo C1412T do gene *GABRB2* e o suicídio ( $p>0,05$ ). A nível mundial são inexistentes os estudos genéticos realizados com o polimorfismo C1412T do gene *GABRB2* no suicídio. No entanto, os estudos de *microarrays* fornecem fortes evidências sobre alterações na expressão de genes do sistema GABAérgico em indivíduos vítimas de suicídio (Merali *et al.*, 2004; Choudary *et al.*, 2005; Sequeira *et al.*, 2007; 2009; Klempan *et al.*, 2009). Assim, o estudo do envolvimento do gene *GABRB2* no suicídio deve continuar a ser investigado.



## **Capítulo 4 – Conclusão**

#### **4. Conclusão**

O estudo do polimorfismo IVS10+15A>G do gene *GABRA1* não revelou associação com o suicídio.

Relativamente ao polimorfismo G3145A do gene *GABRG2*, não se verificou associação entre este e o suicídio.

Não existe associação entre o polimorfismo C1412T do gene *GABRB2* e o suicídio.

## **Capítulo 5 – Perspetivas Futuras**

## 5. Perspetivas futuras

A investigação do papel dos genes *GABRA1*, *GABRG2* e *GABRB2* do sistema GABAérgico na etiologia do suicídio deve prosseguir em estudos futuros, utilizando também a análise de haplótipos. Efetuar também a análise de género e método de suicídio utilizado, com os polimorfismos IVS10+15A>G, G3145A e C1412T dos genes *GABRA1*, *GABRG2* e *GABRB2*, respetivamente. Seria também vantajoso o estudo do gene *GABRA6* situado no mesmo *cluster* do cromossoma 5q dos genes investigados neste estudo.

## **Capítulo 6 -Referências Bibliográficas**

## 6. Referências Bibliográficas

- Ajdacic-gross, V., Weiss, M. G., Ring, M., Hepp, U., Bopp, M., Gutzwiller, F. & Rössler, W. (2008). Methods of suicide: international suicide patterns derived from the WHO mortality database. *Bulletin of the World Health Organization*, 86:726-732.
- Arsenault -Lapierre, G., Kim, C. & Turecki, G. (2004). Psychiatric diagnoses in 3275 suicides: a meta-analysis. *BioMed Central Psychiatry*, 4: 37.
- Baca-Garcia, E., Vaquero, C., Diaz-Sastre, C., Jimenez-Treviño, L., Saiz-Ruiz, J., Fernández-Piqueras, J., & de Leon, J. (2004). Lack of association between polymorphic variations in the alpha 3 subunit GABA receptor gene (GABRA3) and suicide attempts. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28: 409–12.
- Bailey, M. E. S., Matthews, D. A., Riley, B. P., Albrecht, B. E., Kostrzewa, M., Hicks, A. A., Harris, R., Müller, U., Darlison, M. G. & Johnson, K. J. (1999). Genomic mapping and evolution of human GABA<sub>A</sub> receptor subunit gene clusters. *Mammalian Genome*, 10: 839–43.
- Barnard, E A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Möhler, H., Sieghart, W. Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N. & Langer, S. Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid<sub>A</sub> Receptors: Classification on the Basis of Subunit Structure and Receptor Function. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 50: 291–313.
- Bartlett, J. M. S. & Stirling D. (2003). “A Short History of the Polymerase Chain Reaction” in Bartlett e Stirling, *Methods in Molecular Biology. PCR Protocols*. Second edition. Human Press.
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. & Gassmann, M. (2004). Molecular Structure and Physiological Functions of GABA<sub>B</sub> Receptors. *Physiological reviews*, 84: 835–67.
- Brent D. A. & Melhem. N. (2008). Familial Transmission of Suicidal Behavior. *Psychiatric Clinics of North America*, 31(2): 157–177.
- Brezo, J, Paris, J. & Turecki, G. (2006). Personality traits as correlates of suicidal ideation, suicide attempts, and suicide completions: a systematic review. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 113: 180–206.

- Brezo, J., Paris, J., Hébert, M., Vitaro, F., Tremblay, R. & Turecki, G. (2008). Broad and narrow personality traits as markers of one-time and repeated suicide attempts: A population-based study. *BioMed Central Psychiatry*, 8:1-11.
- Brodsky, B. S., Mann, J. J., Stanley, B., Tin, A., Oquendo, M., Birmaher, B., Greenhill, L., Kolko, D., Zelazny, J., Burke, K. A., Melhem, N. & Brent, D. (2008). Familial Transmission of Suicidal Behavior: Factors Mediating the Relationship Between Childhood Abuse and Offspring Suicide Attempts. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 69(4): 584–596.
- Burmeister, M. (1999). Complex Genetics and Implications for Psychiatry: Basic Concepts in the Study of Diseases with Complex Genetics. *Society of Biological Psychiatry*, 45:522-532.
- Burton, P. R., Tobin, M. D. & Hopper, J. L. (2005). Genetic Epidemiology 1, Key concepts in genetic epidemiology, *Lancet*, 366: 941–951.
- Carpí, F. M., Di Pietro, F., Vincenzetti, S., Mignini, F. & Napolioni, V. (2011). Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 5(1): 1–7.
- Carver, C. M. & Reddy, D. S. (2013). Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology*, 1-38.
- Choudary, P. V, Molnar, M., Evans, S. J., Tomita, H., Li, J. Z., Vawter, M. P., Mayers, R. M., Bunney, W. E., Akil, H. Watson, S. J. & Jones, E. G. (2005). Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43): 15653–8.
- Clements, D. N., Wood, S., Carter, S. D. & Ollier, W. E. R. (2008). Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. *Research in veterinary science*, 85(1): 74–9.
- Darlison, M. G., Pahal, I. & Thode, C. (2005). Consequences of the evolution of the GABA<sub>A</sub> receptor gene family. *Cellular and molecular neurobiology*, 25(3/4): 607–24.
- D’Hulst, C., Atack, J. R. & Kooy, R. F. (2009). The complexity of the GABA<sub>A</sub> receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug discovery today*, 14(17-18): 866–75.

- Dias, D., Mendonça, M. C., Corte Real, F., Vieira, D. N. & Teixeira, H. M. (2014). Suicides in the Centre of Portugal : Seven years analysis. *Forensic Science International*, 234: 22–28.
- Direção Geral de Saúde (2013) a. Plano Nacional de Prevenção do Suicídio 2013/2017. Disponível em: <http://www.dgs.pt/>
- Direção Geral de Saúde (2013) b. Portugal, Saúde Mental em números-2013. Disponível em: <http://www.dgs.pt/>.
- Ellsworth, D. L. & Manolio, T. A. (1999). The Emerging Importance of Genetics in Epidemiologic Research. I. Basic Concepts in Human Genetics and Laboratory Technology. 9:1-16.
- Eurostat. (2013) Estatísticas sobre as causas de morte. Disponível em ([http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics\\_explained/index.php/Causes\\_of\\_death\\_statistics/pt](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Causes_of_death_statistics/pt)).
- Fritschy, J-M. & Brünig, I. (2003). Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 98(3): 299–323.
- Fleischmann, A., Bertolote, J. M., Belfer, M. & Beautrais, A. (2005). Completed suicide and Psychiatric Diagnoses in Young People: A Critical Examination of the Evidence. *American Journal of Orthopsychiatry*, 75 (4):676-683.
- Ghatak, S., Muthukumaran, R. B. & Nachimuthu, S. K. (2013). A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 24: 224–31.
- Hartl, D. L. & Jones E. W. (2001). “DNA Structure and DNA Manipulation” in Jones and Bartlett, *Genetics, Analysis of Genes and Genomes*. 5ª edição.
- Healy, D. G. (2006). Case-control studies in the genomic era : a clinician’s guide. *Lancet Neurol*, 5: 701-07.
- Johnson, K. J., Sander, T., Hicks, A. A., Marle, A. V., Janz, D., Mullan, M. J., Riley, B. P. & Darlison, M. G. (1992). Confirmation of the Localization of the Human GABA<sub>A</sub> Receptor  $\alpha$ 1-Subunit Gene (GABRA1) to Distal 5q by Linkage Analysis. *Genomics*, 14: 745–748.
- Joshi, M. & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 5: 81-97.



- Kendler, K. S. (2010). Genetic and environmental pathways to suicidal behavior : Reflections of a genetic epidemiologist. *European Psychiatry*, 25(5): 300–303.
- Klempner, T. A., Sequeira, A., Canetti, L., Lalovic, A., Ernst, C., French-Mullen, J. & Turecki, G. (2009). Altered expression of genes involved in ATP biosynthesis and GABAergic neurotransmission in the ventral prefrontal cortex of suicides with and without major depression. *Molecular Psychiatry*, 14: 175–189.
- Kralic, J. E., Korpi, E. R., Buckley, T. K., Homanics, G. E. & Morrow, A. L. (2002). Molecular and Pharmacological Characterization of GABA<sub>A</sub> Receptor  $\alpha 1$  Subunit Knockout Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3): 1037–1045.
- Kumari, R., Lakhan, R., Kalita, J., Misra, U. K. & Mittal, B. (2010). Association of alpha subunit of GABA<sub>A</sub> receptor subtype gene polymorphisms with epilepsy susceptibility and drug resistance in north Indian population. *Seizure: European Journal of Epilepsy*, 19(4), 237–241.
- Labonte, B. & Turecki, G. (2010). The Epigenetics of Suicide : Explaining the Biological Effects of Early Life Environmental Adversity. *Archives of Suicide Research*, 14(4): 291-310.
- Le Magueresse, C. & Monyer, H. (2013). GABAergic interneurons shape the Functional Maturation of the Cortex. *Neuron*, 77: 388–405.
- Loh, E.-W., Smith, I., Murray, R., McLaughlin, M., McNulty, S. & Ball, D. (1999). Association between variants at the GABA<sub>A</sub>  $\beta 2$ , GABA<sub>A</sub>  $\alpha 6$  and GABA<sub>A</sub>  $\gamma 2$  gene cluster and alcohol dependence in a Scottish population. *Molecular Psychiatry*, 4: 539–544.
- Loh, E.-W., Higuchi, S., Matsushita, S., Murray, R., Chen, C. K. & Ball, D. (2000). Association analysis of the GABA<sub>A</sub> receptor subunit genes cluster on 5q33-34 and alcohol dependence in a Japanese population. *Molecular Psychiatry*, 301-307.
- Lopez-Castroman, J., Jaussent, I., Beziat, S., Genty, C., Olié, E., de Leon-Martinez, V., Baca-Garcia, E., Malafosse, A., Courtet, P. & Guillaume, S. (2012). Suicidal phenotypes associated with family history of suicidal behavior and early traumatic experiences. *Journal of Affective Disorders*, 142: 193–199.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63: 1-15.

- Lovinger, D. M. (2008). Communication Networks in the Brain: Neurons, Receptors, Neurotransmitters, and Alcohol. *Alcohol Research e Health*, 31(3): 196–214.
- Mandelli, L. & Serretti, A. (2013). Gene environment interaction studies in depression and suicidal behavior: An update. *Neuroscience and Biobehavioral reviews*, 1-23.
- Manolio, T. A. & Collins, F. S. (2009). The HapMap and Genome-Wide Association Studies in Diagnosis and Therapy. *Annual Review of Medicine*, 60: 443–456.
- Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M. O. & Anisman, H. (2004). Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA<sub>A</sub> receptor subunits in frontal cortical brain region. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(6): 1478–85.
- Miller S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*, 16:1216.
- Mitjans, M. & Arias, B. (2012). The genetics of depression: What information can new methodologic approaches provide? *Actas españolas de Psiquiatría*, 40(2): 70–83.
- Möhler, H., Fritschy, J. M. & Rudolph, U. (2001). A New Benzodiazepine Pharmacology. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1): 2-8.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, LI: 263-273.
- Nakamura, Y. (2009). DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *Journal of Human Genetics*, 54(1): 1–8.
- Nock, M. K., Hwang, I., Sampson, N. A. & Kessler, R. C. (2010). Mental disorders, comorbidity and suicidal behavior : Results from the National Comorbidity Survey Replication. *Molecular Psychiatry*, 15(8): 868–876.
- Olsen, R. W. & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid<sub>A</sub> Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacology* 60(3): 243-260.

- Olsen, R. W. & Sieghart, W. (2009). GABA<sub>A</sub> receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1): 141–148.
- Palmer, B. A., Pankratz, V. S. & Bostwick, J. M. (2005). The Lifetime Risk of Suicide in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 62: 247–253.
- Pasternak, J. J. (2005). “The Genetic System Mendel’s Laws of Inheritance and Genetic Linkage”, in *An Introduction to Human Molecular Genetics: Mechanisms of Inherited Diseases*. Second Edition. Wiley-Liss.
- Pedersen, N. L. & Fiske, A. (2010). Genetic influences on suicide and nonfatal suicidal behavior: Twin study findings. *European psychiatry : the Journal of the Association of European Psychiatrists*, 25(5): 264-267.
- Petersen, L., Sørensen, T. I. A., Andersen, P. K., Mortensen, P. B. & Hawton, K. (2013). Genetic and Familial Environmental Effects on Suicide – An Adoption Study of Siblings. *PLoS one*, 8: 1-7.
- Poulter, M. O., Du, L., Weaver, I. C. G., Palkovits, M., Faludi, G., Merali, Z., Szyf, M. & Anisman, H. (2008). GABA<sub>A</sub> receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. *Biological Psychiatry*, 64(8): 645–52.
- Rudolph, U. & Knoflach, F. (2012). Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nature Review Drug Discovery*, 10(9): 685-697.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *American Association for the Advancement of Science*, 239(4839): 487–91.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989). “Gel Electrophoresis of DNA”, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J. & Russel D. W. (2001). “In vitro Amplification of DNA by the polymerase Chain Reaction”, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santella, R. M. (2006). Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole genome amplification. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 15: 1585-7.

- Sequeira, A., Klempan, T., Canetti, L., French-Mullen, J., Benkelfat, C., Rouleau, G. A. & Turecki, G. (2007). Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without *major* depression. *Molecular Psychiatry*, 12: 640–55.
- Sequeira, A., Mamdani, F., Ernst, C., Vawter, M. P., Bunney, W. E., Lebel, V., Rehal, S., Klempan, T., Gratton, A., Benkelfat, C., Rouleau, G. A., Mechawar, N. & Turecki, G. (2009). Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS one*, 4(8): 1-14.
- Sieghart, W. (2006). Structure, Pharmacology, and Function of GABA<sub>A</sub> Receptor Subtypes. *Advances in Pharmacology*, 54:231-263.
- Sur, C., Wafford, K. A., Reynolds, D. S., Hadingham, K. L., Bromidge, F., Macaulay, A., Collison, N., O'Meara, G., Howell, O., Newman, R., Myers, J., Atack, J. R., Dawson, G. R., McKernan, R. M., Whiting, P. J. & Rosahl, T. W. (2001). Loss of the Major GABA<sub>A</sub> Receptor Subtype in the Brain Is Not Lethal in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 21(10): 3409–3418.
- Tabor, H. K., Risch, N. J. & Myers, R. M. (2002). Candidate- gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature*, 3: 1–7.
- The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426: 789-796.
- The International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome. *Nature*, 431: 931-945.
- The International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437: 1299-1320.
- The International HapMap Consortium (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 449: 851-861.
- The International HapMap 3 Consortium (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, 467: 52-58.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2011). A Map of Human Genome Variation from Population-scale Sequencing. *Nature*, 467: 1061-1073.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491:56-6.
- Trincavelli, M. L., Da Pozzo, E., Daniele, S. & Martini, C. (2012). The GABAA-BZR Complex as Target for the Development of Anxiolytic Drugs. *Current Topics in Medical Chemistry*, 12: 254–269.

- Turecki, G. (2005). Dissecting the suicide phenotype: the role of impulsive-aggressive behaviours. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 30(6): 398–408.
- Värnik, A. Kõlves, K., Van der Feltz-Cornelis, C. M., Marusic, A., Oskarsson, H., Palmer, A., Reisch, T., Scheerder, G., Arensman, E., Aromaa, E., Giupponi, G., Gusmão, R., Maxwell, M., Pull, C., Szekely, A., Sola, V. P. & Hegerl, U. (2008). Suicide methods in Europe : a gender-specific analysis of countries participating in the “European Alliance Against Depression”. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 62: 545–551.
- Voracek, M. & Loibl, L. M. (2007). Genetics of suicide : a systematic review of twin studies. *The Middle European Journal of Medicine*, 119(15-16): 463–475.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C. (1953). Genetical Implications of the Structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 964-967.
- Wasserman, D., Gejjer, T., Sokolowski, M., Rozanov, V. & Wasserman, J. (2007). Genetic variation in the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulatory factor, T-box 19, and the angry/hostility personality trait. *Genes, Brain, and Behavior*, 6: 321–8.
- Whiting, P. J., Bonnert, T. P., McKernan, R. M., Farrar, S., Le Bourdellès, B., Heavens, R. P., Smith, D. W., Hewson, L., Rigby M. R., Sirinathsinghji, D. J. S., Thompson, S. A. & Wafford, K. A. (1999). Molecular and Functional Diversity of the Expanding GABA-A Receptor Gene Family. 645–53.
- Whiting, P. J. (2003). GABA-A receptor subtypes in the brain : a paradigm for CNS drug discovery? *Drugs Discovery Today*, 8(10): 445–450.
- Wilcox, A. S., Warrington, J. A., Gardiner, K., Berger, R., Whiting, P., Altherr, M. R., Wasmuth, J. J., Patterson, D. & Sikela, J. M. (1992). Human chromosomal localization of genes encoding the  $\gamma 1$  and  $\gamma 2$  subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor indicates that members of this gene family are often clustered in the genome. *Genetics*, 89: 5857–5861.
- World Health Organization (2011). Preventing suicide: A resource for suicide case registration.
- World Health Organization (2012). World Suicide Prevention Day, International Association for Suicide prevention.
- Zai, C. C., Tiwari, A. K., King, N., De Luca, V., Mueller, D. J., Shaikh, S., Wong, G. W.H., Meltzer, H. Y., Lieberman, J. A. & Kennedy, J. L. (2009). Association

study of the gamma-aminobutyric acid type a receptor gamma2 subunit gene with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 114: 33–38.

Zhao, C., Xu, Z., Chen, J., Yu, Z., Tong, K.-L., Lo, W.-S., Pun, F.W., Ng, S.-K., Tsang, S.-Y. & Xue, H. (2006). Two isoforms of GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta_2$  subunit with different electrophysiological properties: differential expression and genotypical correlations in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 11: 1092–105.