



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PLAN DE ESTUDIOS COMBINADOS EN MEDICINA (PECEM)  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

ESTUDIO POST-MORTEM DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE RNA  
EN EL CEREBRO DE PACIENTES SUICIDAS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN MEDICINA

**PRESENTA:**  
BRENDA CABRERA MENDOZA

**DIRECTOR DE TESIS:**  
DR. JOSÉ HUMBERTO NICOLINI SÁNCHEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

**COMITÉ TUTOR:**  
DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY-SHEJET  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. DAVID COLIN GLAHN  
ESCUELA DE MEDICINA DE HARVARD

Ciudad Universitaria, CD. MX., diciembre de 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

*A mi madre, María de la Luz, a quien le debo todo lo que soy*

*A mi abuelo Manuel Santiago, por ser el mejor ejemplo de esfuerzo y constancia*

*A mi tía Patty, por todas sus enseñanzas*

*A mi hermana Janet, por ser mi gran motivación*

*A Mónica, Margot y Cecy por su invaluable amistad, todas las experiencias compartidas y por siempre estar presentes en las buenas y en las malas*

*A mis tutores, el Dr. Humberto Nicolini, la Dra. Patty Ostrosky y el Dr. David Glahn, por su incondicional apoyo durante todo el doctorado. Es un honor ser su alumna*

*Al PECEM, por brindarme todas las herramientas para dedicarme a lo que me gusta*

*A los pacientes con conducta suicida y a los que murieron por suicidio, mejorar el entendimiento de esta conducta para algún día ser capaces de brindarles una atención adecuada es la mayor motivación de este proyecto*

*A la UNAM, por ser mi casa*

## Agradecimientos

La presente tesis fue posible gracias al apoyo de:

- La Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una educación de calidad y todas las herramientas para mi desarrollo académico.
- El Plan de Estudios Combinados en Medicina y a todo su equipo: Tanya, Alicia, Eric, Abraham y la Dra. Ana Flisser. Agradezco su apoyo, dedicación y compromiso con el programa.
- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado a través de la beca de doctorado nacional 822635/622945.
- El Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN), por proveer la infraestructura y equipo necesario para realizar el proyecto descrito en la presente tesis.
- A todos colaboradores de este proyecto, por su valiosa contribución a este proyecto con muestras, recursos materiales, recursos intelectuales e incondicional apoyo durante todo el proyecto. Agradezco especialmente al Dr. Cristóbal Fresno, por su tiempo, paciencia y dedicación al personalmente guiarme en el análisis de los datos. Así como a la Dra. Consuelo Walss-Bass, la Dra. Nancy Monroy y el Dr. Gabriel Fries por su apoyo en la obtención de los datos, aportar nuevas ideas, siempre interesantes puntos de discusión, disponibilidad y compromiso con este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDOS

Resumen .....	1
Abstract .....	2
Definición y epidemiología del suicidio .....	3
<i>Epidemiología global del suicidio</i> .....	5
<i>Epidemiología del suicidio en América</i> .....	8
<i>Epidemiología del suicidio en México</i> .....	10
Factores de riesgo para suicidio .....	11
<i>Factores distales</i> .....	13
<i>Neurobiología del suicidio</i> .....	20
<i>Estudios de neuroimagen en suicidio</i> .....	21
<i>Alteraciones epigenéticas en el cerebro de suicidas</i> .....	23
<i>Alteraciones en la expresión génica en el cerebro de suicidas</i> .....	26
<i>Factores moderadores</i> .....	29
<i>Factores proximales</i> .....	31
Suicidio y trastorno por uso de sustancias .....	32
<i>Trastorno por uso de sustancias: generalidades</i> .....	32
<i>Asociación entre suicidio y trastorno por uso de sustancias</i> .....	37
<i>Patología dual</i> .....	39
Justificación .....	39
Objetivo general .....	40
Objetivos específicos .....	40
Hipótesis .....	40
Métodos y materiales .....	41
<i>Consideraciones éticas</i> .....	41
<i>Sujetos y muestras</i> .....	41
<i>Aislamiento de RNA</i> .....	42
<i>Síntesis de RNA biotinilado</i> .....	46
<i>Hibridación de RNA a microarreglos</i> .....	48
<i>Pre-procesamiento de los datos del microarreglo</i> .....	49
<i>Análisis de expresión diferencial</i> .....	51
<i>Análisis de anotación funcional</i> .....	53
<i>Reanálisis de datos: patología dual en suicidas</i> .....	53
Resultados .....	56
Resultados generales .....	56

<i>Expresión génica en individuos con trastorno por uso de sustancias que murieron por suicidio</i> .....	57
<i>Discusión: Expresión génica en individuos con trastorno por uso de sustancias que murieron por suicidio</i> .....	68
<i>Expresión génica en individuos con patología dual que murieron por suicidio</i> .....	74
<i>Discusión: Expresión génica en individuos con patología dual que murieron por suicidio</i> .....	85
<b>Limitaciones, conclusiones y perspectivas</b> .....	88
<b>Artículos Publicados a partir del presente proyecto de Tesis</b> .....	90
<i>Brain Gene Expression Pattern of Subjects with Completed Suicide and Comorbid Substance Use Disorder</i> .....	90
<i>Brain gene expression profiling of individuals with dual diagnosis who died by suicide</i> .....	104
<b>Otros artículos publicados durante el doctorado</b> .....	119
<b>Referencias</b> .....	126
<b>ANEXO A: Dictámenes de Comité de Ética</b> .....	170
<b>ANEXO B: Soluciones</b> .....	172
<b>ANEXO C: Sondas de control del microarreglo Human H12-v4 de Illumina</b> .....	173

## Resumen

A pesar de que los individuos con trastorno por uso de sustancias (TUS) tienen un alto riesgo suicida, la mayoría de los estudios de expresión génica en suicidio han excluido a los sujetos con este trastorno. Por lo tanto, poco se sabe sobre el perfil de expresión génica en suicidas con TUS. La identificación de procesos biológicos alterados en el cerebro de suicidas con TUS es crucial para comprender los efectos de la comorbilidad de TUS y la conducta suicida. La presente tesis describe la evaluación de diferencias en expresión génica en la corteza prefrontal dorsolateral de suicidas y no suicidas con y sin TUS.

Sesenta y seis muestras de tejido cerebral fueron colectadas y clasificadas en los siguientes grupos: i) 23 suicidas con TUS, ii) 20 suicidas sin TUS, iii) 9 no suicidas con TUS y iv) 14 no suicidas sin TUS. Los resultados de este estudio sugieren que los suicidas con TUS tienen un perfil de expresión génica en la corteza prefrontal distinto al de los sujetos con solo una de estas condiciones, presentando diferencias en la expresión de genes involucrados en la proliferación celular y neurotransmisión glutamatérgica.

Realizamos un re-análisis de los datos de expresión génica de 38 suicidas con un enfoque a patología dual y suicidio. La patología dual es la co-ocurrencia de al menos un TUS y uno o más trastornos mentales en un individuo determinado. A pesar de que esta comorbilidad es altamente prevalente y está asociada con resultados clínicos adversos, su neurobiología ha sido poco estudiada. Además, los pacientes con patología dual tienen un mayor riesgo suicida en comparación con los pacientes con un solo trastorno.

El objetivo de este re-análisis fue evaluar las diferencias en el perfil de expresión génica en la corteza prefrontal de suicidas con patología dual en comparación con suicidas con una sola patología. Nuestros resultados sugieren una alteración en la expresión de genes involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica, neurotransmisión GABAérgica y neurogénesis en suicidas con patología dual en comparación con suicidas con un solo trastorno y suicidas sin comorbilidades mentales.

Las diferencias en la expresión génica en la corteza prefrontal observadas entre suicidas con y sin TUS, así como suicidas con patología dual y un solo trastorno podrían contribuir a las discrepancias fenotípicas y clínicas observadas entre estos pacientes. La identificación de las características moleculares en el cerebro de individuos con conducta suicida y comorbilidades psiquiátricas permitirá el diseño de medidas preventivas y terapéuticas orientadas al tratamiento adecuado de cada comorbilidad.

## **Abstract**

Despite individuals with substance use disorder (SUD) have a high suicide risk, most of gene expression studies in suicide have excluded individuals with this disorder. Thus, little is known about the gene expression profile in suicides with SUD. The identification of altered biological processes in the brain of suicides with SUD is crucial in the comprehension of the SUD and suicidal behavior comorbidity. This dissertation describes the evaluation of gene expression differences in the dorsolateral prefrontal cortex of suicides and non-suicides with and without SUD.

Sixty-six brain tissue samples were collected and classified in the following groups: i) 23 suicides with SUD, ii) 20 suicides without SUD, iii) 9 non-suicides with SUD and iv) 14 non-suicides without SUD. The results of this study suggest that suicides with SUD have a gene expression profile in the prefrontal cortex different from that of individuals with only one of these conditions, presenting differences in the expression of genes involved in cell proliferation and glutamatergic neurotransmission.

We performed a re-analysis of the gene expression data of 38 suicides focused on dual diagnosis and suicide. Dual diagnosis is the concurrence of at least one SUD and one or more mental disorders in a given individual. Although this comorbidity is highly prevalent and is associated with adverse clinical outcomes, its neurobiology has not been elucidated. In addition, patients with dual pathology have a higher suicide risk compared to patients with only one disorder.

The objective of this re-analysis was to evaluate the differences in the gene expression profile in the prefrontal cortex of suicides with dual pathology compared to suicides with a single disorder. Our results suggest an alteration in the expression of genes involved in glutamatergic neurotransmission, GABAergic neurotransmission and neurogenesis in suicides with dual diagnosis compared to suicides with a single disorder and suicides without mental comorbidities.

The observed differences in gene expression in the prefrontal cortex between suicides with and without SUD, as well as suicides with dual diagnosis and a single disorder may contribute to the phenotypic and clinical discrepancies observed among these patients. The identification of molecular characteristics in the brain of individuals with suicidal behavior and psychiatric comorbidities will allow the design of preventive and therapeutic measures aimed at the adequate treatment of each comorbidity.



## Definición y epidemiología del suicidio

El suicidio es definido como la muerte resultante de un comportamiento autolesivo intencional realizado con la finalidad de morir (Nock, 2014). El suicidio es un comportamiento humano que probablemente ha sido practicado desde las sociedades primitivas (Rosen, 1971). Sin embargo, el término para referirse a esta acción es relativamente reciente, ya que el neologismo *suicidium* apareció por primera vez en el siglo XVII. Este neologismo procede de las palabras latinas *sui*, que significa “de sí mismo” y del sufijo *cidium* que, a su vez, surge de la raíz *caedĕre*, cuyo significado es “matar” (Daube, 1972).

Se ha reconocido a Thomas Browne como la primera persona en utilizar el término suicidio en *Religio Medici* en el año 1643, mientras que otros le otorgan dicho crédito al médico inglés Walter Charleton que utilizó el término suicidio en la obra *The Ephesian Matron* en 1651 (Daube, 1972; Salman-Rocha, 2011). Aunque es posible que el término haya sido utilizado por primera vez en el texto de Walter de San Víctor, *De quatuor labyrinthos Franciae*, en el siglo XII, como ha sido reconocido recientemente (Morin, 2008; Murray, 2000).

No se ha encontrado existencia previa de vocablos que denoten el suicidio en lenguas antiguas como el hebreo, griego y latín, ni en lenguas modernas, como el francés, inglés y alemán (Daube, 1972; Morin, 2008). La Academia Francesa de la Lengua incorporó la utilización del vocablo suicidio en 1762, mientras que en la Real Academia Española fue incorporado en el año 1817 (Salman-Rocha, 2011).

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define al suicidio como el acto de quitarse la vida de manera deliberada (OMS, 2015). Recientemente, el comportamiento suicida ha sido concebido como un espectro continuo que además de la muerte por suicidio, incluye otras categorías como el intento, la planeación y la ideación suicida (Turecki & Brent, 2016).

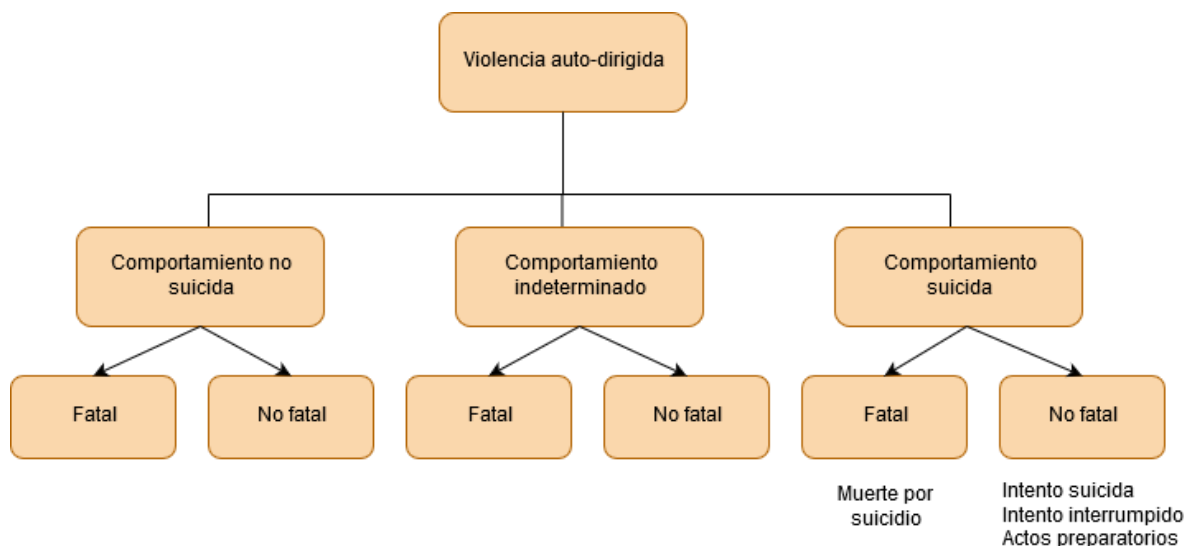
El intento suicida se refiere a la participación en un comportamiento potencialmente autolesivo en el que hay alguna intención de morir (Turecki, 2014). La planeación suicida se refiere a la formulación de un método específico a través del cual una persona tiene la intención de morir (Turecki, 2014). Mientras que la ideación suicida se refiere a los pensamientos de participar en comportamientos destinados a terminar con la vida (Turecki, 2014).

En Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (*The Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) además de las categorías antes mencionadas, incluyen bajo el término de violencia autodirigida, otros actos autolesivos (Crosby, Ortega & Melanson, 2011). La violencia autodirigida es definida como un comportamiento dirigido hacia uno mismo y que resulta en autolesiones o la posibilidad de éstas (Crosby, Ortega & Melanson, 2011).

La violencia autodirigida se clasifica en actos suicidas, indeterminados y no suicidas (Posner et al., 2007). La diferencia entre estos actos radica en la intención de morir que se encuentra presente en los actos suicidas, es poco clara en los indeterminados y se encuentra ausente en los actos no suicidas (Crosby, Ortega & Melanson, 2011).

Estas categorías además se subclasifican de acuerdo con su resultado final en fatales para los actos que culminan en muerte por suicidio y no fatales para aquellos actos que no conllevan a un desenlace mortal. Dentro de los actos no fatales se incluyen el intento suicida, el intento suicida interrumpido y los actos preparatorios (Nock, 2014, Crosby, Ortega & Melanson, 2011; Posner et al., 2007).

En el intento suicida interrumpido la persona toma medidas para lastimarse, pero es detenido por otra persona o él mismo antes de sufrir una lesión mortal. Esta interrupción puede ocurrir en cualquier momento durante el acto (Crosby, Ortega & Melanson, 2011). Los actos preparativos se definen como toda planificación para hacer un intento de suicidio antes de que comience el daño potencial. Esto puede incluir cualquier acto más allá de una verbalización o pensamiento, como obtener un método de suicidio, por ejemplo, al comprar un arma o prepararse para la muerte por suicidio, por ejemplo, al escribir una nota suicida (Nock, 2014, Crosby, Ortega & Melanson, 2011; Posner et al., 2007). La clasificación de la violencia autodirigida del CDC se ilustra en la Figura 1.



**Figura 1.** Clasificación de la violencia autodirigida de acuerdo con la CDC, modificado de Nock, 2014.

El trastorno de comportamiento suicida fue incluido en la sección de afecciones que requieren más estudio en la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (*American Psychiatric Association, APA, 2013*). De acuerdo con este manual, la manifestación fundamental del trastorno de comportamiento suicida es el intento de suicidio.

Se considera que los individuos presentan un mayor riesgo de futuros intentos suicidas y de muerte por suicidio en los 24 meses posteriores a un intento de suicidio, y el período de 12-24 meses posteriores a que tuviese lugar el comportamiento suicida, se considera de remisión inicial (APA, 2013). En la edición previa de este manual, que es el *DSM-IV*, el suicidio solo era referido como un síntoma de algunos trastornos psiquiátricos (APA, 2002). Los criterios propuestos por el *DSM-5* para el trastorno de comportamiento suicida se enlistan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Criterios propuestos por el *DSM-5* para el trastorno de comportamiento suicida**

- A. El individuo ha realizado un intento de suicidio en los últimos 24 meses.
- B. El acto no cumple criterios para la autolesión no suicida, es decir, no presenta una autolesión dirigida a la superficie corporal que se realiza para aliviar un sentimiento / estado cognitivo negativo o para tener un estado de ánimo positivo.
- C. El diagnóstico no se aplica a la ideación suicida o a los actos preparatorios.
- D. El acto no se inició durante un *delirium* o un estado de confusión.
- E. El acto no se llevó a cabo únicamente con un fin político o religioso.

Especificar si:

Actual: No han transcurrido más de 12 meses desde el último intento.

En remisión inicial: Han transcurrido 12 - 24 meses desde el último intento

---

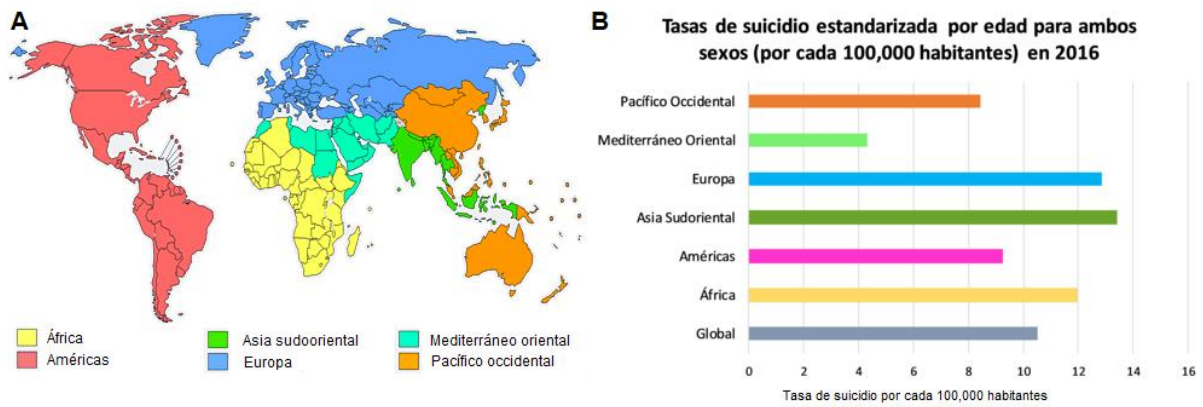
Tomado del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 5a edición (APA, 2013)

### ***Epidemiología global del suicidio***

El suicidio es un fenómeno que se presenta en todas las regiones del mundo. Se estima que alrededor de 800,000 personas se suicidan cada año. En el año 2016, se registraron 793,000 muertes por suicidio, lo que representó el 1.4% del total de muertes, siendo la 18ª causa de muerte más frecuente a nivel mundial en dicho año (OMS, 2017).

Cada país presenta una distribución distinta de los grupos de edad en su población, por lo que es necesario considerar este factor al realizar comparaciones entre distintos países. Para esto, se calculan las tasas estandarizadas por edad, en las que se considera la estructura de los grupos de edad de cada población, lo que permite que las tasas de mortalidad entre los distintos países sean comparables (OMS, 2017).

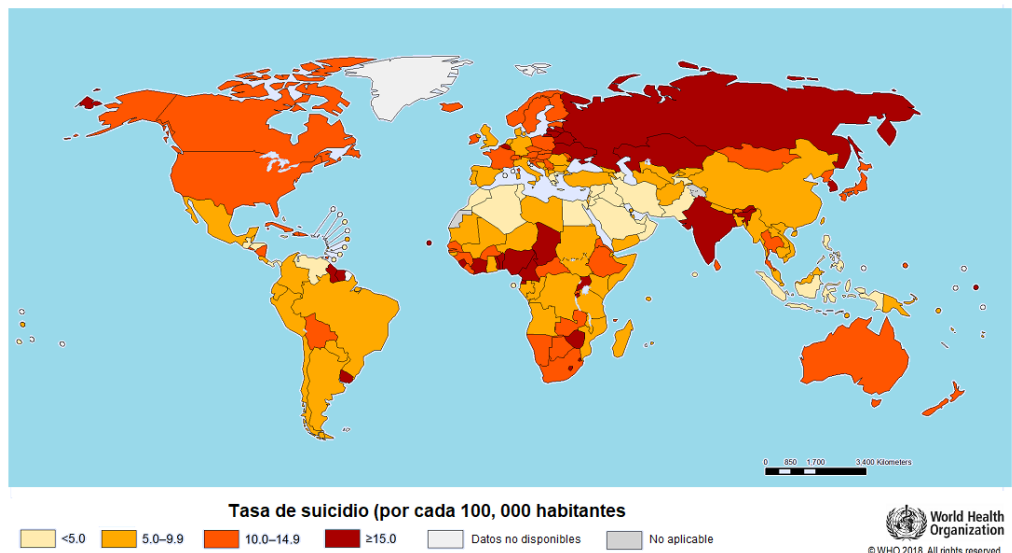
Los estados miembros de la OMS están agrupados en seis regiones: África, Américas, Asia Sudoriental, Europa, Mediterráneo Oriental y Pacífico Occidental, como se muestra en la Figura 2A. La tasa mundial de suicidios estandarizada por edad fue de 10.53 suicidios por cada 100,000 habitantes en el año 2016, variando desde 4.3 por cada 100,000 habitantes en la región del Mediterráneo Oriental hasta un 12.85 por cada 100,000 habitantes en la región de Europa (OMS, 2017), como se muestra en la Figura 2B.



**Figura 2.** A) Regiones en las que se agrupan los estados miembros de la Organización Mundial de la Salud. Modificado de: Oficinas regionales de la OMS (<http://origin.who.int/about/regions/es/>). B) Tasa de suicidio estandarizada por edad para cada una de las regiones de la OMS en 2016. Fuente: WHO Global Health Estimates.

Las tasas de suicidio pueden presentar grandes variaciones aún dentro de la misma región geográfica como se muestra en la Figura 3. Los tres países con las mayores tasas de suicidio para ambos sexos estandarizadas por edad a nivel global en el año 2016 fueron Guyana (30.2 suicidios por cada 100,000 habitantes), Lesoto (28.9 suicidios por cada 100,000 habitantes) y Rusia (26.5 suicidios por cada 100,000 habitantes) (OMS, 2017).

**Tasas de suicidios estandarizadas por edad (por cada 100,000 habitantes), ambos sexos, 2016**

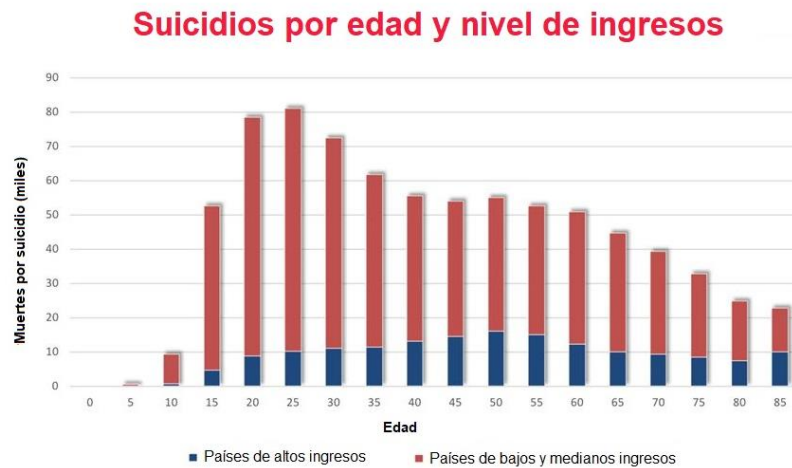


**Figura 3.** Tasas de suicidio estandarizadas por edad (por cada 100,000 habitantes), para ambos sexos, año 2016. Fuente: Organización Mundial de la Salud. Modificado de: [https://www.who.int/mental\\_health/suicide-prevention/Global\\_AS\\_suicide\\_rates\\_bothsexes\\_2016.png?ua=1](https://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/Global_AS_suicide_rates_bothsexes_2016.png?ua=1).

La tasa de suicidio estandarizada por edad en países de ingresos altos es de 11.5 suicidios por cada 100,000 habitantes, la cual es ligeramente mayor en comparación con los países de bajos, medianos-bajos y medianos-altos ingresos, que tienen una tasa de 11.4, 10.8 y 9 suicidios por cada 100,000 habitantes, respectivamente (OMS, 2017). Sin embargo, dado que la mayor proporción de la población mundial reside en los países de ingresos bajos y medianos, se estimó que el 79% de los suicidios

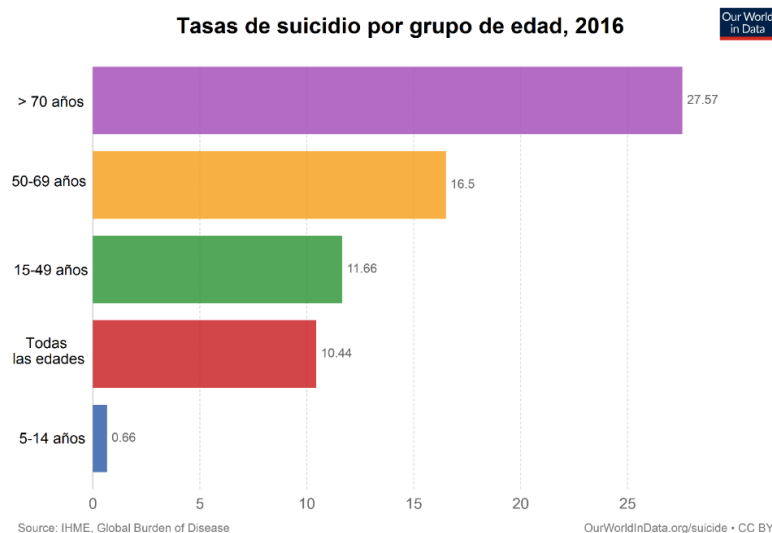
ocurridos en el año 2016 se registraron en estos países (OMS, 2017), como se muestra en la Figura 4.

El comportamiento suicida puede aparecer en cualquier momento a lo largo de la vida. Sin embargo, son los jóvenes de 15 a 44 años los que presentan las mayores tasas absolutas de suicidio en comparación con otros grupos de edad, como se muestra en la Figura 4 (Bachmann, 2018).



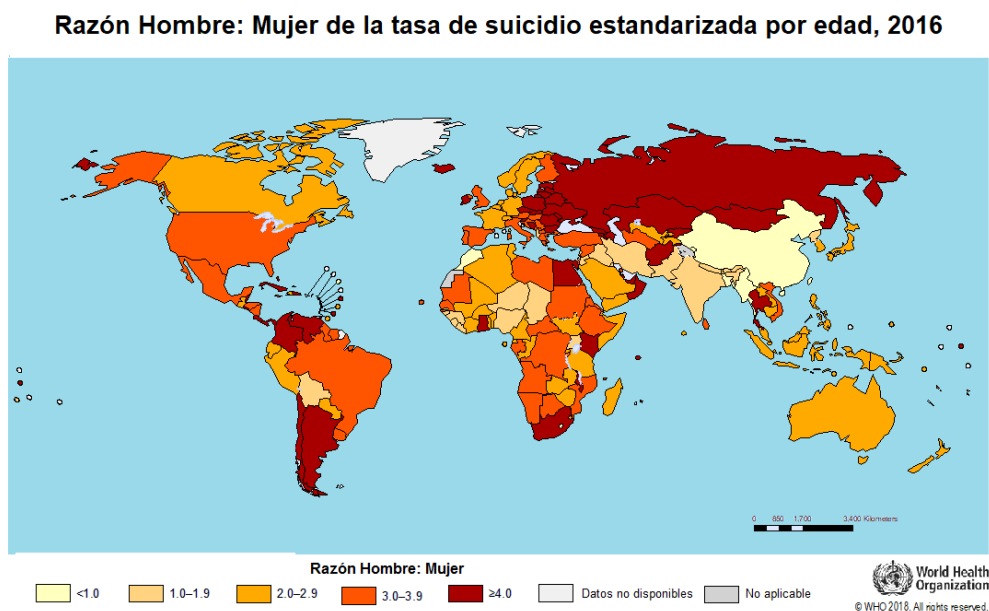
**Figura 4.** Número de muertes por suicidio por grupo de edad y nivel de ingresos del país en el año 2016. Modificado de OMS, 2019.

El suicidio es la segunda causa de mortalidad prematura en individuos de 15 a 29 años, precedida solo por los accidentes de tráfico y es la tercera causa en el grupo de edad de 15 a 44 años (OMS, 2017). Sin embargo, esto no implica que el suicidio sea más probable en los individuos jóvenes que en los individuos de edad avanzada, ya que las tasas de suicidio por grupo de edad son mayores en individuos de 70 o más años alrededor del mundo (Bertolote & Fleischmann, 2002; Ritchie, Roser & Ortiz-Ospina, 2019) como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Tasas de suicidio por grupo de edad en el año 2016. Las tasas de suicidio están indicadas en número de muertes por suicidio por cada 100,000 habitantes. Modificado de Ritchie, Roser & Ortiz-Ospina, 2019.

Las tasas de suicidio varían de acuerdo con el sexo. A nivel global, las tasas de suicidio en hombres son mayores en comparación con las de las mujeres. En el año 2016, la tasa de suicidio en hombres y mujeres a nivel mundial fue de 13.5 y 7.7 suicidios por cada 100,000 habitantes, respectivamente (OMS, 2017). La proporción hombre: mujer fue de 1.8 en 2016, lo que indica que, por cada muerte por suicidio presentada en mujeres, se registraron 1.8 muertes por suicidio en hombres (OMS, 2017). La mayor proporción de muertes por suicidio en hombres se presenta en todos los países alrededor del mundo, excepto, Marruecos, Pakistán, China y Bangladesh, como se muestra en la Figura 6.

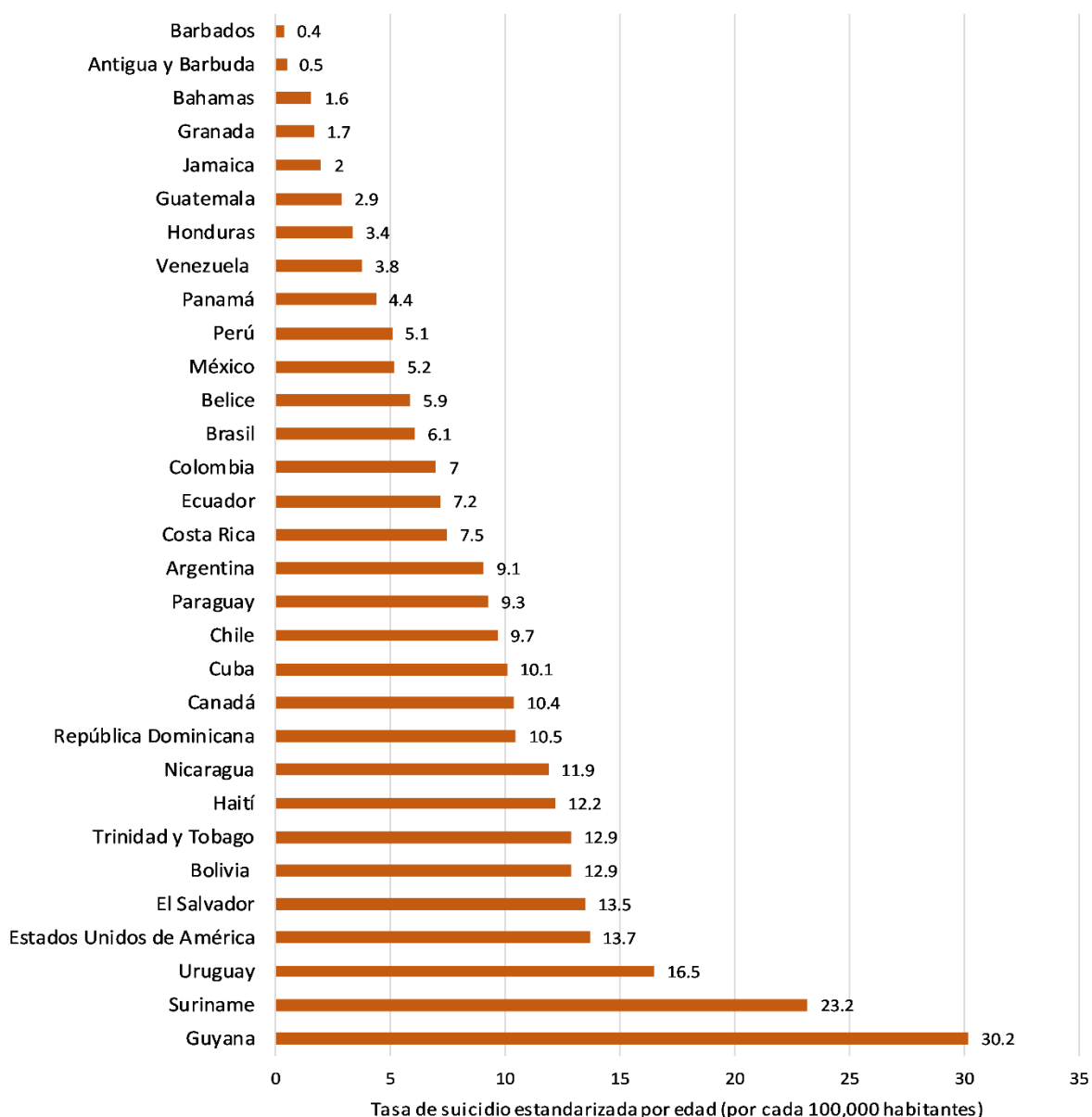


**Figura 6.** Razón hombre: mujer de la tasa de suicidio estandarizada por edad (por cada 100,000 habitantes), año 2016. Fuente: Organización Mundial de la Salud. Modificado de: [https://www.who.int/gho/mental\\_health/suicide\\_rates\\_male\\_female/en/](https://www.who.int/gho/mental_health/suicide_rates_male_female/en/).

### ***Epidemiología del suicidio en América***

De acuerdo con el último reporte regional de la Organización Panamericana de la Salud (*PAHO* por sus siglas en inglés) en la región de las Américas, se estima que ocurren aproximadamente 65,000 muertes por suicidio cada año (*PAHO*, 2014). En el año 2016, la región presentó una tasa estandarizada por edad de 9.25 suicidios para ambos sexos por cada 100,000 habitantes (OMS, 2017). En general, la región de las Américas presenta tasas de suicidio inferiores al promedio mundial, sin embargo, las tasas varían en cada país de esta región como se muestra en la Figura 7.

### Tasa de suicidio estandarizada por edad en las Américas, 2016



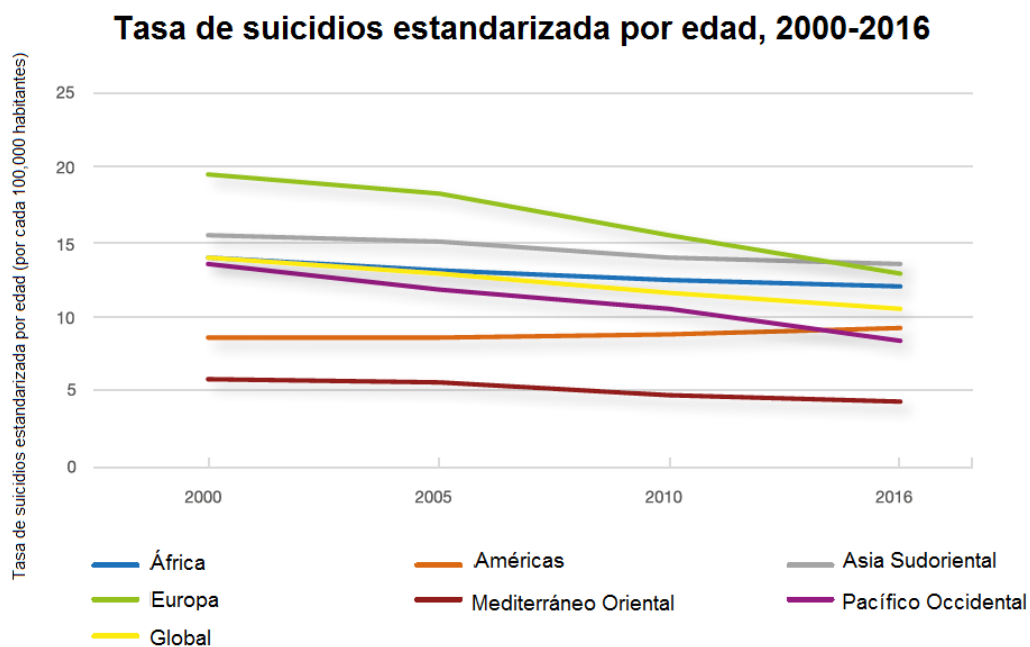
**Figura 7.** Tasa de suicidio estandarizada por edad (por cada 100,000 habitantes) en los países de la región de las Américas, año 2016. Fuente: Organización Mundial de la Salud. Modificado de: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.MHSUICIDEASDRV?lang=en>.

De forma similar al resto del mundo, aunque la mayoría de los suicidios en la región de las Américas ocurrieron en personas de 25 a 44 años (36.8%) y 45 a 59 años (25.6%), la tasa de suicidio más elevada entre los diferentes grupos de edad se encontró en individuos de 70 o más años, entre el año 2005 y 2009 (PAHO, 2015). Los reportes más recientes indican que esa misma tendencia se ha mantenido en los últimos años para la región de las Américas (Ritchie, Roser & Ortiz-Ospina, 2019).

La proporción hombre/mujer para la tasa de suicidio en la región de las Américas fue de 3.28 en 2016, lo cual es mayor a la proporción mundial de 1.8 (OMS, 2017). La mayor proporción de muertes por suicidio por parte de hombres en comparación con

la de mujeres se observa en todos los países de la región de las Américas, variando desde 2.11 en Bolivia a 7.51 en Venezuela (Ritchie, Roser & Ortiz-Ospina, 2019).

En el período del 2010 a 2016, la tasa de suicidios estandarizada por edad disminuyó un 9.8% a nivel global. Los decrementos a nivel regional variaron desde 4.2% en la región de Asia Sudoriental a 19.6% en la región del Pacífico Occidental. La única región que presentó un incremento en la tasa de suicidios fue la región de las Américas, donde se presentó un aumento del 6% en la tasa de suicidios estandarizada por edad (OMS, 2019), como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Tasa de suicidio estandarizada por edad para cada una de las regiones de la OMS del año 2000 al 2016. Modificado de OMS, 2019.

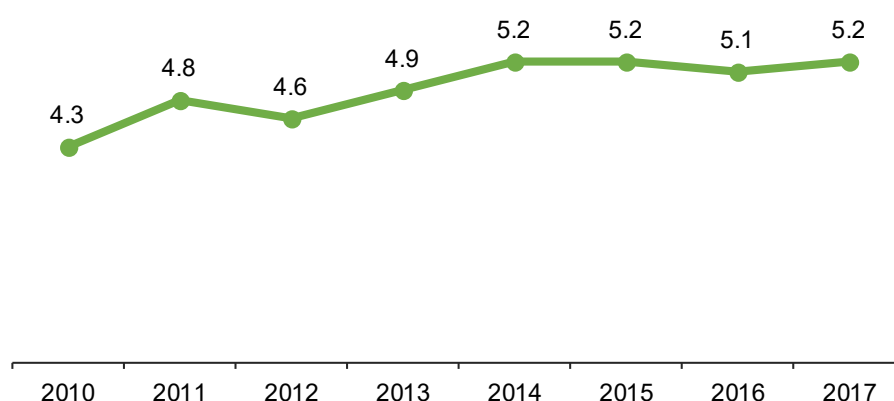
### ***Epidemiología del suicidio en México***

En México, en el año 2017 se registraron 6,494 suicidios, lo que constituyó 0.9% del total de muertes en el país para ese año. La tasa de suicidios en 2017 fue de 5.2 fallecidos por cada 100,000 habitantes, ocupando el lugar número 22 de las principales causas de muerte para la población total del país (INEGI, 2019).

En comparación con las tasas globales y regionales de suicidio, México presenta tasas relativamente bajas de suicidio. Sin embargo, mientras que la tasa de mortalidad por suicidio ha disminuido a nivel global, la tasa de suicidio en México se ha incrementado un 17.3% entre los años 2010 y 2017, como se muestra en la Figura 9.



### Tasa de suicidios en México 2010 a 2017 (Por cada 100 000 habitantes)



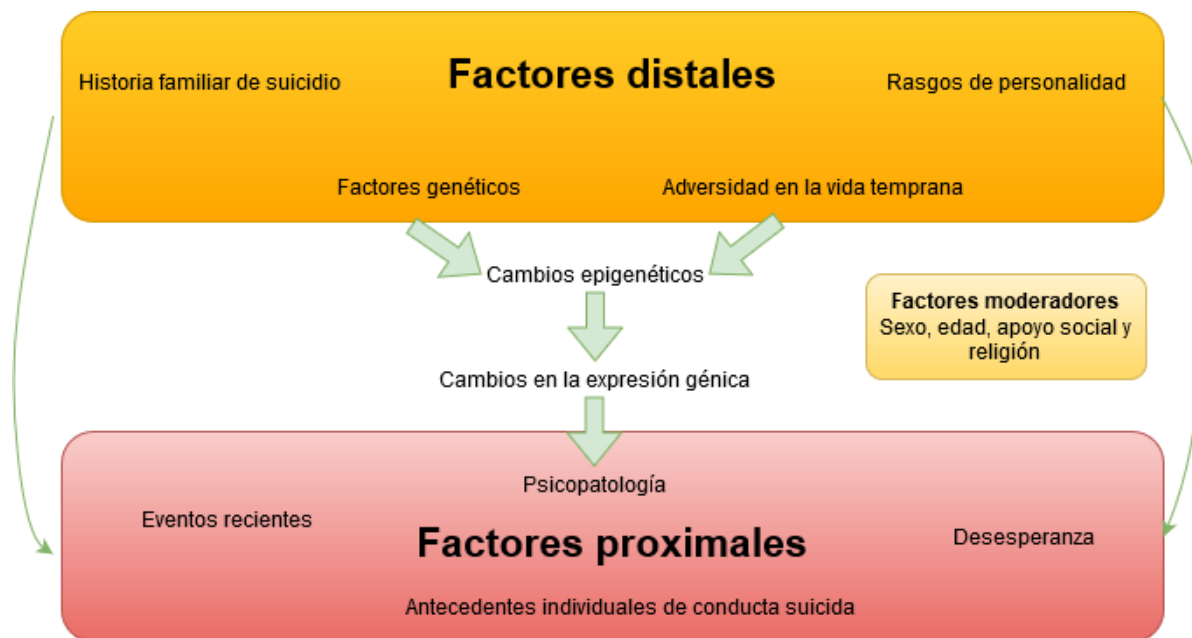
**Figura 9.** Tasa de suicidio estandarizada por edad en México del año 2010 al 2017. Tomado de INEGI, 2019.

Las entidades federativas con mayores tasas de suicidio en el año 2017 fueron Chihuahua (10.7 suicidios por cada 100,000 habitantes), Aguascalientes (10.1 suicidios por cada 100,000 habitantes) y Sonora (9.1 suicidios por cada 100,000 habitantes). Por otra parte, Guerrero (1.9 suicidios por cada 100,000 habitantes), Veracruz (2.6 suicidios por cada 100,000 habitantes) y Oaxaca (3.1 suicidios por cada 100,000 habitantes) presentaron las tasas más bajas del país (INEGI, 2019).

Del total de fallecidos por suicidio en el año 2017 en México, 80.1% eran hombres y 19.9% mujeres, lo que representa una tasa de 8.5 suicidios por cada 100,000 para los hombres y de 2 suicidios por cada 100,000 habitantes en mujeres (INEGI, 2019). En México, la mayoría de los individuos que murieron por suicidio son jóvenes. Se reportó que el 41.3% de los individuos que murieron por suicidio en el 2017 tenían entre 15 a 29 años, siendo la segunda causa de muerte para este grupo de edad en el país (INEGI, 2019).

### Factores de riesgo para suicidio

Recientemente, se ha reconocido la contribución de múltiples factores sociales e individuales que interactúan para dar como resultado el suicidio (Turecki & Brent, 2016; Turecki, 2014). Se han propuesto modelos que destacan la interacción de factores de riesgo que actúan de manera distal y proximal con respecto al evento suicida (Turecki & Brent, 2016; Turecki, 2014; Turecki et al., 2012), como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Modelo de interacción de factores de riesgo en la patología del suicidio. Modificado de Turecki et al., 2012.

Los actos suicidas generalmente ocurren en el clímax de un proceso patológico complejo comúnmente conocido como crisis suicida (Heeringen, 2001; Jollant et al., 2011). Los factores distales tienen una relación temporal distante con la crisis suicida y aumentan la predisposición al suicidio (Turecki, 2014a). Entre los factores distales que se han identificado se encuentran una historia familiar de suicidio, factores genéticos, ciertos rasgos de personalidad, estilos cognitivos y adversidad en la vida temprana.

Se ha sugerido que algunos de los factores distales, como los factores genéticos y la adversidad en la vida temprana causan cambios a nivel epigenético, que a su vez pueden provocar cambios en la expresión génica (Turecki, 2014b). Estos cambios epigenéticos y de expresión génica probablemente subyacen a los estados psicopatológicos que actúan de manera como factores proximales en el comportamiento suicida (Turecki, 2014b).

Los factores de riesgo proximales actúan como precipitantes de la crisis suicida y aumentan la vulnerabilidad inmediata ante alguna condición o evento en particular. Entre los factores proximales identificados hasta el momento se encuentran la desesperanza, antecedentes individuales de conducta suicida, eventos recientes y la psicopatología (Turecki et al., 2012).

Los factores moderadores son variables que modifican la intensidad y/o dirección de la relación entre dos variables (Turecki et al., 2012). Estos factores modulan la relación entre factores distales y proximales. Algunos de los factores moderadores que se han identificado se encuentran el sexo, edad, apoyo social y religión.

## ***Factores distales***

### *Historia familiar de suicidio*

Se ha reconocido al suicidio como un fenómeno que segrega familiarmente (Zai et al., 2012). Esta afirmación se basa en estudios que han encontrado una mayor tasa de muerte por suicidio y/o intento suicida en familiares de individuos que murieron por suicidio en comparación con familiares de controles no suicidas (Tsuang, 1983; Pfeffer et al., 1994; Malone et al., 1995; Brent et al., 1996; Johnson et al., 1998, Zai et al., 2012).

Los estudios en familias han permitido explorar la extensión de la segregación de este comportamiento. Los resultados demuestran un incremento en el riesgo de presentar comportamiento suicida de 3.8 a 10.6 para los individuos con parentesco a individuos que fallecieron a causa de suicidio en comparación con individuos sin este parentesco (Brent et al., 2010).

Además, se ha encontrado que la tasa de intentos de suicidio en las familias de individuos con intento suicida es mayor en comparación con las familias de los individuos sin este antecedente, aun teniendo el mismo trastorno psiquiátrico (Brent et al., 2002; Brent et al., 2003). Por lo que se ha sugerido que la predisposición al suicidio es parcialmente independiente a la predisposición a trastornos psiquiátricos (Brent et al., 2002; Brent et al., 2003; Zai et al., 2012).

Los estudios en gemelos permiten estimar la contribución de los factores genéticos y ambientales en cierto fenotipo (Sahu & Prasuna, 2016). Estos estudios comparan la tasa de concordancia de gemelos monocigóticos, que comparten el mismo genotipo con la de gemelos dicigóticos que comparten aproximadamente 50% del genotipo (Merikangas & Merikangas, 2016).

Un meta-análisis de estudios de gemelos, que incluyó individuos con ideación suicida, intento suicida y muerte por suicidio reportó concordancia del 24.1% en gemelos monocigóticos y 2.8% en gemelos dicigóticos para el comportamiento suicida. Este estudio además estimó una heredabilidad de 30–55% para el comportamiento suicida (Voracek, 2007). Una estimación más reciente de la heredabilidad de este comportamiento fue del 43% para intento suicida y muerte por suicidio (McGuffin et al., 2010).

Los estudios de adopción son complementarios a los estudios de gemelos y también permiten estimar la contribución de los factores genéticos y ambientales en cierto fenotipo. Estos estudios comparan la similitud entre un adoptado y sus padres biológicos en comparación con sus padres adoptivos (Merikangas & Merikangas, 2016).

Solo dos estudios de adopción se han realizado en individuos con comportamiento suicida. En ellos, se ha reportado una tasa de suicidio seis veces mayor en los familiares biológicos de individuos que murieron por suicidio en comparación con los familiares adoptivos que no tenían relación biológica con estos (Brent & Mann, 2005; Schulsinger et al., 1979).

Mientras que el estudio de Wender y colaboradores (1986), identificó una tasa de suicidio quince veces mayor en los individuos emparentados con individuos con trastornos del ánimo (Brent & Mann, 2005; Wender et al., 1986; Zai et al., 2012). Este aumento de riesgo se observó particularmente en los individuos con el subtipo de *reacción alterada*, que es un término de diagnóstico danés que se aplicaba a individuos que presentaban un comportamiento histriónico o un intento suicida impulsivo en respuesta a un evento identificable (Wender et al., 1986; OMS, 1969). Por lo que dicho estudio añadió evidencia a la asociación entre impulsividad y suicidio (Wender et al., 1986; Zai et al., 2012).

### *Factores genéticos*

La implicación de factores genéticos en la conducta suicida, además de su alta heredabilidad se encuentra sustentada en los estudios en familias, gemelos y de adopción antes mencionados (Mirkovic et al., 2016). Además, se han realizado esfuerzos por identificar variantes y regiones genéticas asociadas a este comportamiento por medio de estudios de asociación.

### *Estudios de asociación*

Los estudios de asociación consisten en el análisis de variantes genéticas, generalmente en un diseño de casos (individuos con la característica estudiada) y controles (individuos sin la característica estudiada). El objetivo de este tipo de estudios es identificar aquellas variantes genéticas que se presentan con mayor frecuencia en los casos y que por lo tanto pudieran estar asociadas con un mayor riesgo a la característica estudiada (Lewis & Knight, 2012; Visscher & Montgomery, 2009).

Los estudios de asociación de genes candidatos en individuos con conducta suicida han identificado variantes en genes involucrados en la neurotransmisión serotoninérgica, dopaminérgica, adrenérgica; así como en procesos neurotróficos y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (Mirkovic et al., 2016), como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Estudios de asociación en genes candidatos en suicidio**

Sistema	Gen / producto	Comportamiento	Variante asociada	Población	Referencia
Serotoninérgico	TPH1 / Triptófano hidroxilasa 1	Intento suicida	rs10488683	Canadiense	Brezo et al., 2010
			rs1800532	China	Liu et al., 2005
			rs1800532 y rs652458	Estadounidense	Galfalvy et al., 2009
		rs1800532	Turca	Beden et al., 2016	
	TPH2 / Triptófano hidroxilasa 2	Intento suicida	rs1800532	Croata	Stefulj et al., 2004
			rs7305115	China	Ke et al., 2006; Zhang et al., 2010
		Muerte por suicidio	rs7305115	Mexicana	López-Narváez et al., 2015
			rs457065 y rs11178997	Finlandesa y afroamericanos	Zhou et al., 2005
	5HTR1A / Receptor serotoninérgico 1A	Intento suicida	rs1386494	Alemana	Zill et al., 2004
			rs1386483	Polaca	Fudalej et al., 2010
	5HTR1B / Receptor serotoninérgico 1B	Intento suicida	rs6295	Ucraniana	Wasserman et al., 2006
			Sin asociación	Mexicana	González-Castro et al., 2013a
	5HTR1B / Receptor serotoninérgico 1B	Muerte por suicidio	rs6295	Iraní	Samadi Rad et al., 2012
			rs6296	Irlandesa	Murphy et al., 2011
	5HTR2A / Receptor serotoninérgico 2A	Intento suicida	rs1568817, rs130058, rs6298, rs6296	Canadiense	Zouk et al., 2007
			rs6311	Alemana	Giegling et al., 2006
			rs6313	Polaca	Wrzosek et al., 2011
			rs6313	Judía	Zalsman et al., 2011
rs6311			Española	Saiz et al., 2011	
5HT2C / Receptor serotoninérgico 2C	Intento suicida	rs6313	Mexicana	González-Castro et al., 2013b	
		rs4272555 y rs2428707	Mexicana	Molina-Guzmán et al., 2017	
SLC6A4 / Transportador de serotonina	Intento suicida	rs25531	Ucraniana	Wasserman et al., 2007	
		rs25531	China	Hung et al., 2011	
		rs25531	Europea	Li & He, 2007	
Dopaminérgico	DRD2 / Receptor dopaminérgico D2	Intento suicida	rs1799732	Japonesa	Suda et al., 2009
			rs1799732	Alemana	Johann et al., 2005
	AKT1 / Serina treonina cinasa	Intento suicida	rs1130214	Brasileña	Magno et al., 2010

Adrenérgico	<i>ADRA2A</i> / Receptor adrenérgico alfa 2A	Muerte por suicidio	rs1800035	Canadiense	Sequeira et al., 2004
			rs1800544	Japonesa	Fukutake et al., 2008
Hipotálamo-pituitaria-adrenal	<i>CRHR1</i> / Receptor de hormona liberadora de corticotropina 1	Intento suicida	rs4782887	Ucraniana	Wasserman et al., 2008
	<i>AVPR1B</i> / Receptor de vasopresina V1b	Intento suicida	rs33990840	Ucraniana	Ben-Efraim et al., 2013
	<i>FKBP5</i> / Proteína de unión a FK506	Muerte por suicidio	rs3800373 y rs1360780	Japonesa	Supriyanto et al., 2011
Factores neurotróficos	<i>BDNF</i> / Factor neurotrófico derivado del cerebro	Intento suicida	rs6265	Japonesa, eslovaca, francesa, sueca y neozelandesa	Iga et al., 2007; Huang & Lee, 2007; Sarchiapone et al., 2008; Kim et al., 2008; Perroud et al., 2008; Sears et al., 2013
		Muerte por suicidio	rs6265	Eslovaca	Pregelj et al., 2011
	<i>NPTX2</i> / Pentraxina neuronal 2	Intento suicida	rs705315	Estadounidense	Strauss et al., 2012
	<i>HOMER1</i> / Proteína de andamiaje Homer 1	Intento suicida	rs2290639	Estadounidense	Strauss et al., 2012
	<i>NTRK2</i> / Receptor de tropomiosina relacionado a la cinasa B	Intento suicida	rs11140714	Estadounidense y alemana	Kohli et al., 2010
Otros	<i>ANKK1</i> / Proteína cinasa PKK2	Intento suicida	rs1800497	Mexicana	Genis-Mendoza et al., 2017

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) siguen el mismo principio que los estudios de asociación, pero el análisis de las variaciones genéticas se extiende a lo largo de todo el genoma humano (Visscher & Montgomery, 2009). Estos estudios han extendido los hallazgos encontrados en los estudios de asociación de genes candidatos, encontrando además asociaciones en variantes de genes involucrados en la respuesta inmune, neurodesarrollo, adhesión y migración celular, como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3. Estudios de asociación del genoma completo en suicidio**

Comportamiento	Plataforma / Fabricante	Número de participantes	Etnicidad	Variante / gen o locus asociados	Referencia
TESI (escitalopram) en pacientes con DM	Human-1 BeadChip / Illumina	90 casos y 90 controles	Caucásica (EUA). Incluye afroamericanos.	rs11628713 / <i>PAPLN</i> , rs10903034 / <i>IL28RA</i>	Laje et al., 2009
Intento suicida en pacientes con TB y DM	Human Mapping 500K Array Set y Genome-Wide Human SNP Array 5.0 / Affymetrix	2,805 casos y 5,932 controles	Caucásica (Reino Unido, Países Bajos, Alemania)	En DM: rs2576377 / <i>ABI3BP</i> ,	Perlis et al., 2010
Intento suicida	Human 610-Quad Beadchips / Illumina	265 casos y 1,889 controles	Caucásica (Reino Unido, Alemania y EUA)	rs4751955 / <i>GFRA1</i>	Schosser et al., 2011
TESI (escitalopram) en pacientes con DM	Human 610-Quad Beadchips / Illumina	244 casos y 462 controles	Caucásica (Europa)	rs11143230 / <i>GDA</i> , rs358592 / <i>KCNIP4</i> rs4732812 / <i>ELP3</i>	Perroud et al., 2012
TESI en pacientes con TB	Human-1 Genotyping 100k BeadChip, HumanHap300-Duo Genotyping BeadChip / Illumina	Muestra de descubrimiento: 32 casos con TESI y dos grupos de controles (329 con ideación suicida y 79 sin comportamiento suicida).	Caucásica (Alemania)	rs1037448 / <i>TMEM138</i> , rs10997044 / <i>CTNNA3</i> , rs1109089 / <i>RHEB</i>	Menke et al., 2012
Intento suicida en pacientes con TB	Genome-Wide Human SNP Array 6.0 / Affymetrix	1,201 casos y 1,497 controles	Caucásica (Alemania y EUA)	rs300774 / 2p25.3	Willour et al., 2012
Muerte por suicidio	GeneChip® Mapping 50K Xba	68 casos y 31 controles	Caucásica (EUA)	58 SNV*	Galfalvy et al., 2013
Ideación e intento suicida en pacientes con TB y DM	HumanHap550-Quad, Human610-Quad BeadChip / Illumina	663 casos y 4,017 controles	Caucásica (Alemania, Dinamarca y Reino Unido)	Sin asociación	Mullins et al., 2014
Intento suicida y muerte por suicidio	Omni-Quad Beadchip / Illumina	577 casos y 1,233 controles	Caucásica (Alemania, Canadá y EUA)	15 SNV**	Galfalvy et al., 2015
Comportamiento suicida en pacientes con TB	SNP 5.0 / Illumina Sentrix HumanHap550 Beadchip / Affymetrix	212 familias nucleares con probandos con TB y 911 pacientes con TB	Caucásica (Canadá y Reino Unido)	rs10448042 / <i>PENK</i> , rs10448044 / <i>IL7</i> , rs3851150, rs7244261 / <i>TMX3</i>	Zai et al., 2015
Muerte por suicidio e intento suicida	Omni-Quad Beadchip / Illumina	475 casos y 1,133 controles	Caucásica (Alemania, Canadá y EUA)	Sin asociación	Gross et al., 2015
Intento suicida	Human Omni1-Quad_v1 chip / Illumina	660 tríos familiares un probando con antecedente de intento suicida	Caucásica (Ucrania)	Sin asociación	Sokolowski Wasserman & Wasserman, 2016
Intento suicida en pacientes con SZ	Infinium Omnia2.5 Beadchip / Illumina	53 casos y 68 controles	Caucásica (Canadá)	Asociación nominal: rs12895203 / 14q23.3 rs7897059 / <i>CAMK1D</i>	Bani-Fatemi et al., 2016
Intento suicida e ideación suicida	Genomewide 1M chip / Affymetrix	603 casos (358 con TB y 245 con depresión) y 2,752 controles	Caucásica (Países Bajos)	SNV en <i>DICER1</i> asociado con comportamiento suicida y en <i>NTRK2</i> solo en muestra con DM	Pulay & Rethelyi, 2016
Intento suicida	Infinium PsychArray BeadChip / Illumina	Muestra de descubrimiento:	Caucásica (EUA)	SNV cercanos a <i>MRAP2</i>	Stein et al., 2017

		473 casos y 9,778 controles. Muestra de replicación: 135 casos y 6,879 controles). Muestra clínica: 51 casos y 112 controles			
Intento suicida	Infinium PsychArray BeadChip / Illumina	6,024 casos y 44,240 controles	Caucásica (Dinamarca)	rs4809706, rs4810824 y rs6019297 / 20q13.13	Erlangsen et al., 2018
Intento e ideación suicida	Hap650 BeadChip 1M-Duo BeadChip, Omni-Quad BeadChip / Illumina	138 individuos con ideación suicida, 122 con intento suicida y 2,880 controles	Caucásica (EUA)	rs79324256 / <i>KCNMB2</i>	Kimbrel et al., 2018
Riesgo de muerte por suicidio	Infinium PsychArray BeadChip / Illumina	43 familias con alto riesgo de muerte por suicidio en los que se encontraban 267 casos	Caucásica (EUA)	rs181058279 / <i>SP110</i> , rs76215382 <i>AGBL2</i> , rs121908538 / <i>SUCLA2</i> , rs745918508 / <i>APH1B</i>	Coon et al., 2018
Intento suicida	Omni-Quad Beadchip / Illumina	660 tríos familiares un probando con antecedente de intento suicida	Caucásica (Ucrania)	Asociación más robusta con SNV en <i>RETREG1</i> , <i>GSN</i> , <i>GNAS</i> y <i>CACNA1D</i>	Sokolowski, Wasserman, & Wasserman, 2018
Muerte por suicidio	Infinium PsychArray BeadChip / Illumina	3,413 casos y 11,049 controles	Caucásica (EUA, Reino Unido)	rs35502061 / <i>SOGA2P1</i> , rs34053895, rs35518298, rs34399104, rs66828456 / <i>LINC00348</i> , rs35256367, <i>ATP10A</i>	Docherty et al., 2019
Intento suicida	Infinium PsychArray BeadChip / Illumina OMEX, COEX, 6.0 / Affymetrix	1,622 casos y 8,786 controles con DM; 3,264 casos y 5,500 controles con TB; 1,683 casos y 2,946 con SZ	Caucásica	rs138689899 / <i>MYO7B</i>	Mullins et al., 2019
Intento suicida	Infinium PsychArray BeadChip / Illumina	37 casos y 155 controles	Latina (México)	rs561361616, rs1537577, rs11198999 / <i>RGS10</i> , rs11041981, rs11041993, rs11041994, rs11041995, rs11041997, rs10840083, rs10769918 / <i>STK33</i>	González-Castro et al., 2019
Severidad de intentos suicidas	HumanOmni-Quad v1.0 array HumanCore Exome array / Illumina	1,131 individuos con intento suicida y 5,189 controles	Caucásica y Afroamericanos (EUA)	rs1677091 / <i>LDHB</i> en caucásicos. rs683813 / <i>ARNTL2</i> , rs72740082 / <i>CTXND1</i> rs11876255 / 18q12.3	Levey et al., 2019
Muerte por suicidio	Human OmniExpress BeadChip, HumanOmniExpress Exome BeadChip / Illumina	746 casos and 14,049 controles	Asiática (Japón)	Sin asociación	Otsuka et al., 2019



Intento e ideación suicida, muerte por suicidio	UK BiLEVE Axiom y UK Biobank Axiom arrays / Affymetrix	2,666 con intento suicida, 21,063 con idea de minusvalía de la vida, 13,038 con ideación suicida, 2,498 con autolesión no suicida, 137 fallecidos por suicidio, 83,557 controles).	Caucásica (Reino Unido)	SNV asociados con comportamiento suicida: rs62535711 / ZCCHC7, rs598046 / CNTN5, rs7989250 / 13q21.31	Strawbridge et al., 2019
---	--	--	-------------------------	---	--------------------------

Abreviaturas: Pacientes con depresión mayor (DM); Pacientes con trastorno bipolar (TB); Pacientes con esquizofrenia (SZ); Variante de número de copias (CNV); Variante de un solo nucleótido (SNV); Ideación suicida asociada a tratamiento con antidepresivos (TESI); Estados Unidos de América (EUA).

\*Diecinueve genes involucrados en neurodesarrollo, adhesión celular, regulación de proliferación celular y transmisión del impulso nervioso

\*\*Genes involucrados en organización celular, respuesta inmune, neurodesarrollo y apoptosis

### *Adversidad en edad temprana*

La exposición a experiencias negativas a una edad temprana, como el abuso sexual y físico, aumenta significativamente el riesgo de muerte por suicidio y conducta suicida de un individuo (Turecki, 2017; Santa Mina et al., 1998). La prevalencia a lo largo de la vida para intento e ideación suicida en individuos con abuso físico ha sido estimada en 11.7% y 36.6%, respectivamente. Mientras que, para individuos con antecedentes de abuso sexual, la prevalencia a lo largo de la vida para intento e ideación suicida asciende a 14.8% y 49.6%, respectivamente (Brezo et al., 2008).

Hay evidencia de que la adversidad a edad temprana se encuentra asociada a cambios epigenéticos en genes del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, lo que conduciría a una desregulación de la respuesta frente al estrés (Turecki et al., 2012). Esta desregulación se puede manifestar por medio de rasgos de ansiedad e impulsividad en individuos con el antecedente de adversidad a edad temprana (van der Vegt et al., 2009).

### *Rasgos de personalidad y estilos cognitivos*

Los rasgos de personalidad son estilos emocionales, conductuales, motivacionales e interpersonales que los seres humanos poseen para relacionarse con otros individuos (Turecki et al., 2012; Brezo, Paris & Turecki, 2006; McCrae & Costa, 1997). Ciertos rasgos de personalidad se han encontrado asociados con la conducta suicida.

El neuroticismo o inestabilidad emocional, la ansiedad y el psicoticismo (vulnerabilidad a conductas impulsivas y/o agresivas) se han encontrado asociados con la ideación e intento suicida (Farmer et al., 2001; Fanous et al., 2004; Statham et al., 1998; Goldston et al., 1996; Nordstrom, Schalling & Asberg, 1995; Mann et al., 1999; Beautrais, Joyce & Mulder, 1999; Benjaminsen, Krarup & Lauritsen, 1990; Verkes et al., 1996; Stalenheim, 2001; Brezo, Paris & Turecki, 2006). Con respecto a

la muerte por suicidio, se han reportado asociaciones con la desesperanza y la impulsividad (Brown et al., 2000; Ernst et al., 2004; Brezo, Paris & Turecki, 2006).

Así como hay rasgos de personalidad que representan factores de riesgo para la conducta suicida, también se han identificado rasgos que pudieran ser protectores para este comportamiento, tal es el caso de la extroversión (Farmer et al., 2001; Kumar et al., 2003; Lester, 1987; Lolas, Gómez & Suarez, 1991; Brezo, Paris & Turecki, 2006).

Por otro lado, los estilos cognitivos se han definido como patrones predecibles de aprendizaje y procesamiento de la información (Sheehy & O'Connor, 2002; Dunn & Dunn, 1978; Cornett, 1983). Deficiencias en la toma de decisiones, fluidez verbal y tiempo de reacción han sido asociadas con ideación e intento suicida en individuos con trastornos del estado del ánimo (Richard-Devantoy, Berlim & Jollant, 2014).

También se ha sugerido una modulación alterada de la atribución de valor a eventos externos, que estaría manifestada por una mayor sensibilidad al ambiente y un procesamiento anormal de la toma de decisiones (Jollant et al., 2011). Esta valoración alterada se manifestaría como dificultad de evaluar adecuadamente situaciones de riesgo en los individuos con comportamiento suicida (Jollant et al., 2011).

### ***Neurobiología del suicidio***

El impacto de los factores distales mencionados anteriormente sobre las tendencias suicidas se ha hipotetizado que se encuentra mediado por cambios a nivel neurobiológico (Lutz, Mechawar, & Turecki, 2017; Van Heeringen & Mann, 2014). Las alteraciones a nivel neurobiológico identificadas en individuos con comportamiento suicida pueden ser consideradas como fenotipos intermedios entre los cambios epigenéticos y genéticos y la manifestación del comportamiento suicida (Lutz, Mechawar, & Turecki, 2017).

La patología del suicidio ocurre en el cerebro. Por lo que los estudios *post mortem* en tejido cerebral de individuos que murieron por suicidio han permitido una mejor comprensión de los factores neurobiológicos involucrados en el comportamiento suicida. A diferencia de estudios anteriores basados en tejidos periféricos, la investigación en tejido cerebral permite una visión directa de las anomalías neurobiológicas asociadas con el suicidio (Furczyk et al., 2013). Así mismo, hasta el momento no existen modelos animales que reproduzcan con fidelidad el comportamiento suicida (Malkesman et al., 2009). El cerebro no es directamente accesible en individuos vivos, por lo que las alteraciones neurobiológicas en individuos vivos se han limitado a estudios de neuroimagen.

## Estudios de neuroimagen en suicidio

Los estudios de neuroimagen han demostrado alteraciones a nivel estructural y funcional en varias áreas cerebrales, por lo que se han asociado dichas áreas con la vulnerabilidad al comportamiento suicida (Bani-Fatemi et al., 2018), tal es el caso de la corteza prefrontal, los ganglios basales y la amígdala (Tabla 4).

**Tabla 4. Estudios de neuroimagen realizados en pacientes con conducta suicida**

Fenotipo estudiado	Tamaño de muestra	Resultados	Referencia
<b>a) Resonancia magnética estructural</b>			
IS en pacientes con DM	IS-DM (20), DM (20)	Mayor cantidad de hiperintensidades de la materia gris (especialmente en ganglios basales) en los sujetos con antecedente de IS vs. el otro grupo	Ahearn et al., 2001
	IS-DM (62), DM (40)	Mayor cantidad de hiperintensidades de la materia blanca en sujetos con antecedente de IS vs. el otro grupo	Ehrlich et al., 2005
	IS-DM (44), DM (55)	Mayor cantidad de hiperintensidades de la materia blanca periventricular en sujetos con IS previo vs. el otro grupo	Pompili et al., 2008
	IS-DM (7), DM (10), C (17)	Menor volumen de corteza orbitofrontal y mayor volumen en amígdala derecha en sujetos con IS vs. otros grupos	Monkul et al., 2007
	IS-DM (27), DM (43), C (26)	Menor volumen de materia blanca y gris en región frontal, especialmente en CPFDL, región temporal, ínsula y cerebelo en sujetos con antecedente de IS vs. otros grupos	Hwang et al., 2010
	IS-DM (13), DM (20), C (19)	Menor volumen en el putamen en sujetos con IS vs. otros grupos	Dombrovski et al., 2012
	IS-DM (28), DM (31), C (41)	Menor volumen de materia gris en el giro temporal derecho en sujetos con IS vs. otros grupos.	Pan et al., 2015
	IS-DM (451), DM (650), C (1996)	Sin diferencias significativas, tendencia a menor volumen de estructuras subcorticales en sujetos con IS vs. otros grupos	Rentería et al., 2017
IS en pacientes con TB	IS-TB (10), TB (10), C (27)	Sin diferencias entre los grupos en el área del cuerpo calloso	Matsuo et al., 2010
	IS-TB (19), TB (38), C (9)	Menor volumen de materia gris en CPFDL, COF, ganglios basales, CCA y giro temporal superior en sujetos con IS vs. otros grupos	Benedetti et al., 2011
	IS-TB (14), TB (15), C (15)	Menor anisotropía en materia blanca de COF izquierda en sujetos con IS vs. otros grupos	Mahon et al., 2012

	IS-TB (51), TB (42)	Mayor volumen de materia gris en CPF en sujetos con IS que recibieron tratamiento	Lijffijt et al., 2014
IS en pacientes con SZ	IS-SZ (14), SZ (36), C (50)	Mayor volumen de amígdala derecha en sujetos con IS vs. otros grupos	Spoletini et al., 2011
	IS-SZ (14), SZ (36), C (50)	Grosor cortical disminuido en CPFDL y giro temporal superior derechos en sujetos con IS vs. otros grupos	Besteher et al., 2016
IS en pacientes con PL	IS-PL (44), PL (24)	Menor volumen en ínsula izquierda, en pacientes con IS de alta letalidad se reportó menor volumen de giro temporal superior, COF, ínsula y giro fusiforme en sujetos con IS vs. otros grupos	Soloff et al., 2012
	IS-PL (51)	Letalidad inversamente correlacionada con volumen de materia gris en áreas fronto-temporal-límbicas	Soloff et al., 2014
IS en pacientes con DP	IS-DP (148), DP (341), C (262)	Menor volumen de materia gris en giro temporal superior e inferior bilateral, tálamo, regiones frontales en sujetos con IS vs. otros grupos	Giakoumatos et al., 2013
IS en general	IS (67), CP (82), C (82)	Menor volumen en CPFV, COF y CPFDL en sujetos con IS. Correlación de letalidad de último IS, número de intentos y edad del primer intento suicida con volumen de CPFDL	Ding et al., 2015
	IS (43), CP (110)	Hiperintensidades en materia blanca, especialmente en lóbulo parietal derecho asociadas a IS.	Ehrlich et al., 2004
<b>b) Resonancia magnética funcional</b>			
IS en pacientes con DM	IS-DM (13), DM (14), C (16)	Mayor reactividad a los rostros enojados en la COF derecha; disminución de la reactividad en la CPFDL derecha en sujetos con IS vs. otros grupos	Jollant et al., 2008
	IS-DM (13), DM (12)	Disminución de la activación durante decisiones de riesgo en la COF izquierda y la corteza occipital en sujetos con IS vs. otros grupos	Jollant et al., 2010
	IS-DM (15), DM (15), C (14)	Activación diferencial de CCA derecha durante inhibición en sujetos con IS vs. otros grupos	Pan et al., 2011
	IS-DM (14), DM (15), C (15)	Mayor actividad en CCA, CPFDL, corteza sensorial y temporal primaria en sujetos con IS vs. otros grupos	Pan et al., 2013a
	IS-DM (15), DM (14), C (13)	Mayor activación del núcleo caudado izquierdo en sujetos con IS vs. otros grupos durante decisiones de bajo riesgo.	Pan et al., 2013b
	IS-DM (15), DM (18), C (20)	Señal de recompensa debilitada en la CPFVM en sujetos con IS vs. otros grupos	Dombrovski et al., 2013

	IS-DM (27), DM (10), C (57)	Mayor amplitud de la fluctuación de baja frecuencia en el giro temporal superior derecho y menor en la CPFVM derecha en sujetos con IS vs. otros grupos	Fan et al., 2013
	IS-DM (7), DM (13), C (21)	Mayor conectividad funcional entre giro precentral derecho y hemisferio izquierdo en sujetos con IS vs. otros grupos.	Marchand et al., 2013
	IS-DM (35), DM (18), C (47)	Mayor amplitud de la fluctuación de baja frecuencia en el giro temporal superior derecho, giro temporal medio izquierdo y giro occipital medio izquierdo en sujetos con IS vs. otros grupos	Cao et al., 2016
	IS-DM (36), DM (41), C (28)	Menor actividad de la ínsula izquierda y el giro la circunvolución supramarginal en sujetos con IS vs. otros grupos	Olie et al., 2017

Abreviaturas: Intento suicida (IS); Controles sanos (C); Pacientes con depresión mayor (DM); Intento suicida en pacientes con depresión mayor (IS-DM); Pacientes con trastorno bipolar (TB); Intento suicida en pacientes con trastorno bipolar (IS-TB); Pacientes con esquizofrenia (SZ); Intento suicida en pacientes con esquizofrenia (IS-SZ); Pacientes con trastorno de personalidad limítrofe (PL); Intento suicida en pacientes con trastorno de personalidad limítrofe (IS-PL); Pacientes con desordenes psicóticos (DP); Intento suicida en pacientes con desordenes psicóticos (IS-DP); Controles psiquiátricos (CP); Corteza prefrontal (CPF); Corteza prefrontal dorsolateral (CPF DL); Corteza orbitofrontal (COF); Corteza prefrontal ventral (CPFV); Corteza prefrontal ventromedial (CPFVM); Corteza del cíngulo anterior (CCA).

### ***Alteraciones epigenéticas en el cerebro de suicidas***

La exposición a eventos adversos durante la vida temprana puede conferir efectos biológicos y conductuales duraderos, estos efectos pueden estar mediados por factores epigenéticos. Los factores epigenéticos son los cambios heredables en el ácido desoxirribonucleico (DNA) e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos pero que, al modificar la estructura y condensación de la cromatina, actúan como moduladores de la expresión génica (García et al., 2012). Estos cambios incluyen la metilación del DNA y modificaciones de las histonas (de la Torre, 2017).

La metilación del DNA es la modificación epigenética más conocida. Consiste en la adición de un grupo metilo por una DNA metiltransferasa a un nucleótido de citosina que se encuentra junto a un nucleótido de guanina unidos por un fosfato, conocido como sitio CpG (Haghighi et al., 2014; Egger et al., 2004; Jones & Baylin, 2002; Robertson, 2002; Simmons, 2008).

La metilación del DNA es un mecanismo regulatorio de la expresión génica. El efecto de la metilación del DNA en la expresión génica varía según la región genómica donde ocurre, por ejemplo, la metilación del DNA en regiones promotoras o en secuencias potenciadoras de la transcripción (*enhancers*) se encuentra asociada a la represión génica. Mientras que la metilación del DNA en el cuerpo del gen podría tener el efecto contrario (Jones, 2012).

Las regiones diferencialmente metiladas (*DMR*, por sus siglas en inglés) son regiones genómicas que incluyen sitios CpG adyacentes o cercanos. Las *DMR* presentan diferentes patrones de metilación entre distintas muestras (células, tejidos o individuos) y son consideradas como regiones funcionales involucradas en la regulación de la expresión génica (Docherty et al., 2014; Neidhart, 2016).

Por otro lado, las histonas son componentes primarios de la cromatina, el complejo de DNA y proteínas que forma los cromosomas. Las modificaciones post-traduccionales de las histonas por medio de metilación, acetilación y fosforilación influyen en la disposición de la cromatina, lo que, a su vez, modula la expresión génica (Simmons, 2008).

La metilación de histonas consiste en la adición de uno a tres grupos metilo en aminoácidos lisina o arginina, muy específicos, que se encuentran en cada histona. Esta reacción es catalizada por las metiltransferasas de histonas (Cheriyedath, 2017). La metilación de histonas puede promover o silenciar la expresión génica dependiendo de la posición y estado de la metilación (Black, Van Rechem & Whetstine, 2012; Hyun et al., 2017). En general, se considera que la metilación en las histonas H3K4, H3K36 y H3K79 (H3K4me, H3K36me y H3K79me, respectivamente) está involucrada en la transcripción activa de genes, mientras que H3K9me, H3K27me y H4K20me se asocian con el silenciamiento de la expresión génica (Hyun et al., 2017).

La acetilación de las histonas consiste en la adición de un grupo acetilo a residuos de lisina específicos de la proteína por medio de acetiltransferasas de histonas (Cheriyedath, 2017). La acetilación de histonas generalmente se asocia con regiones de eucromatina, y por lo tanto el DNA es accesible a los factores de la transcripción, lo que promueve la expresión génica; mientras que la desacetilación generalmente se asocia con la heterocromatina (Cheriyedath, 2017; Simmons, 2008).

La fosforilación de histonas consiste en la adición de un grupo fosfato en residuos de serina, treonina o tirosina de las histonas. Esta reacción es catalizada por cinasas de histonas (Cheriyedath, 2017). Las funciones más conocidas de la fosforilación de histonas ocurren durante la respuesta celular al daño del DNA, la remodelación de la cromatina durante la división celular y la apoptosis (Rossetto, Avvakumov, & Côté, 2012).

Existe evidencia de que las alteraciones epigenéticas pueden contribuir a la patología del suicidio (Turecki, 2012; Labonte & Turecki, 2010). Entre las alteraciones epigenéticas estudiadas en suicidio se encuentran la hiper-metilación de los promotores y regiones intragénicas de genes involucrados en neurotransmisión, neurodesarrollo, eje hipotálamo-pituitaria-adrenal y poliaminas. También se han encontrado modificaciones a histonas como cambios en la metilación de H3K27, como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. Alteraciones epigenéticas identificadas en tejido cerebral de suicidas**

Sistema biológico	Gen	Metodología/Plataforma	Tamaño de muestra	Hallazgos	Referencia
<b>a) Metilación</b>					
Neurotransmisores	Subunidad alfa-1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico ( <i>GABAA α1</i> )	PCR cuantitativo	20 casos y 23 controles	Hipermetilación del promotor en la CFT de suicidas	Poulter et al., 2008
	Subunidad 2 del tipo de kainato del receptor ionotrópico de glutamato ( <i>GRIK2</i> )	Pirosecuenciación	22 casos y 17 controles	Hipermetilación de regiones intragénicas en la CPF de suicidas	Nagy et al., 2015
Neurotrofinas	Isoforma truncada del receptor de tropomiosina relacionado a la cinasa B ( <i>TRKB.T1</i> )	Pirosecuenciación	28 casos y 11 controles	Hipermetilación del promotor en la CPF de suicidas	Ernst et al., 2009
	Isoforma truncada del receptor de tropomiosina relacionado a la cinasa B ( <i>TRKB.T1</i> )	Microarreglos / Agilent	11 casos y 13 controles	Hipermetilación de la región 3'UTR en la CPF de suicidas	Maussion et al., 2014
	Factor neurotrófico derivado del cerebro ( <i>BDNF</i> )	Espectrometría de masas acoplada a microarreglos	18 casos y 18 controles	Hipermetilación del promotor en el área de Wernicke de suicidas	Keller et al., 2010
Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal	Receptor de glucocorticoides ( <i>NR3C1</i> )	Pirosecuenciación con bisulfito	12 casos con antecedente de abuso infantil, 12 casos sin antecedente de abuso infantil y 12 controles	Hipermetilación del promotor en el hipocampo de suicidas	McGowan et al., 2009
	Receptor de glucocorticoides ( <i>NR3C1</i> )	Pirosecuenciación	21 casos con antecedente de abuso infantil, 21 casos sin antecedente de abuso infantil y 14 controles	Hipermetilación del promotor en el hipocampo de suicidas (Exón 1C y 1H)	Labonte et al., 2012a
	Proteína asociada al uso y cinetocoro ( <i>SKA2</i> )	Microarreglos / Illumina HM450	46 casos y 122 controles	Hipermetilación de la región 3'UTR en la CPF de suicidas	Guintivano et al., 2014
	Diamina acetiltransferasa 1 ( <i>SAT1</i> )	PCR sensible a metilación	10 casos y 10 controles	Hipermetilación del promotor en la CPF de suicidas	Fiori and Turecki, 2011
Poliaminas	Arginasa tipo II ( <i>ARG2</i> )	PCR sensible a metilación	34 casos y 34 controles	Hipermetilación del promotor en BA44 de suicidas	Gross et al., 2013
	Adenosilmetionina descarboxilasa 1 ( <i>AMD1</i> )	PCR sensible a metilación	34 casos y 34 controles	Hipermetilación del promotor en BA44 de suicidas	Gross et al., 2013
Otros	Alsina ( <i>ALS2</i> )	Microarreglos / 400K Agilent	25 casos con antecedente	Hipermetilación del promotor de genes	Labonte et al., 2012b

			de abuso infantil, 20 casos sin antecedente de abuso infantil y 16 controles	relacionados con plasticidad neuronal siendo el más significativo ALS2	
<b>b) Modificación de histonas</b>					
Neurotrofinas	Isoforma truncada del receptor de tropomiosina relacionado a la cinasa B ( <i>TRKB.T1</i> )	Pirosecuenciación	28 casos y 11 controles	Aumento de H3K27me3 en la COF de suicidas	Ernst et al., 2009
Poliaminas	Antizima de la ornitina descarboxilasa ( <i>OAZ1</i> ), Diamina acetiltransferasa 1 ( <i>SAT1</i> ), Espermina sintasa ( <i>SMS</i> ), Espermina oxidasa ( <i>SFOX</i> )	PCR sensible a metilación	34 suicidas	Aumento de H3K27me3 en la CPF de suicidas	Fiori et al., 2012

Abreviaturas: Área de Brodmann (AB); Corteza frontotemporal (CFT); Corteza prefrontal (CPF); Corteza orbitofrontal (COF); Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### ***Alteraciones en la expresión génica en el cerebro de suicidas***

La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos transforman la información codificada en el DNA en las proteínas necesarias para su adecuado desarrollo y funcionamiento. Este proceso está altamente regulado y está influido por factores ambientales y genéticos, a través de factores epigenéticos y *loci* genómicos, respectivamente.

La expresión génica es el principal fenotipo detectable en el desarrollo de rasgos complejos (McKenzie et al., 2014), como lo es el comportamiento suicida. Los niveles de expresión génica actúan como un fenotipo intermedio entre la arquitectura genética y los rasgos multifactoriales observables (McKenzie et al., 2014). Por lo anterior, los estudios de expresión génica en el cerebro de individuos que murieron por suicidio han aportado información relevante sobre la neurobiología de esta condición.

Los estudios de transcriptoma completo que se han realizado por medio de microarreglos y recientemente en tecnologías con secuenciación de ácido ribonucleico (RNA) han identificado alteraciones en la expresión de genes involucrados en distintos sistemas de neurotransmisores, como el serotoninérgico, GABAérgico y glutamatérgico, así como en la síntesis de poliaminas y adhesión celular como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6. Estudios de expresión génica en tejido cerebral de suicidas**

Área estudiada	Plataforma de microarreglo	Grupos y tamaño de muestra	Población	Hallazgos	Referencia
AB 9,47	HG-U133 A	S-DM, C 19, 19	Estadounidense	Sin diferencias significativas	Sibille et al., 2004



Amígdala	HG-U95 A	S, C 14, 15	Japonesa	Asociación de dos alelos (rs1532976 y rs3752826) del gen 14-3-3 ε con suicidio consumado	Yanagi et al., 2005
AB11	HG-U133 A/B	S-DM, C 6, 6	Canadiense	Mayor expresión del gen <i>HRT2A</i> en suicidas	Gwadry et al., 2005
AB 9/46, 24	HG-U95 Av2	S-DM, S-TB, C 9, 6, 7	Estadounidense	Menor expresión de <i>SLC1A2</i> , <i>SLC1A3</i> y de glutamato-amonio ligasa y mayor expresión de subunidades de receptores para GABA y glutamato en suicidas	Choudary et al., 2005
AB 4, 8/9,11	HG-U133 A/B	S-DM, S, C 16, 8, 12	Canadiense	Menor expresión de <i>SSAT</i> en suicidas vs. los otros grupos	Sequeira et al., 2006
Amígdala, hipocampo, AB 24, 29	HG-U133 A/B	S-DM, S, C 18, 8, 13	Canadiense	Expresión diferencial de <i>SSAT1</i> (AB 29), <i>SSAT2</i> , <i>OATL1</i> , <i>SYT4</i> , <i>ADCY8</i> (hipocampo), <i>APLP2</i> (amígdala) y <i>BACE1</i> (AB 24) entre suicidas y no suicidas	Sequeira et al., 2007
AB 46/10	HG-U133 A	S-TB, TB, S-SZ, SZ 22, 23, 10, 35	Estadounidense	Expresión diferencial de <i>PLSCR4</i> y <i>EMX2</i> entre suicidas y no suicidas	Kim et al., 2007
AB 10	HG-U95 Av2	S-DM, S-SZ, BD-S, C	Alemana	Expresión diferencial de <i>CAD</i> y <i>ATP1A3</i> entre suicidas y no suicidas	Tochigi et al., 2008
AB 44, 45, 46, 47	HG-U133 A/B	S-DM, S, C 16, 10, 13	Canadiense y alemana	Menor expresión de <i>SAT1</i> en suicidas vs. no suicidas	Klempan et al., 2009
AB 8/9, 11 y 47	HG-U133 A	S-DM, DM, C 15, 7, 13	Canadiense	Menor expresión de la desaturasa-1 de ácidos grasos ( <i>FADS1</i> ), receptor de leptina ( <i>LEPR</i> ), fosfoinositol-3cinasa ( <i>PIK3C2A</i> ) y stereoaril-CoA desaturasa ( <i>SCD</i> ) en suicidas vs. no suicidas	Lalovic et al., 2010
17 regiones corticales y subcorticales	HG-U133 A/B	S-DM, DM, C 16, 10, 13	Canadiense	Alteración en la expresión de subunidades de receptores para GABA y glutamato en suicidas vs. no suicidas	Sequeira et al., 2009
AB4, 6, 10, 11, 44, 45, 46, 47, 8/9 y cerebelo	HG-U133 Plus 2.0	S, C 28, 11	Canadiense	Menor expresión de <i>TrkB.T1</i> en la CPF en una subpoblación de suicidas vs. no suicidas	Ernst et al., 2009

AB 44, 45, 46 y 47	HG-U133 A/B	S-DM, S, C 16, 10, 13	Canadiense	Alteraciones en la expresión de genes relacionados en la neurotransmisión GABAérgica en suicidas vs. no suicidas	Klempner et al., 2009
AB 9, 10, 11, 44, 45, 46, y 47	HG-U133 Plus 2.0	S, N-S 8, 20	Canadiense	Menor expresión de Cx30 y 43 en la CPFDL en suicidas vs. no suicidas	Ernst et al., 2011
AB 46	HGU95 Av2, HG-U133 A, HG-U133 B, o HG-U133 plus 2	S, N-S 46, 38	Estadounidense	Los niveles de expresión de <i>CAMK2B</i> , <i>CDK5</i> , <i>MAPK9</i> y <i>PRKCI</i> fueron mayores en la CPF de suicidas vs. no suicidas	Choi et al., 2011
AB 4, 6, 8/9, 10, 11, 20, 21, 24, 29, 38, 44, 45, 46, 47, amígdala, cerebelo, hipocampo, hipotálamo, núcleo accumbens, tálamo anterior, lateral y dorsomedial.	HG-U133 Plus 2.0	S, N-S 29, 16	Canadiense	Alteración en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de las poliaminas en suicidas vs. no suicidas	Fiori et al., 2011
CPFDL	Diferentes microarreglos	S, N-S 56, 61	Estadounidense	Menor expresión de p11 en suicidas en CPFDL (meta-análisis) vs. no suicidas	Zhang et al., 2011
CPFDL, núcleo accumbens y CCA	HG-U133 Plus 2.0	S, N-S 15, 6	Estadounidense	Menor expresión de <i>5-HT2A</i> y algunos miembros de la familia de las metaloproteinasas MT 1 y 2 en suicidas vs. no suicidas	Sequeira et al., 2012
Corteza frontotemporal	HG-U133 Plus 2.0	S-DM, N-S 10, 9	Caucásica (Hungría)	Alteración de la expresión de genes implicados en la sinapsis, citoarquitectura y adhesión celular en suicidas vs. no suicidas	Zhurov et al., 2012
AB 9 Y 24 (CCA)	HG-U133 Plus 2.0	S-DM, S 18, 21	Caucásica	Menor expresión de <i>CD44</i> en ambas regiones.	Galfalvy et al., 2013
AB9	RNA-seq	DM, S-DM, C 9, 21, 29	Estadounidense	Menor expresión de <i>SAT1</i> en S-DM vs. los otros grupos	Pantazatos et al., 2015
AB9	RNA-seq	DM, S-DM, C 9, 21, 29	Estadounidense	Menor expresión de <i>GABRG2</i> en suicidas vs. los otros grupos	Yin et al., 2016a
AB9	RNA-seq	DM, S-DM, C 9, 21, 29	Estadounidense	Menor expresión de <i>NR3C1</i> en suicidas vs. los otros grupos	Yin et al., 2016b

AB9	RNA-seq	DM, S-DM, C 9, 21, 29	Estadounidense	Alteración en expresión de genes relacionados con actividad ATPasa en suicidas vs. los otros grupos	Pantazatos et al., 2017
-----	---------	--------------------------	----------------	--	----------------------------

Abreviaturas: Suicidas (S); Controles (C); No suicidas (N-S); Sujetos con depresión mayor (DM); Sujetos con trastorno bipolar (TB); Sujetos con esquizofrenia (SZ); Suicidas con depresión mayor (S-DM); Suicidas con esquizofrenia (S-SZ); Suicidas con trastorno bipolar (S-TB); Área de Brodmann (AB); Corteza prefrontal dorsolateral (CPF DL); Corteza prefrontal (CPF); Corteza del cíngulo anterior (CCA); Secuenciación de RNA (RNA-seq)

### ***Factores moderadores***

Los factores moderadores son variables que modifican la intensidad y/o dirección de la relación entre dos variables (Turecki et al., 2012). Por lo que, estos factores modulan la relación entre factores distales y proximales en la patología del suicidio.

#### *Sexo*

Es de destacar que las tasas de suicidio varían sustancialmente según el sexo. La última tasa de suicidios reportada en 2016 fue de 15.0 suicidios masculinos y 8.0 suicidios femeninos por cada 100,000 habitantes a nivel global (OMS, 2017).

Con pocas excepciones, los hombres se suicidan más que las mujeres en casi todos los países del mundo (OMS, 2017). Dentro de las posibles explicaciones a este fenómeno se encuentran la desigualdad de género, diferencias en los métodos socialmente aceptables para lidiar con el estrés, la prevalencia del trastorno por uso de sustancias y diferencias en las tasas de búsqueda de tratamiento para los trastornos mentales entre hombres y mujeres (OMS, 2015; Chang et al., 2018).

Además, un meta-análisis reciente, demostró que la mayor prevalencia de trastornos externalizantes, como la agresividad, falta de atención, desobediencia y conducta delictiva y la preferencia por métodos altamente letales son factores de riesgo específicos para la muerte masculina por suicidio. Mientras que las mujeres son más propensas a presentar trastornos internalizantes, que se refieren a las manifestaciones de comportamientos ansiosos, depresivos y problemas somáticos (Miranda-Mendizábal et al., 2019; Alarcón Parco & Bárrig JÓ, 2015).

#### *Religión*

Con respecto a la religión, se han obtenido resultados inconsistentes sobre la asociación entre religión y suicidio. Algunos estudios han reportado tasas de suicidio más bajas entre los individuos con alguna afiliación religiosa, mientras que algunos otros han encontrado que esta podría representar un factor de riesgo para suicidio (Lawrence et al., 2016).

Por lo anterior, se ha sugerido que su asociación con el suicidio depende de varios factores, como doctrina religiosa, afiliación y participación (Lawrence, Oquendo & Stanley, 2016). Una reciente revisión sistemática concluyó que la afiliación religiosa y la asistencia a servicios religiosos eran factores protectores para el intento suicida, más no para la ideación suicida (Lawrence, Oquendo & Stanley, 2016).

La religión pudiera actuar como un factor protector contra el comportamiento suicida porque puede ayudar a los individuos a sobrellevar mejor el estrés, reducir la incidencia de depresión y abuso de sustancias, a mejorar el apoyo social y proporcionar fuentes de esperanza (Cook, 2014; Koenig et al., 2012).

### *Apoyo social*

El apoyo social es cualquier acción que lleva a un individuo a creer que es atendido, amado, estimado y miembro de una red de obligaciones mutuas (Cobb, 1976). Este factor se ha asociado a un menor riesgo de ideación e intento suicida (Kleiman & Liu, 2013; Chioqueta & Stiles, 2007). El efecto protector del apoyo social puede mediar por la presencia de otros individuos que pudieran ayudar a enfrentar eventos estresantes y dificultades asociadas con la psicopatología, así como la impulsividad, lo que puede reducir el riesgo de suicidio (Kleiman & Liu, 2013; Kleiman et al., 2012).

### *Otros factores demográficos*

Otros factores demográficos que se han asociado con la conducta suicida son la ocupación, el estatus de empleo y el estado marital (Mink et al., 2015; Stack, 2001; Voss et al., 2004). Se han encontrado mayores tasas de suicidio en individuos que desempeñan ciertas profesiones como veterinarios, farmacéuticos, dentistas, médicos, enfermeras, militares y granjeros (Hawton et al., 2011; Roberts, Jaremin & Lloyd, 2013; Mink et al., 2015; Mahon et al., 2005).

Se ha identificado que el acceso a un medio para cometer suicidio (productos farmacéuticos o armas de fuego) y la exposición a condiciones de trabajo estresantes son determinantes importantes de las tasas de suicidio en la mayoría de las ocupaciones con alto riesgo suicida (Roberts, Jaremin & Lloyd, 2013; Mann et al., 2005; Mahon et al., 2005; Milner et al., 2013; Nishimura et al., 2004).

El desempleo, particularmente durante más de seis meses y la jubilación temprana se han asociado con un mayor riesgo de suicidio (Schneider et al., 2011). Entre las posibles explicaciones para esta asociación se encuentran que el desempleo podría aumentar el impacto de los eventos estresantes de la vida, así como el riesgo de factores precipitantes de una crisis suicida, como las enfermedades mentales y dificultades financieras (Blakely, Collings & Atkinson, 2003). Además, la falta de independencia económica como resultado del desempleo podría reducir la posibilidad

de utilizar los servicios sociales y de salud de manera adecuada, lo cual podría dificultar el tratamiento de los trastornos mentales, en caso de haberlos (Preti, 2003).

Se ha encontrado que los individuos casados presentan menores tasas de suicidio en comparación con aquellos individuos solteros, divorciados y viudos (Smith, Mercy & Conn, 1988; Kposowa, 2000). Se ha sugerido que el matrimonio proporciona estabilidad social y emocional, además de brindar integración social, cohesión comunitaria y reducir el aislamiento social (Kposowa, Breault & Singh, 1995; Breault, 1986; Kposowa, 2000). Lo anterior mediaría el efecto protector del matrimonio contra el suicidio.

### ***Factores proximales***

#### *Eventos recientes*

Los eventos recientes de la vida que confieren estrés agudo pueden actuar como desencadenantes del suicidio (Yen et al., 2005). Esta asociación ha sido identificada en estudios de autopsia psicológica para eventos ocurridos en los tres meses previos al suicidio, particularmente una semana previa (Cooper et al., 2002). Entre los eventos temporalmente asociados al suicidio se encuentran el rechazo social (Cheek et al., 2020), separación de la pareja sentimental (Cupina, 2009), otros conflictos interpersonales, problemas legales y financieros (Beautrais et al., 1997).

Las experiencias de desastres naturales, guerras y conflictos civiles también pueden aumentar el riesgo de suicidio debido a su impacto en el bienestar social, la salud, la vivienda, empleo y seguridad financiera (OMS, 2015). Paradójicamente, las tasas de suicidio pueden disminuir durante e inmediatamente después de un desastre o conflicto, pero esto varía entre diferentes grupos de personas. Esta disminución puede deberse a las necesidades emergentes para intensificar la cohesión social (OMS, 2015).

#### *Desesperanza*

La desesperanza es un aspecto cognitivo que se caracteriza por la presencia de atribuciones negativas sobre el futuro y la impotencia para mejorar las perspectivas futuras (David Klonsky et al., 2012). Se ha identificado a la desesperanza como un factor predictor de futura conducta suicida, incluyendo ideación suicida, intento suicida y muerte por suicidio (Kuo, Gallon & Eaton, 2004; David Klonsky et al., 2012). Recientemente se ha sugerido que su papel como predictor de la conducta suicida podría limitarse únicamente a una asociación con la ideación suicida (Qiu, Klonsky & Klein, 2017). Por lo anterior, son necesarios más estudios para aclarar la participación de la desesperanza dentro de la conducta suicida.

### *Antecedentes de comportamiento suicida*

Un antecedente personal de intento suicida es el factor predictivo con mayor asociación a muerte por suicidio (Hawton & Heeringen 2009; Jollant et al., 2011). Se ha sugerido que las categorías dentro del comportamiento suicida representan un espectro continuo (Have et al., 2009). Además, se ha identificado una transición entre estas categorías, por ejemplo, un estudio reportó que el 60% de las transiciones de ideación suicida a intento de suicidio ocurrieron dentro del primer año de inicio de la ideación (Nock et al., 2008).

### *Psicopatología*

Varios estudios de autopsia psicológica han confirmado la asociación entre el suicidio y la presencia de trastornos mentales. La conocida revisión de Fleischmann et al. (2005), reportó que el 88.6% de los individuos que fallecieron por suicidio sufría al menos un trastorno mental, siendo los trastornos del estado de ánimo el diagnóstico más frecuente (42.1%), seguidos muy de cerca por el trastorno por uso de sustancias (TUS) (Fleischmann et al., 2005). Recientemente se han reportado tasas similares de enfermedades mentales entre individuos que murieron por suicidio (Cho et al., 2016; Turecki & Brent, 2016).

## **Suicidio y trastorno por uso de sustancias**

### ***Trastorno por uso de sustancias: generalidades***

El trastorno por uso de sustancias (TUS) es el consumo problemático de una sustancia que provoca un deterioro o malestar clínico significativo. La característica esencial de este trastorno es la asociación de síntomas cognitivos, fisiológicos y de comportamiento que indican que la persona continúa consumiendo la sustancia a pesar de los problemas que esto conlleva (APA, 2013). El diagnóstico de trastorno por consumo de sustancias se puede realizar sobre nueve clases diferentes de drogas: alcohol, cafeína, cannabis, alucinógenos, inhalantes, opiáceos, sedantes hipnóticos y ansiolíticos, estimulantes (sustancias tipo anfetamina, cocaína y otros estimulantes), tabaco, y otras sustancias (o sustancias desconocidas) (APA, 2013).

En la cuarta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) el abuso y la dependencia a sustancias eran dos diagnósticos separados (Hasin et al., 2013; APA, 2002). Para la quinta edición de este manual (DSM-5) los criterios de abuso y dependencia fueron combinados en un solo trastorno, que el trastorno por uso de sustancias. Además, se eliminó el criterio de problemas legales y se añadió el criterio de ansia, anhelo (*craving*) a los criterios diagnósticos de los trastornos por uso de sustancias (Hasin et al., 2013). En la Tabla 7, se muestra un

resumen de los criterios diagnósticos del *DSM-5* para el trastorno por consumo de sustancias.

**Tabla 7. Criterios para los trastornos por uso de sustancias según el *DSM-5***

A. Consumo problemático de una sustancia que provoca un deterioro o malestar clínico significativo y que se manifiesta por al menos 2 de los siguientes 11 hechos, en los últimos 12 meses:

1. Consumo de la sustancia con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo más prolongado de lo previsto.
2. Deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo.
3. Se invierte mucho tiempo en las actividades necesarias para conseguir la sustancia, consumirla o recuperarse de sus efectos.
4. *Craving* a la sustancia, entendido como ansias, un poderoso deseo o necesidad de consumir la sustancia.
5. Consumo de la sustancia que lleva al incumplimiento de las obligaciones
6. Consumo de la sustancia provoca abandono o reducción de actividades
7. Consumo continuado de la sustancia a pesar de tener problemas sociales o interpersonales recurrentes.
8. Consumo recurrente de la sustancia en situaciones que provocan un riesgo físico
9. Consumo de la sustancia a pesar de tener conciencia de los problemas relacionados tanto físicos como psicológicos
10. Tolerancia
11. Abstinencia

Dos o más criterios en un periodo menor o igual a doce meses integran el diagnóstico de trastorno por uso de sustancias.

Modificado de *DSM-5* (APA, 2013).

El TUS es una condición altamente prevalente, ya que se estima que más del dos por ciento de la población mundial tiene algún TUS (Ritchie & Roser, 2019). Además, el uso de sustancias es el principal factor de riesgo de muerte prematura en todo el mundo, ya que estuvo asociado a 11.4 millones de muertes en 2017, superando el número de muertes atribuidas a todos los cánceres (Degenhardt et al., 2018; Roth et al., 2018).

Estudios en familias, gemelos y de adopción han demostrado que la vulnerabilidad a los TUS se encuentra influida por factores genéticos. En general, la heredabilidad de los TUS se ha estimado en 40 a 60% (Hancock et al., 2018). Sin embargo, la heredabilidad de los TUS varía de acuerdo con la sustancia y el sexo, por ejemplo, la heredabilidad para el trastorno por uso de cocaína se ha estimado en 44% para hombres y 65% para mujeres (Swendsen & Le Moal, 2011; Koob & Le Moa, 2006). Mientras que la heredabilidad para el trastorno por uso de opiáceos se ha estimado en un 33% para hombres y en 79% para mujeres; para el trastorno por uso de alcohol es del 49% para hombres y 64% para mujeres (Swendsen & Le Moal, 2011; Koob & Le Moa, 2006).

Los estudios de asociación en TUS han permitido la identificación de variantes y regiones genéticas asociadas a estos trastornos, como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8. Estudios de asociación del genoma completo en suicidio**

Plataforma	Número de participantes	Etnicidad (# individuos estudiados)	Variante / gen o locí asociados	Referencia
<b>a) Trastorno por uso de tabaco</b>				
Illumina Human1M-Duo BeadChip	2,239	Caucásica (437), afroamericana (364), asiática (985), latina (453)	rs115765562 / <i>UGT2B10-UGT2A3</i>	Patel et al., 2015
MetaboChip Affymetrix 6.0	4,548	Caucásica	rs114612145 / <i>UGT2B10</i>	Ware et al., 2016
HumanHap300-HH370, HumanHap550, Illumina 610K-quad, Affymetrix 500k, Perlegen 600k	77,747	Caucásica	rs215605 / <i>PDE1C</i>	Thorgeirsson et al., 2010
HumanHap300-HH370, HumanHap550, Illumina 610K-quad, Affymetrix 500k, Perlegen 600k	77,747	Caucásica	rs6474412 / <i>CHRN3</i>	Thorgeirsson et al., 2010
Illumina Human 1M-Duo beadchip	3,365	Caucásica (2,267); afroamericana (999)	rs1451240 / <i>CHRN3</i>	Rice et al., 2012
Illumina 550K, Affymetrix 6.0, Affymetrix 500K, Illumina, HumanHap300, Perlegen 600K, Illumina HumanHap550	74,053	Caucásica	rs3025343 / <i>DBH</i>	Tobacco and Genetics Consortium, 2010
Illumina 550K, Affymetrix 6.0, Affymetrix 500K, Illumina, HumanHap300, Perlegen 600K, Illumina HumanHap550	74,053	Caucásica	rs6265 / <i>BDNF</i>	Tobacco and Genetics Consortium, 2010
Illumina Omni Express array, Illumina Human1M-Duo array, Illumina Human610K array, Illumina HumanOmni1-Quad array, Illumina HumanHap550v3	38,602	Caucásica (28,677), afroamericana (9,925)	rs910083 / <i>DNMT3B</i>	Hancock, et al., 2018
Illumina 550K, Affymetrix 6.0, Affymetrix 500K, Illumina HumanHap300, Perlegen 600K, Illumina HumanHap550	74,053	Caucásica	rs3733829 / <i>EGLN2</i>	Tobacco and Genetics Consortium, 2010
Affymetrix Axiom array	48,931	Caucásica	rs57342388 / <i>NOL4L</i>	Wain et al., 2015
Illumina HumanHap550v3, Illumina HumanOmni1-Quad, Illumina Human1M-Duo, Illumina Human1M-Duo	17,074	Caucásica	rs2273500 / <i>CHRNA4</i>	Hancock et al., 2015
<b>b) Trastorno por uso de alcohol</b>				
Affymetrix Axiom	110,266	Caucásica (71,071), afroamericana (2,475), asiática (6,064), latina (7,047)	rs1799876 / <i>SERPINC1</i>	Jorgenson et al., 2017
Illumina 318k, Illumina6k, Illumina 370k, Affymetrix250K, Illumina OmniExpress, Human670-QuadCustom Illumina BeadChip, Affymetrix 6.0,	70,460	Caucásica	rs780094 / <i>GCKR</i>	Schumann et al., 2016



Illumina CytoSNP12 v2, Illumina 670k				
Illumina 318k, Illumina6k, Illumina 370k, Affymetrix250K, Illumina OmniExpress, Human670-QuadCustom Illumina BeadChip, Affymetrix 6.0, Illumina CytoSNP12 v2, Illumina 670k	70,460	Caucásica	rs11940694 / <i>KLB</i>	Schumann et al., 2016
Affymetrix UK Biobank Axiom y Affymetrix UK BiLEVE Axiom	112,117	Caucásica	rs11940694 / <i>KLB</i>	Clarke et al., 2017
Affymetrix Axiom	110,266	Caucásica (71,071), afroamericana (2,475), asiática (6,064), latina (7,047)	rs11128951 / <i>SGOL1</i>	Jorgenson et al., 2017
Affymetrix UK Biobank Axiom y Affymetrix UK BiLEVE Axiom	112,117	Caucásica	rs145452708 / <i>ADH1B-ADH1C</i>	Clarke et al., 2017
Affymetrix Axiom	110,266	Caucásica (71,071), afroamericana (2,475), asiática (6,064), latina (7,047)	rs6943555 / <i>AUTS2</i>	Jorgenson et al., 2017
Affymetrix Axiom	110,266	Caucásica (71,071), afroamericana (2,475), asiática (6,064), latina (7,047)	rs671 / <i>ALDH2</i>	Jorgenson et al., 2017
Affymetrix 5.0	1,721	Asiática	rs2074356 / <i>ALDH2</i>	Baik et al., 2011
<b>c) Trastorno por uso de marihuana</b>				
Illumina Human1M	3,053	Caucásica	rs6504555 / <i>BPTF</i> Asociación nominal	Agrawal et al., 2014
317K, HumanCNV370-Quadv3, HumanCNV370v1, Human610-Quad	10,091	Caucásica	Ninguno	Verweij et al., 2013
Illumina HumanHap550, Illumina 610K-quad, Affymetrix 6.0, Illumina, OmniExpress, Illumina Human370CNV, Illumina 670K, Illumina HumanOmni1-Quad, Affymetrix 6.0, Perlegen-Affymetrix 5.0, Illumina 660, Illumina 1M, Illumina 370K	32,330	Caucásica	Ninguno	Stringer et al., 2016
Illumina HumanHap550, Illumina 610K-quad, Affymetrix 6.0, Illumina OmniExpress, Illumina Human370CNV	6,744	Caucásica	Ninguno	Minică et al., 2015
Illumina HumanOmni1-Quad v1.0 Illumina Infinium Human Core Exome	14,754	Caucásica (8,754); afroamericana (6,000)	rs143244591 / <i>RP11-206M11.7</i> , rs146091982 / <i>SLC35G1</i> , rs77378271 / <i>CSMD1</i>	Sherva et al., 2017

d) Trastorno por uso de estimulantes				
Affymetrix GeneChip	580	Asiática	Ninguno	Uhl et al., 2008*
Affymetrix 5.0 y 6.0	1,150	Asiática	Ninguno	Ikeda et al., 2013*
Affymetrix 6.0	381	Caucásica	rs472402 / <i>SRD5A1</i>	Hart et al., 2012
e) Trastorno por uso de opioides				
Infinium assay II	355	Asiática	rs2952768 / 2q33.3 asociado a mayores requerimientos anestésicos	Nishizawa et al., 2014
Illumina HumanOmni1-Quad_v1.0 microarray, Illumina Human Core Exome	1,978	Caucásica (1,437); afroamericana (541)	rs73568641 / <i>OPRM1</i> asociado a dosis terapéutica de metadona en afroamericanos	Smith et al., 2017

\*Metanfetamina

### **Neurobiología de los trastornos por uso de sustancias**

Similar a otros trastornos psiquiátricos, la vulnerabilidad a los TUS es resultado de interacciones complejas entre factores biológicos (genéticos, epigenéticos y neuroanatómicos), factores sociales y ambientales (sistemas sociales y culturales, estrés, trauma, exposición a reforzadores) (Volkow & Boyle, 2018).

En los últimos años, se han caracterizado los cambios neurobiológicos asociados a los TUS. Se han identificado cambios en la estructura y función cerebral que representan una adaptación al consumo continuo de sustancias. Estos cambios neuroadaptativos incluyen una mayor relevancia de los incentivos (consumo de la sustancia), disminución de la recompensa cerebral y aumento del estrés y función ejecutiva comprometida (Uhl, Koob & Cable, 2019).

Estos cambios neuroadaptativos se manifiestan en las tres etapas en las que se ha dividido el ciclo de la adicción:

- i. **Intoxicación aguda.** El individuo consume una sustancia y experimenta sus efectos gratificantes o placenteros. El circuito de recompensa (núcleo accumbens), y el sistema dopaminérgico y de opioides desempeñan un papel clave en los efectos gratificantes de la sustancia utilizada. La liberación de dopamina (junto con la activación del sistema de opioides) y la liberación de glutamato pueden eventualmente desencadenar cambios en el cuerpo estriado dorsal, estructura involucrada en la formación de hábitos (Koob & Le Moal, 1997; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2016).
- ii. **Abstinencia.** El individuo experimenta un estado emocional negativo en ausencia de la sustancia. Esta etapa implica una disminución en la función del sistema de recompensa cerebral y la activación de la respuesta al estrés en la amígdala. Estos fenómenos subyacen al estado emocional negativo asociado

con la abstinencia (Koob & Le Moal, 1997; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2016).

- iii. **Anticipación.** El individuo busca la sustancia nuevamente después de un período de abstinencia. Esta etapa del ciclo de adicción se caracteriza por una interrupción de la función ejecutiva causada por una corteza prefrontal comprometida (Koob & Le Moal, 1997; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2016).

### ***Asociación entre suicidio y trastorno por uso de sustancias***

Una de las principales causas de muerte entre los pacientes con TUS es el suicidio (SAMHSA, 2008). La asociación entre suicidio y TUS ha sido evidenciada por diversos estudios epidemiológicos y de autopsia psicológica (Borges, Walters & Kessler, 2000; Borges & Loera, 2010; Abdalla et al., 2019; Fleischmann et al., 2005; Cho et al., 2016; Turecki & Brent, 2016). Se estima que los individuos con trastorno por uso del alcohol tienen casi diez veces mayor riesgo de morir por suicidio, mientras que los individuos con trastorno de uso a otras sustancias tienen aproximadamente catorce veces mayor riesgo de morir por suicidio en comparación con la población general (Wilcox, Conner & Caine, 2004).

La neurobiología de la asociación entre suicidio y TUS no ha sido aclarada (Yuodelis-Flores & Ries, 2015). Sin embargo, los suicidas con TUS han exhibido alteraciones bioquímicas y estructurales del cerebro (Yuodelis-Flores & Ries, 2015). Dichas alteraciones incluyen un aumento en la densidad de las células gliales en la corteza del cíngulo anterior en los suicidas dependientes del alcohol en comparación con los suicidas que no eran dependientes del alcohol (Hercher et al., 2009).

Del mismo modo, se ha observado una menor actividad de la monoaminoxidasa, una mayor densidad del receptor 1 para cannabinoides y una menor unión del receptor alfa-adrenérgico en la corteza prefrontal de los suicidas con trastorno por uso de alcohol en comparación con individuos no suicidas con el mismo trastorno (Gotttries et al., 1975; Underwood, Mann y Arango, 2004; Vinod et al., 2005).

Aunque los sujetos con TUS tienen un mayor riesgo de conducta suicida, la mayoría de los estudios *post mortem* de expresión génica en suicidio han excluido a este grupo de pacientes, ya que se ha considerado el TUS como un factor confusor (Fiori & Turecki, 2010). El estudio de diferencias en la expresión génica en el cerebro de suicidas con y sin TUS se ha limitado a los genes que codifican para los receptores serotoninérgicos 1A y 2A (*5HT1A*, *5-HT2A*) y el transportador de serotonina (*SERT*) (Thompson et al., 2012). Por lo tanto, se sabe poco sobre la base molecular de la asociación entre el TUS y el comportamiento suicida.

Solo unos pocos estudios de expresión génica *post mortem* en suicidio han incluido individuos con TUS y han utilizado distintos abordajes para el análisis de los datos procedentes de individuos con este trastorno:

- i. identificación de genes cuya expresión está influenciada por el uso de sustancias. Dos estudios identificaron múltiples sondas cuya expresión estuvo influenciada por el uso de alcohol o cocaína en la corteza prefrontal ventral (Klempan et al., 2009), el sistema límbico y el giro cingulado posterior (Sequeira et al., 2007) en suicidas con DM de origen franco-canadiense.
- ii. inclusión de TUS como variable dentro del análisis estadístico. Kim y colaboradores incluyeron el uso de drogas o alcohol en sus modelos estadísticos, sin encontrar una asociación entre el abuso de sustancias y expresión diferencial de genes en el área 46 de Brodmann (Kim et al., 2007).
- iii. análisis del efecto del uso de sustancias en modelos animales. Ernst y colaboradores estudiaron los efectos del alcohol en los genes identificados como expresados diferencialmente en una muestra franco-canadiense más grande y en un modelo murino de uso agudo y crónico de alcohol, descartando que los resultados en el estudio se debieran al uso de sustancias (Ernst et al., 2011).

Estos abordajes han permitido descartar la influencia de TUS en los resultados obtenidos en estos estudios, más no permiten analizar el efecto de la interacción entre TUS y suicidio. El uso de estos métodos es razonable debido al enfoque de la gran mayoría de los estudios *post mortem* de expresión génica en suicidio en otros trastornos psiquiátricos, como el trastorno de depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TB) y esquizofrenia (SZ). Sin embargo, los individuos con TUS, que también presentan alto riesgo suicida deben ser estudiados en el contexto del suicidio para poder entender la asociación entre ambas condiciones.

### ***Corteza prefrontal en suicidio y trastorno por uso de sustancias***

La corteza prefrontal es la región del cerebro responsable de la toma de decisiones, la inhibición y la memoria a corto plazo, funciones que se han encontrado alteradas en individuos con comportamiento suicida (Raust et al., 2007; Richard-Devantoy, Berlim & Jollant, 2014). Los cambios estructurales y funcionales en la corteza prefrontal, específicamente la corteza dorsolateral prefrontal, así como las alteraciones en las capacidades cognitivas asociadas con la región prefrontal, se han identificado en individuos con comportamiento suicida y en individuos con TUS (Goldstein & Volkow, 2011). Por lo tanto, es de particular interés evaluar la expresión génica en esta región cerebral en suicidas con y sin TUS, a fin de tener una mejor comprensión de la interacción entre el suicidio y el TUS.

## **Patología dual**

La co-ocurrencia de al menos un trastorno por uso de sustancias (TUS) y uno o más trastornos mentales en un individuo se conoce como patología dual (*Center for Substance Abuse Treatment, 2005*). Se ha estimado una prevalencia a lo largo de la vida entre el 20 y el 50% en la población general para la patología dual (Regier et al., 1990; Kessler et al., 1996; Carrà et al., 2012). Esta co-morbilidad es aún más prevalente en individuos con TUS que se encuentran bajo tratamiento en unidades de atención hospitalaria, es decir, población en tratamiento, en los que la prevalencia a lo largo de la vida se ha estimado entre 50 y 75% (Weaver et al., 2003; SAMHSA, 2005; Nubukpo et al., 2016; Marín Navarrete & Szerman, 2015).

Se ha sugerido que la patología dual implica la interacción de ambos trastornos lo que produciría un efecto sinérgico (Kelly y Daley, 2013). Los pacientes con patología dual tienen un mayor riesgo de presentar resultados clínicos adversos, como pobre adherencia al tratamiento, mayores tasas de recaída y mayor número de hospitalizaciones, mayor severidad de los síntomas psiquiátricos, y tasas más altas de muerte prematura en comparación con los pacientes con un solo trastorno mental (Ringen et al., 2008; Volkow, 2009).

Una de las causas de muerte prematura entre los pacientes con patología dual es el suicidio. Los pacientes con patología dual tienen un mayor riesgo de comportamiento suicida en contraste con los pacientes con una sola enfermedad mental (Abroms & Sher, 2016; Restrepo et al., 2018). Se ha encontrado que los TUS son un predictor de futuros intentos suicidas en pacientes con trastorno bipolar (Tolliver & Anton, 2015; Abroms & Sher, 2016), y el riesgo suicida de pacientes con trastorno bipolar en comorbilidad con trastorno por uso del alcohol es dos veces mayor que el de aquellos pacientes que presentan solo trastorno bipolar (Dalton et al., 2003; Abroms & Sher, 2016).

A pesar de que los individuos con patología dual se consideran como pacientes con alto riesgo suicida, los estudios sobre la neurobiología de esta asociación son escasos (Balhara, Kuppili y Gupta, 2017). Zai y colaboradores reportaron una asociación entre las variantes de un solo nucleótido (SNV) rs183294 y rs209356 del gen *GABRG2* (que codifica para la subunidad del receptor de ácido gamma-aminobutírico gamma-2) e intento de suicidio en pacientes con trastorno por uso del alcohol (Zai et al., 2014). Más estudios son necesarios para mejorar nuestro entendimiento de las bases efectos a nivel biológico de la patología dual en el contexto del suicidio.

## **Justificación**

A pesar de que los individuos con TUS y patología dual tienen un alto riesgo suicida en comparación con la población general, éstos han sido poco estudiados en los

estudios *post mortem* de expresión génica en suicidio. La evaluación de alteraciones en la expresión génica en todo el transcriptoma de la corteza prefrontal dorsolateral nos aportará un mejor entendimiento de la fisiopatología del suicidio en individuos con TUS y patología dual.

### **Objetivo general**

Identificar diferencias en el perfil de expresión génica en la corteza prefrontal dorsolateral entre suicidas con y sin TUS, así como con patología dual en comparación con individuos que fallecieron por causas distintas al suicidio con y sin TUS.

### **Objetivos específicos**

1. Colectar muestras *post mortem* de la corteza prefrontal dorsolateral de suicidas con y sin TUS, así como de no suicidas con y sin TUS.
2. Colectar información clínica y demográfica del expediente médico-legal de los individuos cuya muestra fue colectada en un paso anterior.
3. Evaluar el perfil de expresión génica de la corteza prefrontal dorsolateral de los individuos cuya muestra fue analizada por medio de microarreglos.
4. Comparar el perfil de expresión génica de la corteza prefrontal dorsolateral entre suicidas con TUS, suicidas sin TUS, no suicidas con TUS y no suicidas sin TUS.
5. Comparar el perfil de expresión génica de la corteza prefrontal dorsolateral entre suicidas con patología dual con el de suicidas con un solo trastorno.

### **Hipótesis**

Si el suicidio y los TUS han demostrado influir en la expresión génica por separado, entonces la interacción de ambas condiciones tendrá un efecto distinto sobre la expresión génica distinto al observado con sólo una de estas condiciones. Por lo tanto, el perfil de expresión génica en la corteza prefrontal dorsolateral de suicidas con TUS será distinto al de individuos con solo una de estas condiciones (suicidas sin TUS y no suicidas con TUS). Además, los sujetos con TUS y trastornos del ánimo (patología dual) también presentarán un perfil de expresión génica en la corteza prefrontal dorsolateral distinto al de los individuos con una sola patología, ya sea TUS o trastornos del ánimo.

## **Métodos y materiales**

### ***Consideraciones éticas***

Todos y cada uno de los procedimientos que se realizaron en este estudio fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en Investigación del INMEGEN con el No. de dictamen CEI 2016/33, así como por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los dictámenes de aprobación de ambos comités de ética se encuentran en el Anexo A.

### ***Sujetos y muestras***

Se obtuvieron muestras *post mortem* de cerebro, del Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO) del Tribunal Superior de Justicia en la Ciudad de México, de suicidas y no suicidas fallecidos en el año 2016 en la Ciudad de México. Los suicidas fueron definidos como aquellos individuos cuya muerte fue a causa de lesiones autoinfligidas, que corresponden a los códigos X60 – X84 de la Clasificación Internacional de Enfermedades, Décima Revisión (CIE-10). Los no suicidas fueron aquellos individuos que tuvieron una muerte no autoinfligida sin un periodo de estado agonal o prolongado.

Las muestras de tejido cerebral fresco del área de Brodmann 9, que corresponde a la corteza prefrontal dorsolateral se disectaron utilizando el giro frontal medio y el surco precentral como referencias anatómicas. Las muestras fueron conservadas en *RNAlater*, un reactivo de estabilización de RNA (Qiagen, Singapur) a  $-80^{\circ}$  C hasta su uso.

Con el fin de obtener la información sociodemográfica y clínica de los individuos cuyas muestras se colectaron previamente, se recopiló información del expediente médico legal de cada individuo. El expediente médico legal contenía los siguientes elementos: a) información demográfica, b) informe de autopsia, c) descripción de las circunstancias de la muerte, d) informe de toxicología, e) informes policiales, f) notas médicas y psiquiátricas, g) nota de suicidio en caso de haberla, h) testimonios de familiares y testigos del fallecido, i) registros clínicos en caso de que el individuo haya recibido atención médica, y j) certificado de defunción.

Se realizó una estimación diagnóstica de cada individuo con los datos obtenidos del expediente médico-legal, con el fin identificar el probable padecimiento psiquiátrico, en caso de haberlo, de cada individuo. Un diagnóstico por consenso fue realizado por un patólogo, un psicólogo y un psiquiatra. Este diagnóstico se basó en los criterios de la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (*DSM-5*) (APA, 2013). El diagnóstico fue revisado y confirmado por un psiquiatra independiente.

Los individuos fueron clasificados de acuerdo con su causa de muerte (suicidas y no suicidas) y diagnóstico de TUS (con TUS y sin TUS) en los siguientes grupos: i) suicidas con TUS, ii) suicidas sin TUS, iii) no suicidas con TUS y iv) no suicidas sin TUS. Los individuos fueron excluidos del estudio si la información contenida en su expediente médico-legal era insuficiente para realizar el diagnóstico por consenso. Una vez iniciado el estudio, las muestras que no cumplieron con los requerimientos para ser procesadas en pasos subsecuentes fueron eliminadas del estudio. Los criterios de inclusión, exclusión y eliminación para cada uno de los grupos se enlistan en la Tabla 9.

**Tabla 9. Criterios de selección para los grupos de comparación de este estudio**

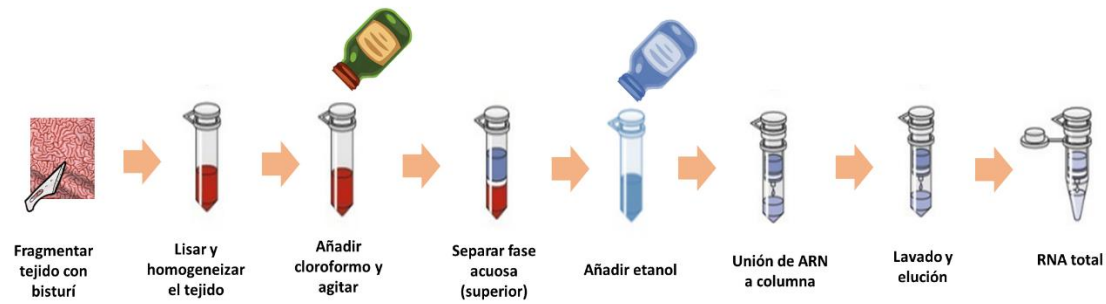
<b>Criterios de inclusión para el grupo suicidas con TUS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Muerte por suicidio</li> <li>▪ Originarios y residentes de la Ciudad de México</li> <li>▪ Diagnóstico de TUS de acuerdo con el diagnóstico por consenso</li> </ul>
<b>Criterios de inclusión para el grupo suicidas sin TUS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Muerte por suicidio</li> <li>▪ Originarios y residentes de la Ciudad de México</li> <li>▪ Sin diagnóstico de TUS de acuerdo con el diagnóstico por consenso</li> </ul>
<b>Criterios de inclusión para el grupo de no suicidas con TUS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Muerte por causa distinta al suicidio</li> <li>▪ Originarios y residentes de la Ciudad de México</li> <li>▪ Diagnóstico de TUS de acuerdo con el diagnóstico por consenso</li> </ul>
<b>Criterios de inclusión para el grupo de no suicidas sin TUS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Muerte por causa distinta al suicidio</li> <li>▪ Originarios y residentes de la Ciudad de México</li> <li>▪ Sin diagnóstico de TUS de acuerdo con el diagnóstico por consenso</li> </ul>
<b>Criterios de exclusión para todos los grupos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Información insuficiente en el expediente médico-legal para realizar la aproximación diagnóstica</li> </ul>
<b>Criterios de eliminación para todos los grupos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>RNA</b> en concentración mínima de &lt;50 ng/μl</li> <li>▪ <b>RNA</b> degradado de acuerdo con su visualización en <b>un gel</b> de agarosa al 1%</li> <li>▪ <b>RNA</b> con <b>RIN</b> menor que 5</li> </ul>

Diferencias con respecto a variables categóricas entre los grupos, como el sexo, se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher, mientras que las diferencias con respecto a variables continuas, como la edad y el intervalo *post mortem* fueron evaluadas mediante pruebas de análisis de la varianza (ANOVA).

### **Aislamiento de RNA**

El aislamiento de RNA se realizó con el paquete comercial *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* de Qiagen™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en un método de extracción de ácidos nucleicos que integra lisis celular con fenol-tiocianato de guanidinio (QIAzol) seguida de purificación del RNA por medio de membranas de sílice dispuestas en columnas. Un resumen de este procedimiento se ilustra en la Figura 11.





**Figura 11.** Resumen del protocolo para aislamiento de RNA de tejido cerebral con el *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* de Qiagen™. Modificado de: <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=7f13ac1a-841d-4e9b-b39d-42fe71b3d585&lang=en>

Las instrucciones completas de este procedimiento contenidas en el manual proporcionado por el fabricante de *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* se enlistan a continuación:

#### *Instrucciones para el aislamiento de RNA*

- 1) Colocar un fragmento de tejido de la corteza prefrontal dorsolateral de cada muestra de aproximadamente 0.5 cm<sup>3</sup> en un tubo de 1.5 ml. Centrifugar a 1,000 gs (gravidades) durante 5 minutos a una temperatura de 4°C.
- 2) Retirar el *RNA/later* en el que se encuentra contenida la muestra con una pipeta.
- 3) Pesar 100mg de tejido de la corteza prefrontal dorsolateral de cada muestra. Fragmentar el tejido con un bisturí hasta obtener una masa homogénea.
- 4) Colocar el tejido fragmentado en un tubo de 1.5 ml y añadir 1 ml de reactivo de lisis QIAzol en cada tubo. Pipetear continuamente hasta homogeneizar la mezcla. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Añadir 200 µl de cloroformo y agitar vigorosamente por 15 segundos. Incubar durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 8,000 gs durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.
- 6) Visualizar la separación de dos fases: una superior que es acuosa y transparente y una inferior que es turbia de color blanquecino. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 ml.
- 7) Añadir un volumen de etanol al 70% y vortexear.
- 8) Transferir 700 µl de muestra a un tubo de 2 ml con columna. Centrifugar a 8,000 gs durante 15 segundos a temperatura ambiente.
- 9) Repetir el paso 8 hasta haber transferido el total de la muestra.
- 10) Añadir 700 µl de amortiguador RW1 al tubo con la columna donde se encuentra la muestra. Centrifugar a 8,000 gs durante 15 segundos a temperatura ambiente.
- 11) Añadir 500 µl de Buffer RPE al tubo con la columna donde se encuentra la muestra. El amortiguador RPE fue preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Anexo B**. Centrifugar a 8,000 gs durante 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.

- 12) Añadir 500  $\mu\text{l}$  de Amortiguador RPE al tubo con la columna donde se encuentra la muestra. Centrifugar a 8,000 gs durante dos minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
- 13) Colocar la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml. Añadir 30-50  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAasas. Centrifugar a 8,000 gs durante un minuto a temperatura ambiente.

La función de cada uno de los agentes utilizados en la extracción de RNA se enumera a continuación:

- i. El tiocianato de guanidinio es un agente caotrópico, es decir que, altera la red tridimensional del agua, por lo que modifica la interacción del agua con macromoléculas como las proteínas, llegando incluso a desnaturalizarlas y/o disolverlas (Farrell, 2010). La disrupción y disolución de la membrana celular libera los ácidos nucleicos contenidos en las células del tejido procesado. Además, desactiva las nucleasas (RNAasas y DNAasas) que degradan los ácidos nucleicos (Farrell, 2010).
- ii. El fenol tiene menor polaridad que el agua, lo que hace que los ácidos nucleicos que son altamente polares debido a las cargas negativas del fosfato presente en su estructura no se disuelvan al entrar en contacto con el fenol y permanezcan en la fase acuosa (Oswald, 2016).
- iii. La adición de cloroformo permite una correcta separación de fases, donde las proteínas se encuentran en la fase orgánica y el RNA permanece en la fase acuosa, que es colectada (Rio et al., 2016a).
- iv. El etanol en conjunto con sales añadidas a la fase acuosa previamente colectada provoca la precipitación de los ácidos nucleicos. El RNA es inherentemente hidrófilico; es decir que se disuelve fácilmente en agua. Sin embargo, su hidrofilia se reduce por la presencia de sales (cloruro de litio) a pH ácido y se reduce aún más, hasta el punto de precipitación, mediante la adición de etanol (Rio et al., 2010b).

Bajo estas condiciones hidrofóbicas conseguidas por medio de las sales y el etanol, al pasar los ácidos nucleicos a través de una columna con membrana de sílice, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a ella. Las proteínas, metabolitos y otros contaminantes no se unen a la columna y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado (Almansa, 2013).

La concentración y pureza de los RNA aislados fueron evaluadas por medio de espectrofotometría utilizando el NanoDrop1000 a partir de 1  $\mu\text{L}$  de muestra (Thermo, Waltham, MA, EUA). La espectrofotometría está basada en el principio de absorción de radiación electromagnética de todas las moléculas a una longitud de onda específica dentro del espectro de la luz ultravioleta, a partir de la cual es posible

extrapolar la concentración de un soluto en una solución, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer que indica una relación lineal entre la absorbancia y concentración de un soluto en solución (Díaz et al., 2008).

La cuantificación del RNA fue determinada por su absorbancia a una longitud de onda de 260nm. Se determinó la pureza en cada muestra, al estimar la cantidad de sales caotrópicas y proteínas por medio de las relaciones  $A_{260}/A_{230}$  y  $A_{260}/A_{280}$ , respectivamente (Sambrook & Russell, 2001). Ambas relaciones deben tener valores entre 1.8 y 2.1, lo que indica que el RNA se encuentra libre de contaminantes (Almansa, 2013).

La integridad del RNA aislado fue evaluada por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%. La electroforesis es una técnica utilizada para separar fragmentos de macromoléculas por su tamaño molecular y carga al aplicar una corriente a través de un gel de agarosa (*Khan Academy*, 2018). La agarosa es polímero lineal de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa, que al solidificar forma una malla tridimensional a través de la cual viajan las moléculas de interés (Checa Rojas, 2017; *Khan Academy*, 2018). En el caso de los fragmentos de RNA, que tienen una carga negativa uniforme, migran hacia el ánodo con carga positiva y son separados solamente por su peso molecular (Lee et al., 2012).

Para preparar el gel de agarosa al 1%, 300 mg de agarosa Promega (PROMEGA®, EUA) fueron disueltos en 30 ml de amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato EDTA). El amortiguador TAE 1X fue preparado a partir de una solución concentrada de TAE 50X, que fue almacenada a temperatura ambiente (previa esterilización en autoclave) y diluida con agua destilada antes de cada electroforesis para lograr la concentración de uso (Fierro, 2014). La solución 50X de TAE fue preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Anexo B**.

La mezcla de agarosa y amortiguador TAE fue colocada en un matraz de 250 ml y calentada en un horno de microondas hasta lograr su completa disolución. Posteriormente, la mezcla se dejó enfriar un poco sin solidificar y se agregó 1  $\mu$ l de colorante *Midori Green Advance* (*Nippon Genetics Europe*, Alemania). Este colorante emite fluorescencia al unirse con los ácidos nucleicos, lo que permite su visualización al finalizar la electroforesis. La mezcla se vertió en la charola para gel incluida en la cámara de electroforesis (NESS 5000 HM), colocada dentro un soporte de inmovilización, en la que previamente se verificó que tuviera una superficie horizontal nivelada y la ausencia de fugas. Luego, se colocó un peine para formar los pozos donde se depositarían las muestras en pasos subsecuentes (Checa Rojas, 2017). Posteriormente, la mezcla se mantuvo en el soporte a temperatura ambiente hasta que ésta se polimerizó (Checa Rojas, 2017).

Se colocó la charola con el gel de agarosa polimerizado dentro de la cámara de electroforesis de tal forma que los pozos estuvieran del lado correspondiente al cátodo

(con carga negativa). La cámara de electroforesis se llenó con suficiente amortiguador TAE 1X hasta cubrir completamente el gel. Cada una de las muestras de RNA (200 ng/ $\mu$ L) fue mezclada con 2  $\mu$ L de amortiguador de carga (*Jena Bioscience*, Alemania) utilizando una lámina extensible de parafina. Esta mezcla fue colocada en cada uno de los pozos del gel. El amortiguador de carga tiene una alta densidad, lo que permite que la muestra se introduzca en el pozo del gel (Fierro, 2014). Además, contiene colorante que permite visualizar la migración de los ácidos nucleicos durante el proceso de electroforesis (Fierro, 2014). La cámara de electroforesis fue cerrada y conectada a una fuente de poder durante 45 minutos a un voltaje constante de 80 voltios (Checa Rojas, 2017).

Una vez terminada la electroforesis, el gel de agarosa fue retirado de la cámara de electroforesis y visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta a 300 nm (Equipar, México).

Posteriormente, se evaluó el *RIN* (número de Integridad del RNA, *RIN* por sus siglas en inglés, RNA *integrity number*) de cada una de las muestras con el equipo 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*, EUA). Este sistema utiliza la separación electroforética de las muestras en chips microfabricados, seguida de la detección de fluorescencia inducida por láser para evaluar la integridad y concentración de las muestras de RNA (Mueller, Lightfoot & Schroeder, 2004). Posteriormente, el equipo tiene un programa que genera un electroferograma que proporciona una evaluación visual detallada de la calidad de una muestra de RNA (Mueller, Lightfoot & Schroeder, 2004). A partir de las características del electroferograma se realiza una predicción de la integridad del RNA (Schroeder et al., 2006). El *RIN* es reportado en un sistema de numeración del 1 a 10, siendo 1 el perfil más degradado y 10 el más intacto (Schroeder et al., 2006). Solo aquellas muestras con una concentración de RNA >50 ng/ $\mu$ l, adecuada integridad y *RIN* mayor o igual que 5, fueron hibridadas en el microarreglo.

### **Síntesis de RNA biotilado**

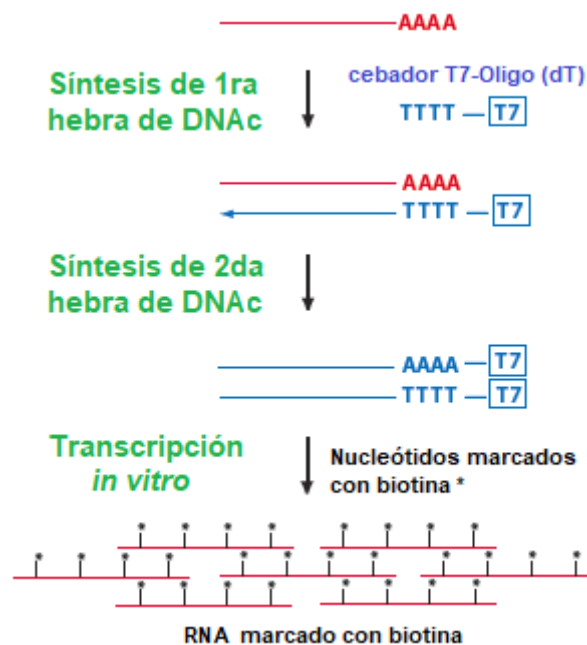
El RNA de cada muestra fue amplificado y purificado utilizando el kit *TargetAmp-Nano Labeling* para microarreglos Illumina de Epicentre (EPICENTRE, Madison, EUA), con el fin de obtener múltiples copias de RNA biotilado (Van Gelder, R. N. et al., 1990; Epicentre, 2013). Este procedimiento puede dividirse en tres pasos:

- i. Síntesis de primera cadena de DNAc. En este paso se generó DNA complementario (DNAc) al RNA de cada una de nuestras muestras por medio de transcripción reversa (Epicentre, 2013).
- ii. Síntesis de segunda cadena de DNAc. La cadena simple de DNAc fue convertida en una doble cadena de DNA (dsDNA), que fue utilizada en un proceso de transcripción para crear múltiples copias de dsDNA. En esta

reacción se utilizó una DNA polimerasa para sintetizar la segunda cadena de DNAC y una RNAasa que degradó el RNA (Almansa, 2013; Epicentre, 2013).

- iii. Transcripción *in vitro*. Posteriormente el dsDNA fue purificado y utilizado como molde para la transcripción de RNA complementario. En esta reacción se utilizó la RNA polimerasa T7 que es dependiente de DNA y nucleótidos marcados con biotina. El marcaje con biotina transformó las moléculas de RNA en sondas que pudieron ser reconocidas por un reactivo de detección durante la hibridación de las muestras con las sondas del microarreglo (Almansa, 2013; Epicentre, 2013).
- iv. Purificación del RNA biotinilado. Por último, se realizó una purificación del RNAC para eliminar nucleótidos no incorporados, enzimas y fosfato inorgánico (Almansa, 2013; Epicentre, 2013).

Este procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, que se resumen en la Figura 12.



**Figura 12.** Resumen de protocolo para síntesis de RNA biotinilado con el *kit TargetAmp-Nano Labeling* de Epicentre. Modificado de: <https://www.cambio.co.uk/0/451/22/products/targetamp-nano-g-biotin-aRNA-labelling-kit-for-the-illumina-system/#tab-2>

Las instrucciones completas de este procedimiento contenidas en el manual proporcionado por el fabricante del *kit TargetAmp-Nano Labeling* se enlistan a continuación:

#### *Síntesis de la primera cadena de DNAC*

1. Combinar 25-500ng de RNA y 1 µl de cebador T7-Oligo (dT) hasta completar un volumen total de 3 µl.

2. Incubar a 65°C durante cinco minutos. Colocar en hielo al finalizar.
3. Agregar a cada reacción: 15 µl de Premix para DNAC (*1st-Strand cDNA PreMix*), 0.25 µl de ditioneitol (DTT) y 0.25 µl de transcriptasa reversa *SuperScript III*.
4. Mezclar e incubar a 50°C durante 30 minutos. Colocar en hielo al finalizar.

#### *Síntesis de la segunda cadena de DNAC*

5. Agregar a cada reacción: 4.5 µl de PreMix para segunda cadena de DNAC (*2nd-Strand cDNA*) y 0.5 µl de transcriptasa reversa para segunda cadena de DNAC (*2nd-Strand DNA Polymerase*).
6. Mezclar e incubar a 65°C durante diez minutos.
7. Incubar a 80°C durante tres minutos. Centrifugar brevemente y colocar en hielo.
8. Incubar a -20°C durante toda la noche.

#### *Transcripción in-vitro*

9. Agregar a cada reacción: 2 µl de amortiguador de transcripción T7, 3 µl de UTP/Biotina-UTP, 10 µl de UTP/Biotina-UTP de Premix NTP, 3 µl de DTT, 2 µl de RNA polimerasa T7.
10. Mezclar e incubar a 42°C durante cuatro horas.
11. Agregar 2 µl de DNAasa libre de RNAsas a cada reacción.
12. Incubar a 37°C durante 15 minutos.

#### *Purificación de RNA biotinilado*

13. Preparar 350 µl de solución RLT/β-ME para cada muestra. Para esto, combinar 1 ml de amortiguador RLT y 10 µl de β-mercaptoetanol (β-ME).
14. Agregar a cada muestra: 48 µl de agua libre de RNAsas, 350 µl de solución RLT/β-ME, 250 µl de etanol al 100%.
15. Transferir la muestra a un tubo de 2 ml con columna. Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
16. Agregar 650 µl de etanol al 100% a la columna. Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
17. Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml.
18. Eluir el RNAC agregando 40 µl de agua libre de RNAsas en el centro de la columna. Esperar un minuto. Centrifugar a velocidad máxima durante un minuto.
19. Repetir paso 18.

#### ***Hibridación de RNA a microarreglos***

Luego de la purificación, se cuantificó la concentración de RNA biotinilado por medio de espectrofotometría utilizando el NanoDrop1000 a partir de 1 µL de muestra (Thermo, Waltham, MA, EUA). Un total de 1,500 ng de RNA biotinilado de cada muestra fueron hibridados en el microarreglo *HumanHT-12 v4 Expression Beadchip* (Illumina, Inc., San Diego, EUA) por 17 horas a 58°C.

El microarreglo *Illumina HumanHT-12 v4 BeadChip* contiene 47,231 sondas. Los microarreglos de Illumina consisten en una serie de oligonucleótidos inmovilizados por enlaces covalentes en microesferas de sílice que se localizan en micropocillos en la superficie del microarreglo (Almansa, 2013).

Cada una de las sondas del microarreglo posee una secuencia de 79 bases, de la cual una secuencia de 50 bases (50mer), hibrida con el RNAc marcado y una secuencia de 29 bases denominada *address* que identifica cada microesfera dentro del array (Almansa, 2013; Rueda, 2014). Cada una de estas sondas tiene alrededor de 30 réplicas dentro del microarreglo, que funcionan como réplica técnica de las muestras (Rueda, 2014).

Posteriormente, se agregó estreptavidina marcada con el fluoróforo cianina (Cy3). La estreptavidina es una proteína con elevada afinidad por la biotina que al estar unida a un fluoróforo permitió la detección de las sondas que fueron hibridadas en el microarreglo en pasos subsecuentes.

Los microarreglos fueron digitalizados en el escáner de microarreglos iScan (Illumina, Inc., San Diego, EUA) inmediatamente después del protocolo. El iScan es un sistema de alta resolución, basado en un láser para la detección de fluorescencia en las microesferas contenidas en el microarreglo. El láser excita el fluoróforo que se unió a las sondas hibridadas y el escáner registra imágenes de alta calidad de la luz emitida (Singh & Singh, 2015). Posteriormente, a partir de los archivos de imagen se obtuvieron las intensidades de cada sonda que fueron transformadas en datos numéricos y almacenadas en un archivo de tipo IDAT para cada muestra (Smith et al., 2013; Almansa, 2013).

### ***Pre-procesamiento de los datos del microarreglo***

Para su pre-procesamiento, los datos fueron preparados para poder aplicar los métodos estadísticos utilizados en el análisis de expresión diferencial. Para esto, se exportaron los archivos IDAT al ambiente R (R Core Team, 2013). Posteriormente, se anotaron las 47,231 sondas contenidas en el microarreglo, asignando a cada una el Entrez ID y el símbolo del gen correspondiente con el paquete *Illumina Humanv4.db* de Bioconductor (Dunning, Lynch & Eldridge, 2015). De las sondas contenidas en el microarreglo, 39,809 corresponden a sondas que detectan RNA codificante y 3,961 a sondas que detectan RNA no codificante.

Realizamos una corrección del fondo de los datos con el método *normexp* con una estimación de máxima probabilidad *mle* en el paquete *limma*, esto con el fin de corregir los datos para probable hibridación no-específica, es decir hibridación entre dos cadenas que no sean complementarias (Ritchie et al., 2015; Silver, Ritchie & Smyth, 2009; Phipson et al., 2016).

Posteriormente, realizamos un filtrado de las sondas de acuerdo con los siguientes criterios:

- i. sondas de control, es decir, aquellas sondas diseñadas para servir como controles positivos (sondas que se unen a RNA de genes constitutivos), controles negativos (sondas con secuencias de genes no encontrados en los humanos). Además, de los controles de hibridación, como las sondas *mismatch* y *perfect match* que permiten obtener información sobre hibridación inespecífica y específica, respectivamente, y las sondas CY3\_HYB que tiene cierto nivel de intensidad predeterminado (bajo, medio o alto) dentro del microarreglo.
- ii. sondas ERCC, que son controles externos de RNA desarrollados por el Consorcio de Control Externo de RNA (ERCC), un grupo *ad hoc* de organizaciones públicas, privadas y académicas dirigido por el *National Institute of Standards and Technology* (NIST, Instituto estadounidense de estándares y tecnología), ha desarrollado un conjunto común de controles externos de RNA (Pine et al., 2016). La lista con las 887 sondas de control, incluyendo las sondas ERCC del microarreglo se encuentra en el anexo C.
- iii. sondas no anotadas, es decir, sondas sin un número válido de Entrez ID.
- iv. sondas con baja detección, es decir, aquellas con un valor de p de detección > 0.05.
- v. sondas ausentes en al menos el 50% de los microarreglos en cada grupo de comparación.

Después de este filtrado, se obtuvieron 6,862 sondas, que fueron utilizadas en los siguientes pasos del análisis. De estas sondas, 6,643 correspondieron a sondas que detectan RNA codificante y 219 correspondieron a sondas que detectan RNA no codificante.

Con el fin de compensar por posibles diferencias técnicas y/o sistemáticas entre los microarreglos, los valores de la expresión génica fueron normalizados por cuantiles y transformados a escala logarítmica base dos (Smyth & Speed, 2003). El método de normalización por cuantiles consiste en hacer que la distribución empírica de la expresión génica sea la misma en todas las muestras (Bolstad et al., 2003; Qiu et al., 2013). Este método es ampliamente utilizado en el análisis de microarreglos de expresión génica (Hu & He, 2007). Las sondas replicadas, es decir las correspondientes a un mismo gen, fueron promediadas.

Los efectos de lote son fuentes de variación sistemática no biológica que se deben a artefactos experimentales y que pueden inducir falsas diferencias entre los grupos de comparación (Goh, Wang & Wong, 2017). Para visualizar los datos y evaluar la presencia de posibles efectos de lote, realizamos un análisis de componentes principales. El análisis de componentes principales es un algoritmo matemático que identifica las condiciones que explican la mayor variabilidad de los datos (Yang et al., 2008; Reese et al., 2013). En caso de detectar dicho efecto, se ejecuta un análisis multivariado con el paquete *ARSN* para eliminarlo (Nueda, Conesa & Ferrer, 2012).

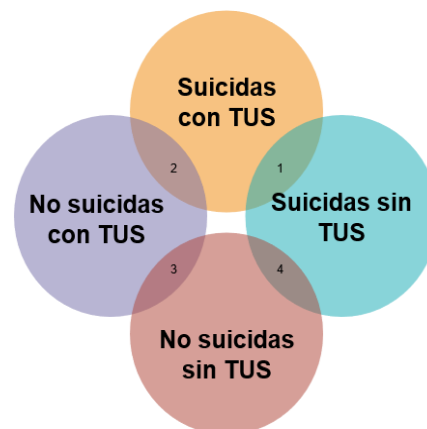


### **Análisis de expresión diferencial**

Las diferencias en la expresión génica entre los grupos fueron evaluadas por medio de un modelo lineal implementado en el paquete *limma* (Ritchie et al., 2015). El modelo fue seleccionado por medio de un método de eliminación de variables, paso por paso. Este método consiste en la inclusión de todas las posibles covariables en el modelo lineal y la eliminación reiterada de la variable más insignificante, seguida de una nueva estimación del modelo después de cada eliminación (Heinze, Wallisch, & Dunkler, 2018).

El intervalo *post mortem*, el resultado de la prueba toxicológica, las comorbilidades psiquiátricas, el valor de *RIN* y el mecanismo de muerte fueron probadas como posibles covariables y se descartaron durante la selección del modelo. El modelo lineal seleccionado para evaluar diferencias en la expresión génica entre los grupos incluyó el suicidio, TUS, así como la interacción entre el suicidio y TUS.

Se realizaron las siguientes comparaciones entre los grupos: 1) Suicidas con TUS vs. suicidas sin TUS; 2) Suicidas con TUS vs. no suicidas con TUS; 3) No suicidas con TUS vs. no suicidas sin TUS; y 4) Suicidas sin TUS vs. no suicidas sin TUS, como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13. Diagramas de Venn de la comparación entre los grupos de estudio.** En este trabajo, el perfil de expresión génica del área 9 de Brodmann de suicidas y no suicidas con TUS, se comparó con el de suicidas y no suicidas sin TUS.

Además, se identificaron los genes cuya expresión se encuentra influida por la interacción entre suicidio y TUS, por medio del siguiente contraste:

$$(Suicidas\ con\ TUS - No\ suicidas\ con\ TUS) - (Suicidas\ sin\ TUS - No\ suicidas\ sin\ TUS)$$

Al realizar las comparaciones entre los grupos, para cada gen establecemos la siguiente hipótesis nula:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Donde  $\mu_1$  corresponde a la expresión media del gen en el grupo 1 y  $\mu_2$  corresponde a la expresión media del mismo gen en el grupo 2. Por lo que la hipótesis nula expresa que la expresión media en ambos grupos es la misma y por lo tanto no habría diferencia entre ambos grupos. La hipótesis alternativa para cada uno de los genes en cada comparación es la siguiente:

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

La hipótesis alternativa expresa que la expresión media en ambos grupos es distinta y por lo tanto podemos encontrar diferencia entre ambos grupos.

El valor de p obtenido de cada prueba estadística refleja la probabilidad de obtener un valor que se desvía de la media tanto como el valor observado bajo el supuesto de que la hipótesis nula es cierta (Mulvey, 2007). Considerar la diferencia observada como significativa depende de si el valor obtenido está por debajo de un límite establecido conocido como nivel de significancia (Amat Rodrigo, 2016). Para fines de este estudio, el nivel de significancia se estableció en 0.001.

Nuestro estudio, al igual que en otros estudios de tecnologías ómicas, nos permite realizar comparaciones entre un gran número de genes. Sin embargo, entre mayor sea el número de comparaciones realizadas, mayor será la probabilidad de cometer un error de tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando es cierta) y obtener un falso positivo (Molina, 2014; Noble, 2009).

Con el fin de controlar el número de falsos positivos en nuestros resultados, los valores de p resultantes se corrigieron para comparaciones múltiples utilizando el método de *False Discovery Rate (FDR)* de Benjamini y Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995). Al utilizar este método, pudimos establecer un límite de falsos positivos en nuestros resultados, siendo que por cada 1000 genes identificados como diferencialmente expresados, uno de ellos podría ser un falso positivo (Amat Rodrigo, 2016).

La visualización de los resultados de cada comparación se realizó mediante mapas de calor utilizando el paquete *gplot* (Warnes et al., 2014). En un mapa de calor los datos se muestran en una cuadrícula donde cada fila representa un gen y cada columna representa una muestra. El color y la intensidad de los cuadros se utilizan para representar cambios en la expresión génica. El orden de los genes y las muestras en las filas y columnas, respectivamente, se determinó al realizar análisis de agrupamiento jerárquicos. Con este análisis se agrupan genes y muestras con un perfil de expresión génica similar (Zhao et al., 2014).

### **Análisis de anotación funcional**

Para obtener información sobre los procesos y funciones biológicas en los que participan los genes diferencialmente expresados, realizamos un análisis de ontología génica con la base de datos DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) versión 6.8 (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b).

En este análisis se compara la frecuencia de las anotaciones individuales en la lista de genes identificados como diferencialmente expresados con una lista de referencia (Huang et al., 2007). Los 6,862 genes resultantes del preprocesamiento se utilizaron como referencia para los análisis de anotación funcional.

Las categorías de anotación seleccionadas fueron: Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (*KEGG*) (Kanehisa & Goto., 2000), Ontología génica (*GO*) y *Reactome*. Los genes sobreexpresados y subexpresados fueron analizados por separado en DAVID, ya que este abordaje ha demostrado ser más eficiente para encontrar vías funcionales significativas (Hong et al., 2014).

Además, se realizó un análisis conjunto, es decir, que incluía todos los genes sobreexpresados y subexpresados de cada comparación. El razonamiento de este análisis fue obtener una visión general de las funciones moleculares relacionadas con los genes diferencialmente expresados en cada comparación.

Los términos de ontología génica con un valor de p de la prueba exacta de Fisher modificada  $<0.05$ , denominado puntuación EASE, se consideraron enriquecidos (Hosack et al., 2003). Además, se realizó un análisis de vías con el programa *Ingenuity® Pathway Analysis* (*IPA®*, QIAGEN Redwood City) para complementar el análisis de ontología génica y obtener información sobre las vías canónicas en las cuales participan los genes diferencialmente expresados de cada comparación (Krämer et al., 2014). Las vías canónicas son rutas generalizadas que representan propiedades comunes de un módulo o vía de señalización particular (*Database of cell signaling and virtual journal*).

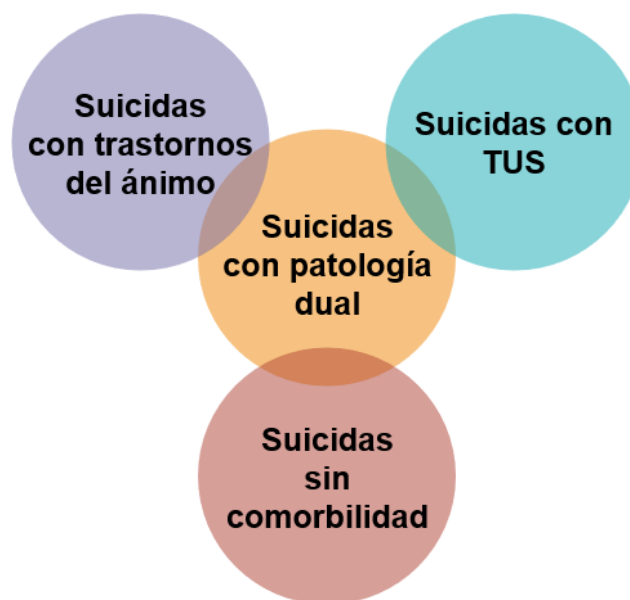
### **Reanálisis de datos: patología dual en suicidas**

Los datos de 38 individuos fueron reanalizados con el objetivo de identificar diferencias en el perfil de expresión génica en la corteza prefrontal dorsolateral de individuos con patología dual. Debido a la asociación entre patología dual y comportamiento suicida, este re-análisis se realizó solo en sujetos que murieron por suicidio. Además, la restricción del análisis a suicidas podría minimizar las fuentes de heterogeneidad que dificultarían detectar diferencias en el patrón de expresión génica en una muestra pequeña.

Los 38 individuos incluidos en este re-análisis fueron clasificados en los siguientes grupos: i) 10 suicidas con patología dual, es decir, TUS y trastornos del ánimo en el mismo individuo, ii) 10 suicidas con TUS, iii) 13 suicidas con trastornos del ánimo y iv) 5 suicidas sin ningún trastorno mental. Las diferencias entre los grupos con respecto a variables categóricas, como sexo, y mecanismos de muerte y continuas como la edad y el intervalo *post mortem* fueron evaluadas mediante la prueba exacta de Fisher y el análisis de varianza (ANOVA), respectivamente.

El pre-procesamiento de los datos fue realizado siguiendo el mismo procedimiento descrito en el análisis principal. Después del preprocesamiento, se obtuvieron un total de 9,333 sondas que fueron examinadas en pasos posteriores del análisis. De estas sondas, 9,051 correspondieron a sondas que detectan RNA codificante y 282 correspondieron a sondas que detectan RNA no codificante.

En este re-análisis, comparamos el perfil de expresión génica de suicidas con patología dual con el de suicidas con un solo trastorno, ya sea TUS o solo trastornos del ánimo, así como con el de suicidas sin ningún trastorno mental, como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14. Diagrama de Venn de la comparación entre los grupos del re-análisis.** En este estudio, el perfil de expresión génica del área 9 de Brodmann de suicidas con patología dual (TUS y trastornos del estado de ánimo) se comparó con el de suicidas con solo TUS, suicidas con solo trastornos del ánimo y suicidas sin comorbilidad mental.

Las diferencias de expresión génica entre los grupos se evaluaron mediante un modelo lineal implementado en el paquete *limma* (Ritchie et al., 2015). Este modelo incluye TUS, trastornos del ánimo, así como la interacción de TUS y trastornos del ánimo.

Las variables sexo, edad, *RIN*, resultados del examen toxicológico, mecanismo de muerte, consumo de tabaco e intervalo *post mortem* se probaron como posibles covariables en nuestra muestra mediante el método de eliminación de variables paso por paso descrito en el análisis principal. Todas las posibles covariables fueron descartadas durante el proceso de selección del modelo, ya que no mostraron ningún efecto en los cambios de expresión génica observados en nuestra muestra. Además, los genes cuya expresión fue influenciada por la interacción entre TUS y trastornos del ánimo se obtuvieron a partir de la interacción incluida en el modelo lineal (trastornos del ánimo x TUS).

Con el fin de reducir los resultados falsos positivos, los valores p se corrigieron para múltiples pruebas mediante el método *FDR* (Benjamini y Hochberg, 1995). Seleccionamos como puntos de corte para definir a un gen como diferencialmente expresado entre los grupos un valor de p corregido por *FDR*  $<0.001$ , y una razón de cambio absoluta de 1.15. La función *TRATE* se usó para seleccionar los genes cuya razón de cambio fue mayor a que 1.15 en cualquier dirección (McCarthy y Smyth, 2009).

La base de datos DAVID versión 6.8 se utilizó para el análisis de ontología génica (Huang et al., 2009a; Huang et al., 2009b). Mientras que KEGG (Kanehisa y Goto., 2000) en *WebGestalt* (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2005) se utilizó para el análisis de vías biológicas. Los valores de p asociados a cada vía se corrigieron para múltiples comparaciones mediante el método *FDR* (Benjamini & Hochberg, 1995).

Los términos de ontología génica y vías biológicas con un valor p corregido por *FDR*  $<0.05$  se consideraron enriquecidos. Los 9,333 genes resultantes después del control de calidad se usaron como referencia en el análisis de ontología génica y el análisis de vías biológicas. El análisis funcional se realizó sobre las listas completas de genes diferencialmente expresados en este re-análisis, identificando los genes sub y sobre-expresados relacionado a cada término de ontología génica y vía biológica.

#### *Enriquecimiento de marcadores específicos de tipo celular*

Para identificar si los perfiles de expresión génica podrían reflejar diferencias en las composiciones de tipo celular entre los grupos, realizamos un enriquecimiento de marcadores específicos para cada tipo celular con *NeuroExpresso*, que es una base de datos de perfiles de expresión génica específicos para cada tipo de célula cerebral (Mancarci et al., 2017). Esta herramienta se usó a través de su implementación como paquete de R llamado *markerGeneProfile* (Mancarci et al., 2017). Brevemente, la estimación de los marcadores específicos para cada tipo celular se basa en un análisis de componentes principales obtenido de la expresión de marcadores específicos de cada tipo celular de ratón proporcionados por *NeuroExpresso* para estimar la abundancia relativa de cada tipo celular (Mancarci et al., 2017).

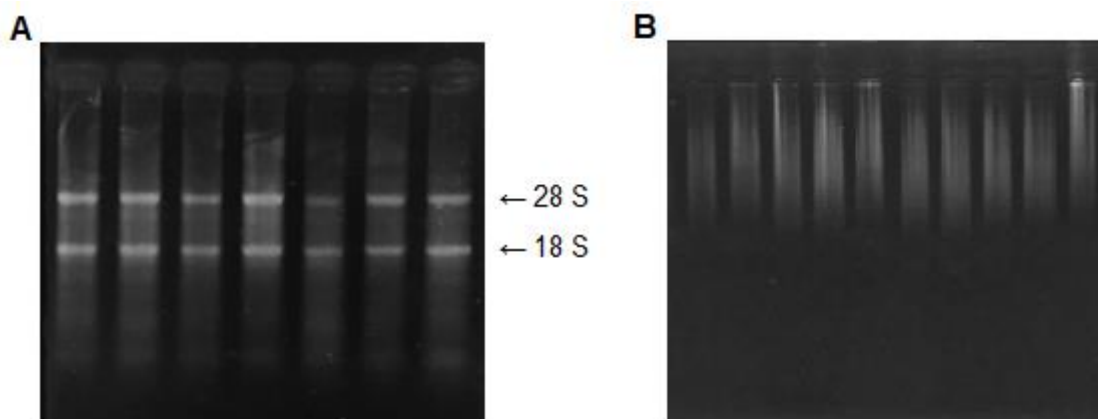
Los marcadores específicos de tipo celular de ratón fueron transformados en sus respectivos ortólogos humanos con la herramienta *homoloGene* (NCBI, 2017). Para comparar la proporción de marcadores específicos de tipo celular entre los grupos, utilizamos una prueba de suma de rangos de Wilcoxon de dos vías.

Los resultados del enriquecimiento de marcadores específicos de tipo celular se utilizaron para recalculer el modelo lineal utilizado para la evaluación de genes expresados diferencialmente entre los grupos. Para esto, las estimaciones de marcadores específicos de tipo celular se incluyeron en el modelo lineal con el fin de identificar los genes influenciados por las diferencias de marcadores específicos de tipo celular entre los grupos.

## Resultados

### Resultados generales

Se colectaron datos del expediente médico-legal y muestras del área 9 de Brodmann de 76 individuos fallecidos en el año 2016. Se realizó el aislamiento de RNA de las 76 muestras. La integridad del RNA extraído fue evaluada por medio de electroforesis en geles de agarosa. En la visualización de cada uno de los geles de agarosa se verificó la presencia de dos bandas correspondientes a las subunidades de los RNA ribosomales 18S y 28S, como se muestra en la Figura 15A. Diez muestras fueron descartadas debido a que no se encontró una adecuada integridad del RNA aislado, como se muestra en la Figura 15B.



**Figura 15.** Imágenes representativas de la electroforesis en geles de agarosa con muestras de RNA. A) Muestras incluidas en el estudio. Se observan dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S, lo cual indica una adecuada integridad del RNA. B) Muestras excluidas del estudio. Se observa un barrido de bajo peso molecular que indica la presencia de RNA degradado.

Se encontró una concentración y pureza adecuadas del RNA aislado en las 66 muestras incluidas en el estudio. El promedio de la concentración de RNA de las muestras fue de  $1,018.68 \pm 331.96$  ng/ $\mu$ l. Mientras que el promedio de las relaciones A260/A230 y A260/A280 fue  $2.08 \pm 0.21$  y  $2.07 \pm 0.017$ , respectivamente.

## **Expresión génica en individuos con trastorno por uso de sustancias que murieron por suicidio**

Se analizaron los datos de 66 muestras, considerando los siguientes grupos experimentales: i) 23 suicidas con TUS; ii) 20 suicidas sin TUS; iii) 9 sujetos con TUS, cuya causa de muerte no fue el suicidio (No suicidas con TUS), y iv) 14 sujetos no suicidas sin TUS (No suicidas sin TUS).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos de comparación en términos de edad ( $p = 0.645$ ) e intervalo *post mortem* ( $p = 0.128$ ). Sin embargo, encontramos una asociación entre el género y los grupos de comparación ( $p = 0.028$ ). En este contexto, en nuestra muestra hubo un mayor número de hombres que de mujeres en los grupos de suicidas y no suicidas con TUS. Este hecho es consistente con reportes anteriores donde se ha encontrado que la mayoría de los que se suicidan o sufren de TUS en la población mexicana pertenecen al género masculino (INEGI, 2019). Un resumen de los datos clínicos y demográficos de la muestra se encuentra en la Tabla 10.

**Tabla 10. Características de la muestra**

	Suicidas		No suicidas		Valor de p
	+	-	+	-	
<b>TUS</b>					
<b>Número de sujetos</b>	23	20	9	14	
<b>Edad (años)</b>	31.95 ± 17.43	32.8 ± 15.19	30.88 ± 7.04	31.78 ± 19.51	0.645
<b>Género (H: M)</b>	21:2	12:8	8:1	8:6	0.028
<b>IPM (horas)</b>	14.91 ± 3.91	15.03 ± 4.81	17.76 ± 7.07	16.84 ± 4.44	0.128
<b>Trastorno por uso del alcohol</b>	17	0	8	0	
<b>Resultado positivo en toxicología</b>	16	3	4	0	
<b>Causa de muerte<sup>a</sup></b>	19/0/2/1/1/0/0	16/1/1/1/1/0/0	1/2/0/3/2/1/0	4/4/0/2/0/1/4	
<b>Trastorno mental<sup>b</sup></b>	10/1/0/0	8/3/0/1	0/1/2/0	0/1/0/0	

Abreviaturas: H: hombres; M: mujeres; IPM: Intervalo *post mortem*

<sup>a</sup> Asfixia/Disparo/Intoxicación/Trauma/Punzocortante/Accidente de tráfico/Shock

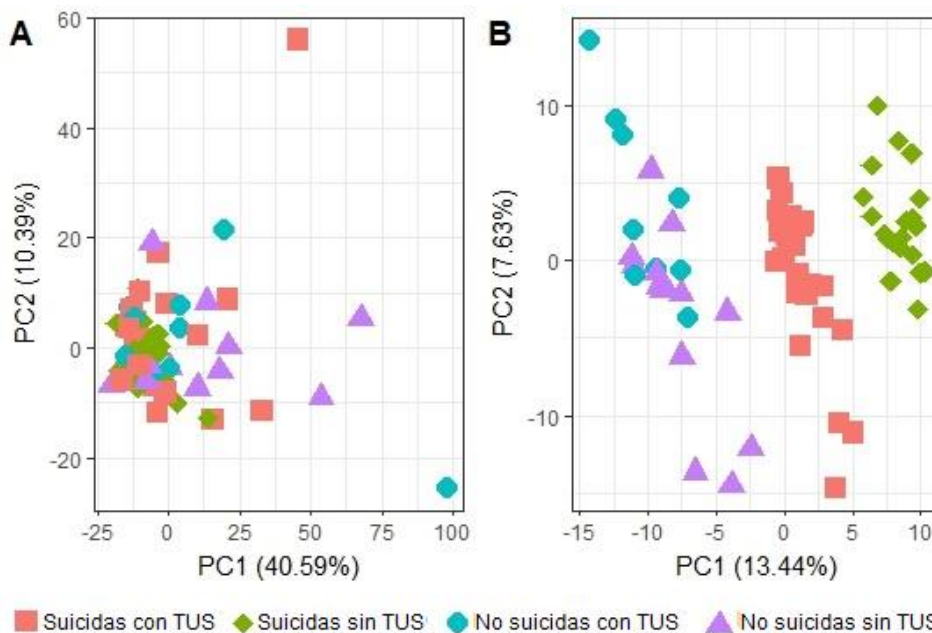
<sup>b</sup> Trastornos del estado del ánimo/ Trastornos de la personalidad/ Trastornos de adaptación/ Esquizofrenia

En el grupo de suicidas con TUS, 73.91% (20/23) de los sujetos tenían trastorno por uso de alcohol. Mientras que, en el grupo de no suicidas con TUS, 88.88% (8/9) de los sujetos tenían este trastorno. De los sujetos que obtuvieron un resultado positivo en el examen toxicológico del grupo de suicidas con TUS, en 87.5% el resultado indicó intoxicación aguda con alcohol y en 12.5% indicó consumo de alcohol y cocaína. Los sujetos de los otros grupos que obtuvieron un resultado positivo en el examen toxicológico, se reportó consumo exclusivamente de alcohol.

Se evaluó la presencia de posibles efectos de lote en la muestra estudiada al graficar la distribución de las muestras de acuerdo con los dos primeros componentes

principales. En esta gráfica observamos que los grupos de comparación presentaban un efecto de lote asociado a una fuente de variabilidad no identificada (Figura 16A); por lo que, corregimos este efecto con el paquete *ARSyN*.

Al graficar la distribución de las muestras sobre los dos primeros componentes principales después de la corrección del efecto de lote con *ARSyN*, observamos una separación de las muestras en los siguientes grupos: i) suicidas con TUS; ii) suicidas sin TUS; y iii) no suicidas, donde se observó un ligero traslape entre los no suicidas con y sin TUS, sobre el primer componente principal, como se muestra en la Figura 16B.



**Figura 16. Análisis de componentes principales de las muestras.** A) Después de la normalización por cuantiles de los datos. Se observa que los grupos de comparación presentan un efecto de lote asociado a una fuente de variabilidad no identificada. B) Después de remover el efecto de lote con un análisis multidimensional con *ARSyN*. Se observa separación de las muestras de acuerdo con los grupos de comparación.

### *Suicidas con TUS vs. suicidas sin TUS*

En la comparación entre suicidas con TUS ( $n = 23$ ) y suicidas sin TUS ( $n = 20$ ), se encontraron 222 genes diferencialmente expresados. De estos 222 genes, 112 se encontraban sobre-expresados y 110 sub-expresados en los suicidas con TUS en comparación con los suicidas sin TUS. Cabe mencionar que, dentro de estos 222 genes, 218 genes eran codificantes y 4 no codificantes. Los 10 genes con el menor valor de  $p$  corregido por FDR, y por lo tanto mayor significancia estadística de esta comparación se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Los diez genes diferencialmente expresados con mayor significancia estadística entre Suicidas con TUS y suicidas sin TUS**

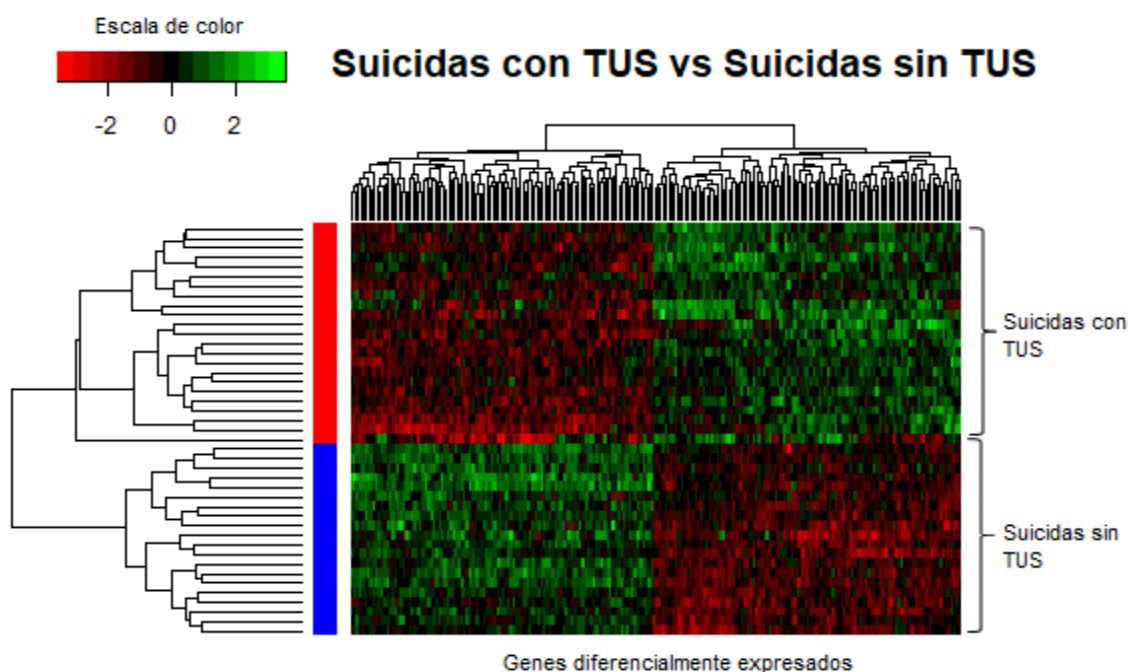
Símbolo	FC	Valor de $p$	Valor de $p$ corregido por FDR*	Nombre del gen
---------	----	--------------	---------------------------------	----------------



<b>PPP3CB</b>	-1.24959	1.14E-10	7.81E-07	Isoforma beta de la subunidad catalítica de la fosfatasa de serina / treonina 2B
<b>PTAR1</b>	1.257107	3.21E-10	1.10E-06	Proteína Preniltransferasa Subunidad alfa Proteína que contiene repeticiones 1
<b>YES1</b>	1.308678	5.40E-10	1.24E-06	Proto-oncogen tirosina-proteína cinasa 1 YES
<b>ANXA6</b>	-1.20954	1.06E-09	1.83E-06	Anexina A6
<b>STMN2</b>	-1.29261	4.46E-09	3.24E-06	Stathmin 2
<b>UCHL1</b>	-1.27068	3.37E-09	3.24E-06	Ubiquitina carboxiterminal hidrolasa L1
<b>TRAM1</b>	1.20361	4.42E-09	3.24E-06	Proteína de membrana asociada a translocación 1
<b>HMG20B</b>	1.23705	4.72E-09	3.24E-06	Grupo de alta movilidad 20B
<b>GNA13</b>	1.243688	3.78E-09	3.24E-06	Subunidad alfa-13 de la proteína de unión a nucleótidos de guanina
<b>NXT2</b>	1.269661	3.68E-09	3.24E-06	Factor de transporte nuclear 2 similar al factor de exportación 2

Abreviaturas: Fold-change (FC); False Discovery Rate (FDR)

El mapa de calor correspondiente a esta comparación demostró que las muestras se agruparon en sus respectivos grupos de acuerdo con la similitud de sus perfiles de expresión génica (Figura 17).



**Figura 17. Mapa de calor de los genes expresados diferencialmente entre suicidas con y sin TUS.** Los genes expresados diferencialmente se muestran en columnas y las muestras en filas. Los niveles de expresión génica se representan en el espectro rojo-verde para genes sub y sobreexpresados, respectivamente.

Los resultados del análisis funcional, separando los genes en sub y sobreexpresados identificados en la comparación entre suicidas con y sin TUS, así como el número de genes relacionado a cada término y su significancia estadística, se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12. Términos de ontología génica relacionados con genes diferencialmente expresados entre suicidas con y sin TUS**

Identificador del término de ontología génica	Término de ontología génica	Número de genes	% del total de genes	EASE*
<b>Genes subexpresados</b>				
GO:0006812	Transporte de cationes	19	17.27	2.17E-5
GO:0097458	Morfología neuronal	23	20.90	6.69E-4
GO:0023052	Señalización	55	50.0	5.58E-4
GO:0045202	Sinapsis	14	12.72	0.006
GO:0002768	Receptores de superficie celular de la respuesta inmune	8	7.27	0.007
GO:0031175	Desarrollo de proyecciones neuronales	16	14.54	0.003
GO:0007610	Comportamiento	9	8.18	0.032
GO:0007611	Aprendizaje y memoria	6	5.45	0.033
GO:0045333	Respiración celular	6	5.45	0.038
<b>Genes sobreexpresados</b>				
GO:0060429	Desarrollo epitelial	20	18.01	1.73E-5
GO:0007155	Adhesión celular	25	22.52	1.04E-4
GO:0051960	Regulación del neurodesarrollo	14	12.61	0.007
GO:0010628	Regulación positiva de la expresión génica	19	17.11	0.030
GO:0048015	Señalización mediada por fosfatidilinositol	6	5.405	0.008

\*valor de p para prueba exacta de Fisher modificada. Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS)

Los resultados del análisis funcional conjunto, es decir incluyendo tanto genes sobre-expresados como sub-expresados, se muestran en la Tabla 13. Dado que la diferenciación celular fue el término de ontología génica asociado con el mayor porcentaje de genes, hicimos una búsqueda de términos de ontología génica relacionados con los genes relacionados solo a este término y encontramos una asociación significativa de estos genes con los términos “diferenciación de células neuronales” (valor de p de = 0.001) y “diferenciación de las células gliales” (valor de p = 0.0043). Lo cual indica que los genes diferencialmente expresados en esta comparación se relacionan con la diferenciación de células neuronales y gliales.

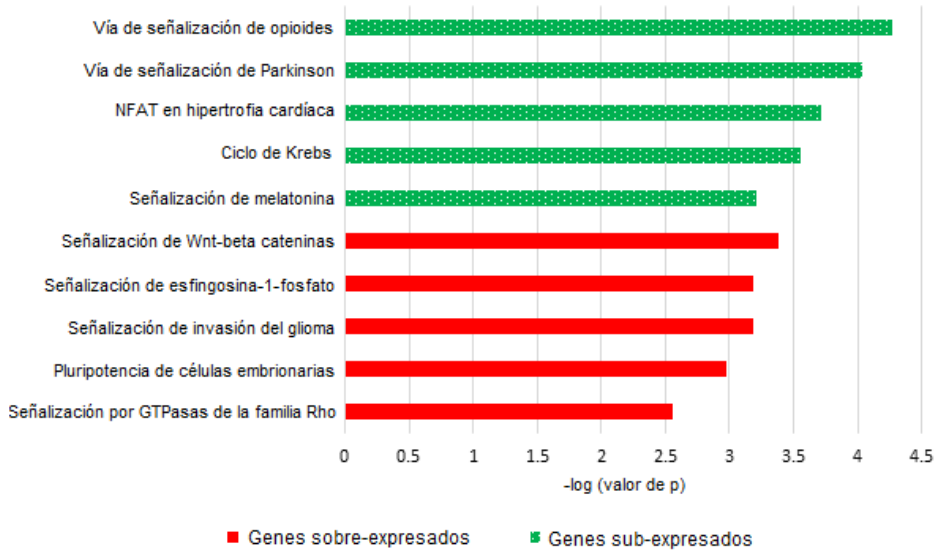
**Tabla 13. Términos de ontología génica relacionados con genes diferencialmente expresados entre suicidas con TUS y suicidas sin TUS (análisis conjunto).**

Identificador del término de ontología génica	Término de ontología génica	Número de genes	% del total de genes	EASE*
GO:0022008	Neurogénesis	39	0.10	5.79E-4
GO:0008219	Muerte celular	41	0.11	0.019
GO:0030154	Diferenciación celular	63	0.17	0.005
GO:0007155	Adhesión celular	40	0.11	1.05E-4
GO:0010001	Diferenciación de las células gliales	10	0.027	0.0043
GO:0030182	Diferenciación neuronal	34	0.094	0.001

\*valor de p para prueba exacta de Fisher modificada. Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS)

Las vías canónicas relacionadas con los genes sub y sobre-expresados de la comparación identificadas en el análisis con IPA entre suicidas con y sin TUS, se muestran en la Figura 18.

### Vías canónicas: Suicidas con TUS vs Suicidas sin TUS



**Figura 18. Vías canónicas identificadas por IPA.** Las vías canónicas relacionadas con los genes sobre-expresados (en rojo) y sub-expresados (en verde) en suicidas con TUS en comparación con suicidas sin TUS.

### Suicidas con TUS vs. no suicidas con TUS

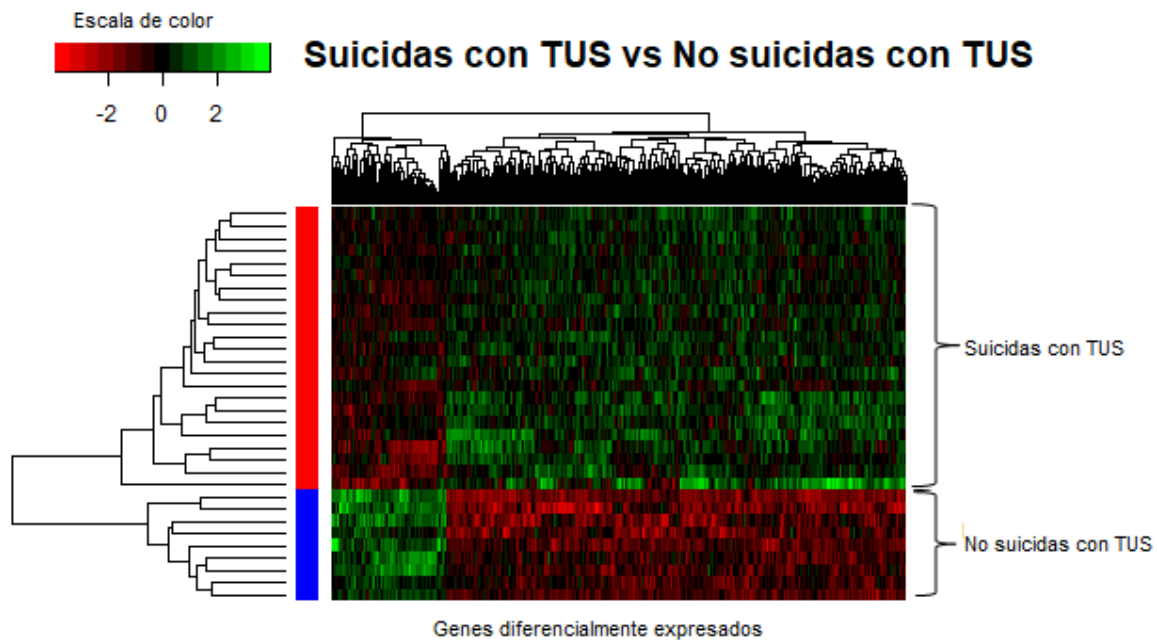
Al comparar el perfil de expresión génica de suicidas con TUS (n = 23) con el de no suicidas con TUS (n = 9), encontramos 550 genes diferencialmente expresados, de los cuales 438 se encontraban sobre-expresados y 112 sub-expresados en los suicidas con TUS en comparación con no suicidas con TUS. De estos 550 genes, 540 genes eran codificantes y 10 no codificantes. Los 10 genes con el menor valor de p corregido por FDR, y por lo tanto mayor significancia estadística de esta comparación se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14. Los diez genes diferencialmente expresados con mayor significancia estadística entre Suicidas con TUS y no suicidas con TUS**

Símbolo	FC	Valor de p	Valor de p corregido por FDR*	Nombre del gen
<b>RGS4</b>	1.514139	1.87E-12	1.29E-08	Regulador de la señalización de la proteína G 4
<b>KLC1</b>	1.23976	2.43E-11	5.57E-08	Cadena ligera de kinesina 1
<b>NHP2</b>	1.31474	2.06E-11	5.57E-08	Ribonucleoproteína NHP2
<b>MGST3</b>	1.349395	7.69E-11	1.05E-07	Glutación S-transferasa 3 microsómica
<b>EPS15</b>	1.408627	6.12E-11	1.05E-07	Sustrato del receptor del factor de crecimiento epidérmico 15
<b>GOT1</b>	1.296601	9.92E-11	1.13E-07	Aspartato aminotransferasa
<b>RNF14</b>	1.244036	2.20E-10	2.16E-07	E3 ubiquitín-proteín ligasa
<b>PSMA5</b>	1.283675	4.80E-10	3.30E-07	Subunidad de proteasoma alfa tipo-5
<b>PDCD6</b>	1.312097	4.81E-10	3.30E-07	Proteína de muerte celular programada 6
<b>CNP</b>	1.378467	4.73E-10	3.30E-07	2', 3'-Nucleótido cíclico 3' Fosfodiesterasa

Abreviaturas: Fold-change (FC); False Discovery Rate (FDR)

El mapa de calor correspondiente a esta comparación mostró que los individuos de estos grupos se agruparon en sus respectivos grupos de acuerdo con la similitud de sus perfiles de expresión génica, como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19. Mapa de calor de los genes expresados diferencialmente entre suicidas y no suicidas con TUS.** Los genes expresados diferencialmente se muestran en columnas y las muestras en filas. Los niveles de expresión génica se representan en el espectro rojo/verde para genes sub y sobre-expresados, respectivamente.

Los resultados del análisis funcional separando los genes en sub y sobre-expresados identificados en la comparación entre suicidas y no suicidas con TUS, así como el número de genes relacionado a cada término y su significancia estadística se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Términos de ontología génica relacionados con genes diferencialmente expresados entre suicidas y no suicidas con TUS**

Identificador del término de ontología génica	Término de ontología génica	Número de genes	% del total de genes	EASE*
<b>Genes subexpresados</b>				
IPR007087	Proteínas con dedos de zinc	10	8.92	0.010
Ninguno	Péptido señal	23	20.53	0.0015
Ninguno	Receptores	10	8.92	0.037
GO:0008152	Procesos metabólicos	77	68.75	0.039
<b>Genes sobreexpresados</b>				

GO:0044455	Membrana mitocondrial	49	11.21	5.96E-24
GO:0019882	Procesamiento y presentación de antígenos	20	4.57	2.08E-5
GO:0005856	Citoesqueleto	70	16.01	0.042

\*valor de p para prueba exacta de Fisher modificada. Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS)

Los resultados del análisis funcional conjunto, es decir incluyendo tanto genes como sobreexpresados como subexpresados, se muestran en la Tabla 16.

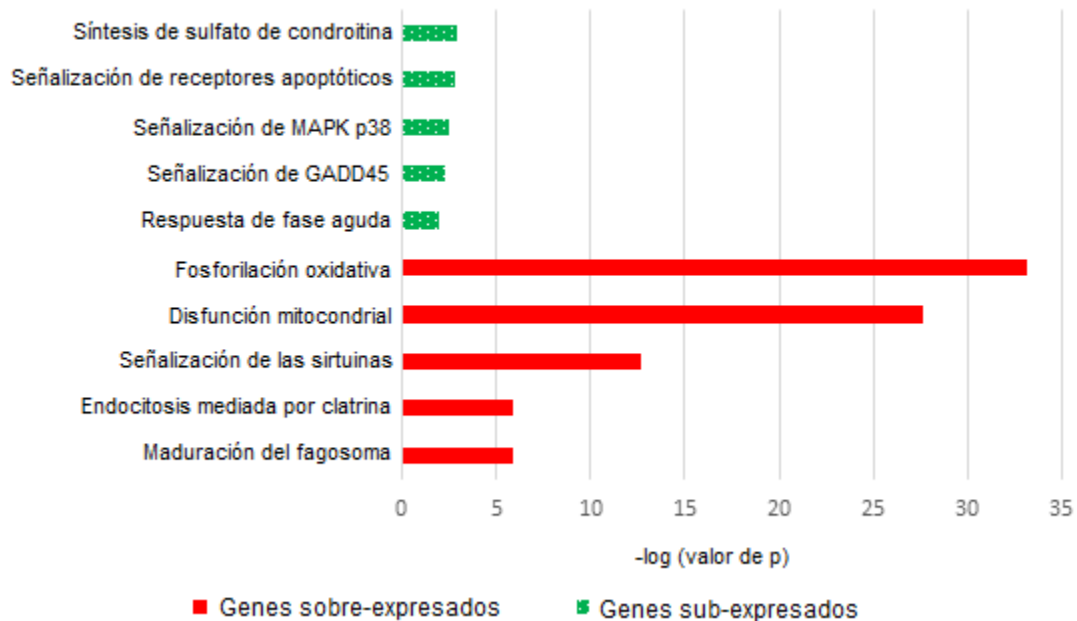
**Tabla 16. Términos de ontología génica relacionados con genes diferencialmente expresados entre suicidas y no suicidas con TUS (análisis conjunto)**

Identificador del término de ontología génica	Término de ontología génica	Número de genes	% del total de genes	EASE*
GO:0006955	Respuesta inmune	47	8.56	0.047
hsa00190	Fosforilación oxidativa	43	7.83	1.16E-21
hsa05012	Enfermedad de Parkinson	40	7.28	6.91E-18
GO:0044772	Transición del ciclo celular (mitosis)	32	5.82	0.0149

\*valor de p para prueba exacta de Fisher modificada. Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS)

Las rutas canónicas relacionadas con los genes sub y sobreexpresados de la comparación identificadas en el análisis con IPA entre suicidas y no suicidas con TUS, se muestran en la Figura 20.

### Vías canónicas: Suicidas con TUS vs No suicidas con TUS



**Figura 20. Vías canónicas identificadas por IPA.** Las vías canónicas relacionadas con los genes sobreexpresados (en rojo) y subexpresados (en verde) en suicidas con TUS en comparación con no suicidas con TUS.

### Suicidas sin TUS vs. No suicidas sin TUS

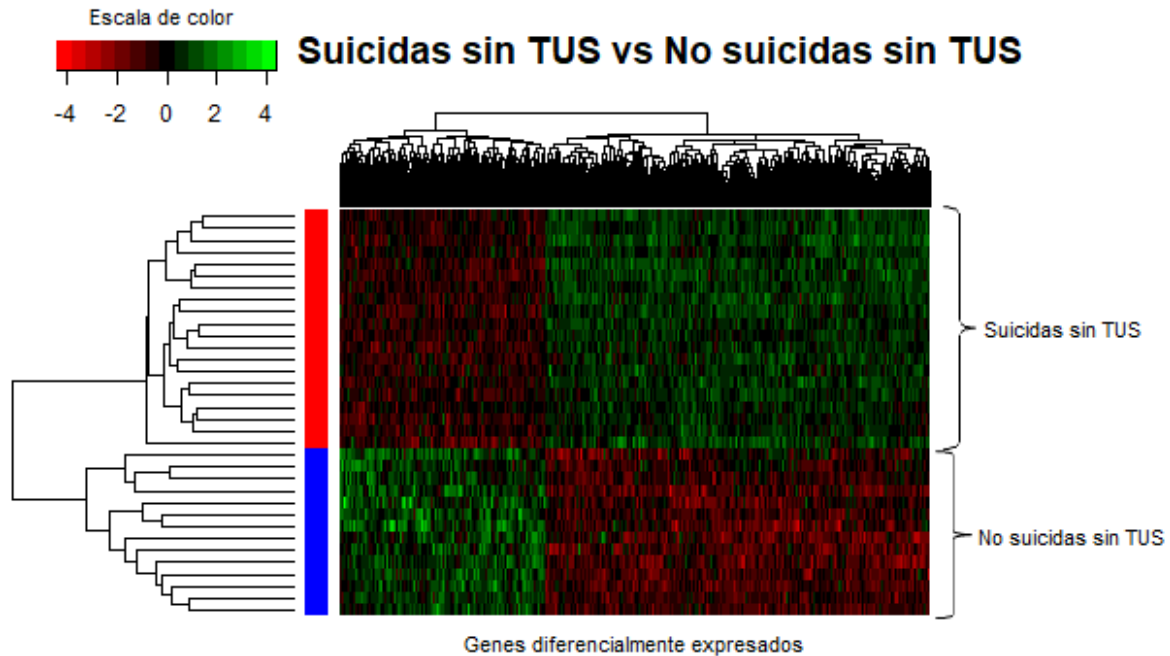
En la comparación entre los suicidas sin TUS (n = 20) y los no suicidas sin TUS (n = 14), 1,417 genes fueron identificados como diferencialmente expresados. De estos 1,417 genes, 923 se encontraban sobreexpresados y 494 subexpresados en los suicidas sin TUS con respecto a los no suicidas sin TUS. De estos 1,417 genes, 1,386 genes eran codificantes y 31 no codificantes. Los 10 genes con el menor valor de p corregido por FDR, y por lo tanto mayor significancia estadística de esta comparación se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17. Los diez genes diferencialmente expresados con mayor significancia estadística entre Suicidas sin TUS y no suicidas sin TUS**

Símbolo	FC	Valor de p	Valor de p corregido por FDR*	Nombre del gen
ISCA1	1.476515	5.78E-22	1.98E-18	Homólogo de ensamblaje 1 de grupos de hierro-azufre
UCHL1	1.772432	5.62E-22	1.98E-18	Ubiquitina carboxiterminal hidrolasa L1
SMS	1.462325	5.06E-21	1.16E-17	Espermina sintasa
PPP3CB	1.569236	7.89E-21	1.35E-17	Isoforma beta de la subunidad catalítica de la fosfata de serina / treonina 2B
NECAP1	1.498602	3.89E-20	5.33E-17	Proteína asociada a endocitosis NECAP 1
CNOT7	1.490776	7.89E-20	7.73E-17	Subunidad 7 del complejo de transcripción CCR4-NOT
ACTR10	1.574546	7.01E-20	7.73E-17	Homólogo de la proteína 10 relacionada con la actina
HINT1	1.537715	2.45E-19	2.10E-16	Proteína 1 de unión a nucleótidos de la tríada de histidina
SLC25A4	1.567262	3.22E-19	2.46E-16	Miembro 4 familia de transportadores de solutos 25
RAN	1.463132	4.51E-19	3.10E-16	Miembro de la familia de oncogenes RAS

Abreviaturas: Fold-change (FC); False Discovery Rate (FDR)

El mapa de calor correspondiente a esta comparación mostró que los individuos de estos grupos se agruparon de acuerdo con la similitud de sus perfiles de expresión génica, como se muestra en la Figura 21.



**Figura 21. Mapa de calor de los genes expresados diferencialmente entre suicidas y no suicidas sin TUS.** Los genes expresados diferencialmente se muestran en columnas y las muestras en filas. Los niveles de expresión génica se representan en el espectro rojo-verde para genes sub y sobre-expresados, respectivamente.

Los resultados del análisis funcional realizados por separado para los genes sub-expresados y sobre-expresados identificados en la comparación entre suicidas y no suicidas sin TUS, así como el número de genes relacionado a cada término y su significancia estadística se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18. Términos de ontología génica relacionados con genes diferencialmente expresados entre suicidas sin TUS y no suicidas sin TUS**

Identificador del término de ontología génica	Término de ontología génica	Número de genes	% del total de genes	EASE*
<b>Genes subexpresados</b>				
GO:0007154	Comunicación celular	211	42.7	3.83 E-7
GO:0010468	Regulación de la expresión génica	158	32.0	3.88E-7
GO:0012501	Muerte celular programada	72	14.60	2.82 E-4
GO:002200	Neurogénesis	61	12.37	1.15E-4
GO:0043069	Regulación negativa de la muerte celular programada	35	7.09	0.0043
GO:0043068	Regulación positiva de la muerte celular programada	33	6.69	3.36 E-5
GO:1901214	Regulación de muerte neuronal	15	3.04	0.006
<b>Genes sobreexpresados</b>				
GO:0005739	Mitocondria	213	23.07	4.75-41

GO:0012501	Muerte celular programada	123	13.32	4.66E-4
GO:0043005	Proyecciones neuronales	87	9.42	1.81E-8
GO:0006811	Transporte de iones	104	11.26	1.13E-4

\*valor de p para prueba exacta de Fisher modificada. Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS)

Los resultados del análisis funcional conjunto, es decir incluyendo tanto genes como sobre-expresados como sub-expresados de la comparación entre suicidas y no suicidas sin TUS, se muestran en la Tabla 19.

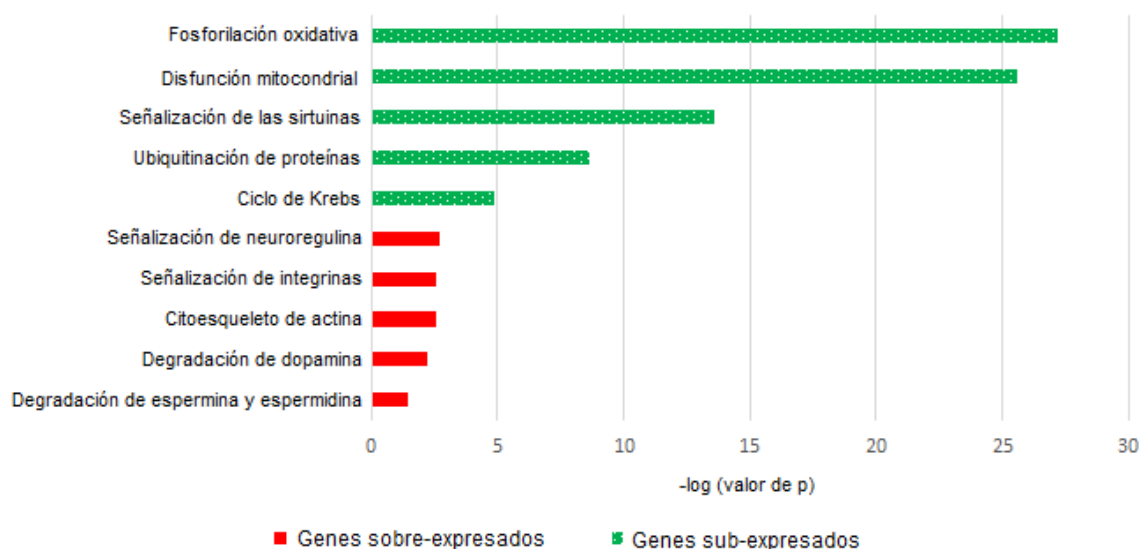
**Tabla 19. Términos de ontología génica relacionados con genes diferencialmente expresados entre suicidas y no suicidas sin TUS (análisis conjunto).**

Identificador del término de ontología génica	Término de ontología génica	Número de genes	% del total de genes	EASE*
GO:0005739	Mitocondria	271	19.13	5.39E-38
GO:0010646	Regulación de comunicación celular	299	21.11	6.53E-8
GO:0012501	Muerte celular programada	195	13.77	4.62E-7
GO:0030182	Diferenciación neuronal	123	8.68	6.21E-4
GO:0043005	Proyecciones neuronales	112	7.90	6.71E-7

\*valor de p para prueba exacta de Fisher modificada. Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS)

Las vías canónicas relacionadas con los genes sub- y sobre-expresados de la comparación identificadas en el análisis con IPA entre suicidas y no suicidas sin TUS, se muestran en la Figura 22.

### Vías canónicas: Suicidas sin TUS vs No suicidas sin TUS



**Figura 22. Vías canónicas identificadas por IPA.** Las vías canónicas relacionadas con los genes sobre-expresados (en rojo) y sub-expresados (en verde) en suicidas sin TUS en comparación con no suicidas sin TUS.

*No suicidas con TUS vs. no suicidas sin TUS*



Al comparar el perfil de expresión génica de no suicidas con TUS (n = 9) con el de no suicidas sin TUS (n = 14), identificamos que el gen *LOC285074* se encontraba sub-expresado en no suicidas con TUS con respecto a los no suicidas sin TUS. El gen *LOC285074* codifica para el pseudogen de la subunidad 1 del complejo promotor de la anafase.

### *Interacción entre Suicidio y TUS*

La interacción entre suicidio y TUS exhibió influencia en la expresión de 55 genes. De estos genes, 26 se encontraban sub-expresados y 29 sobre-expresados. De estos 55 genes, 53 genes eran codificantes y 2 no codificantes. Los 10 genes con el menor valor de p corregido por FDR, y por lo tanto mayor significancia estadística de esta comparación se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20. Los diez genes diferencialmente expresados con mayor significancia estadística de la interacción entre suicidio y TUS**

Símbolo	FC	Valor de p	Valor de p corregido por FDR*	Nombre del gen
<i>FNBP1</i>	1.41257	9.09E-10	6.24E-06	Proteína de unión a formina 1
<i>CNP</i>	1.501119	2.31E-09	7.94E-06	2'3'-nucleótido cíclico 3' fosfodiesterasa
<i>RAN</i>	-1.36345	4.76E-09	1.09E-05	Miembro RAN de la familia de oncogenes RAS
<i>CDK19</i>	1.412032	4.16E-08	7.14E-05	Cinasa dependiente de ciclina 19
<i>SMS</i>	-1.28592	9.13E-08	0.000125	Espermina sintasa
<i>KLHL28</i>	-1.54792	1.99E-07	0.000152	Miembro 28 de la familia Kelch
<i>DNAJC12</i>	-1.43653	1.88E-07	0.000152	Miembro C12 de la familia de proteínas de choque térmico DNAJ (Hsp40)
<i>SLC35E1</i>	-1.42346	1.33E-07	0.000152	Miembro E1 familia de transportadores de solutos 35
<i>SLC48A1</i>	1.25577	1.98E-07	0.000152	Miembro 1 familia de transportadores de solutos 48
<i>YES1</i>	1.443003	2.38E-07	0.000164	Proto-oncogen tirosina-proteína cinasa 1 YES

Abreviaturas: Fold-change (FC); False Discovery Rate (FDR)

Los resultados del análisis funcional de los genes de este contraste, así como el número de genes relacionado a cada término y su significancia estadística se muestran en la Tabla 21.

**Tabla 21. Términos de ontología génica relacionados con genes influidos por la interacción de suicidio y TUS**

Identificador del término de ontología génica	Término de ontología génica	Número de genes	% del total de genes	EASE*	Genes sobre-expresados	Genes sub-expresados
GO:0016740	Actividad transferasa	14	25.92	0.037	CDK19, PACSIN3, PTAR1, RASSF2, YES1, PTPN11	HSP90AA1, MAP2K4, POLR3A, SMS, UHMK1, ISCU, KLHL28, GTF2H3
GO:0016301	Actividad cinasa	9	16.66	0.007	CDK19, HSP90AA1, PACSIN3, RASSF2, GTF2H3, YES1, UHMK1, PTPN11	MAP2K4
GO:0010001	Diferenciación de células gliales	5	9.25	0.005	SOX10, OLIG1, NDRG1, CNP, PTPN11	
GO:0006950	Respuesta a estrés	18	33.33	0.027	CDK19, HMGB1, HSP90AA1, SNX6, AP2S1, GTF2H3, COPS8, CNOT7, PTPN11, LSM14A, PCBP4, RASSF2, NDRG1, YES1,	UCHL1, MAP2K4, POLR3A, AACS
GO:0002682	Regulación de procesos del sistema inmune	9	16.66	0.016	LSM14A, HMGB1, HSP90AA1, SNX6, AP2S1, RASSF2, YES1, PTPN11	MAP2K4

\*valor de p para prueba exacta de Fisher modificada. Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS)

### **Discusión: Expresión génica en individuos con trastorno por uso de sustancias que murieron por suicidio**

Según tenemos entendido, este es el primer estudio en comparar el perfil de expresión génica a nivel del transcriptoma completo en la corteza prefrontal dorsolateral de suicidas con TUS y suicidas sin este trastorno, ya que el TUS ha sido considerado como un factor confuso en la mayoría de los estudios del transcriptoma (Fiori & Turecki, 2010). Por lo anterior, individuos con TUS han sido excluidos de los análisis de expresión génica en suicidio. En resumen, nuestros resultados indicaron que los suicidas con TUS presentan un perfil de expresión génica en la corteza prefrontal dorsolateral distinto al de aquellos con solo una de estas condiciones, es decir, suicidas sin esta comorbilidad y sujetos con TUS que fallecieron por causas distintas al suicidio.

#### *Suicidas con TUS vs. suicidas sin TUS*

Al comparar el perfil de expresión génica de suicidas con TUS con el de suicidas sin este trastorno, observamos una evidente sobreexpresión de genes que participan en vías involucradas en la regulación de la proliferación y migración celular, como las GTPasas de la familia Rho, la señalización de invasión del glioma y la señalización de esfingosina 1 fosfato. De esta última vía, recientemente fue reconocido su papel determinante en la supervivencia y proliferación celulares (Karnoub & Der, 2013; Karunakaran & van Echten-Deckert, 2017). Hasta el momento, ninguna de estas vías de señalización se ha relacionado con la patología del suicidio. Sin embargo, se ha reportado que el trastorno por uso del alcohol está asociado a una aberrante

migración y proliferación celular de células gliales y neuronales (Kumada et al., 2007; Guerri et al., 2009; Nixon et al., 2010). Lo cual coincide con nuestros resultados en esta comparación, ya que ambos grupos son suicidas, cuya única diferencia era la presencia o ausencia de TUS. Por lo que la observada sobreexpresión de genes que participan en la proliferación y migración celular pudiera deberse al efecto del trastorno por uso de sustancias, particularmente el alcohol, que fue la sustancia más consumida por los individuos de nuestra muestra.

La señalización en la enfermedad de Parkinson fue una de las vías enriquecidas para los genes sub-expresados de esta comparación, incluyendo a los genes pro-apoptóticos *CYCC*, *UCHL1* y *SNCA* (Li et al., 2018). Es de destacar que también se demostró la expresión anormal de genes implicados en la proliferación celular y su regulación, como los genes que codifican para MAPK. Este hallazgo sugiere que los suicidas con TUS podrían tener un aumento de la proliferación celular, lo cual podría conducir a una mayor densidad celular. Esta mayor densidad celular podría causar anomalías estructurales en la corteza prefrontal de suicidas con TUS y subsecuentemente, una función alterada de esta área cerebral. Hasta el momento, no se han realizado estudios de neuroimagen en individuos con conducta suicida y TUS que permitan determinar si dichas anomalías estructurales y funcionales se presentan en este grupo de pacientes.

Este posible aumento de la proliferación celular, de ser corroborado por futuros estudios, podría ser una diferencia importante en comparación con individuos con trastorno por uso del alcohol, para los cuales se ha reportado una disminución de la densidad neuronal y glial en la corteza prefrontal (Johansson et al., 2009; Harper et al., 2003; Miguel-Hidalgo et al., 2002). En suicidas sin TUS también se ha encontrado una menor densidad neuronal en el área 9 de Brodmann (Underwood et al., 2012), por lo que también podría ser una diferencia en comparación con suicidas sin TUS.

Entre los genes identificados como diferencialmente expresados entre suicidas con TUS y suicidas sin TUS se encuentran *SLC1A2*, *SLC1A3* y *GLUD1*, que son genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo del glutamato. Los dos primeros genes codifican para transportadores de este neurotransmisor; mientras que *GLUD1* codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa, que cataliza la desaminación oxidativa del glutamato.

A partir de estudios previos se ha acumulado evidencia de una posible alteración de la neurotransmisión glutamatérgica en individuos con comportamiento suicida. Se ha reportado la sobreexpresión de los genes que codifican para los receptores NMDA 1A (*GRINL1A*), NMDA 2A (*GRIN2A*), AMPA 1–4 (*GRIA1*, *GRIA2* y *GRIA4*), y el receptor de kainato 1 (*GRIK1*) (Klempan et al.2009; Sequeira et al.2009; Thalmeier et al.2008; (Fiori & Turecki, 2010). Además de una subexpresión de los genes que codifican para la glutamato-amoniaco ligasa (*GLUL*), el receptor metabotrópico de glutamato 3

(*GRM3*), y los transportadores de glutamato *SLC1A2* y *SLC1A3* (Kim et al.2007; Klempan et al. 2009; Sequeira et al.2009; Fiori & Turecki, 2010).

Sin embargo, un hallazgo interesante de nuestro estudio fue la sobreexpresión de genes relacionados con esta vía biológica en suicidas con TUS, ya que previos estudios *post mortem* reportaron una subexpresión de estos genes en suicidas con trastorno depresivo mayor y trastorno bipolar en comparación con controles no suicidas en la corteza prefrontal (Sequeira et al., 2009; Choudary et al., 2005).

La sobreexpresión de los genes involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica podría deberse a la exposición crónica al etanol en la mayoría de los suicidas con TUS de nuestra muestra, ya que estudios previos han encontrado alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica en individuos con dependencia del alcohol y en modelos animales de alcoholismo (Chandler et al., 1993; Selim & Bradberry, 1996).

Con respecto a los genes que participan en la neurotransmisión glutamatérgica identificados como sobreexpresados en nuestro estudio, han sido reportados como sobreexpresados en condiciones de exposición crónica al alcohol, por ejemplo, *SLC1A3* en la corteza prefrontal de humanos con uso crónico de alcohol (Kashenm et al., 2019), *SLC1A2* en organoides de tejido cerebral cortical en respuesta a una exposición crónica a etanol (Zink et al., 2004) y *GLUD1* en ratas posterior al consumo de esta sustancia (McClintick et al., 2015). Nuestros resultados sugieren que los suicidas con TUS presentan alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica que son distintas de las alteraciones en suicidas sin TUS.

Otro resultado interesante fue la sobreexpresión de genes que codifican para las conexas 30 y 43 en suicidas con TUS. Se ha reportado una menor expresión de estos genes en la corteza prefrontal de suicidas en comparación con no suicidas (Ernst et al., 2011), además de una expresión reducida de su proteína en la corteza orbitofrontal de individuos con depresión y dependencia del alcohol (Miguel-Hidalgo et al., 2014). Lo cual se ha interpretado como evidencia a la posible participación de los astrocitos en la patología del suicidio.

El hallazgo de que la expresión de los genes implicados en la neurotransmisión glutamatérgica y los genes para las conexas 30 y 43 en suicidas con TUS se haya encontrado en la dirección opuesta a la reportada previamente para suicidas con otras patologías psiquiátricas, sugiere que la presencia de TUS podría conducir a cambios únicos en la expresión génica en la corteza prefrontal de suicidas.

Es necesario que nuestros resultados sean replicados en otras muestras y poblaciones, además de ser corroborados en estudios funcionales. En caso de ser replicados, estos hallazgos podrían tener implicaciones terapéuticas importantes, lo que llevaría al diseño de estrategias de tratamiento basadas en las alteraciones específicas en pacientes con TUS con alto riesgo suicida. Estas estrategias podrían

estar orientadas a la modulación farmacológica de la expresión génica de aquellos genes que sean susceptibles a esta modulación y además muestren tener un papel relevante en la patología de la conducta suicida en el contexto del TUS.

#### *Suicidas con TUS vs. no suicidas con TUS*

Se detectó una sobreexpresión de genes implicados en la fosforilación oxidativa y la función mitocondrial en suicidas con TUS en comparación con no suicidas con TUS, lo que sugiere un aumento de la demanda de energía en la corteza prefrontal en los suicidas con TUS. Este aumento en la demanda energética tiene un potencial impacto en la función sináptica y neuronal. Dado que los agentes oxidantes formados en la mitocondria activan varias vías de señalización relacionadas con la apoptosis (Beech et al., 2010), era esperado que este término de ontología génica también estuviera asociado a los genes diferencialmente expresados de esta comparación.

Además, la función mitocondrial es crucial en la migración neural, un proceso especialmente relevante en este estudio, dada la naturaleza del tejido estudiado (Austin et al., 2006; Lin-Hendel, 2017; Devaraju & Zakharenko, 2017). Otras vías canónicas asociadas con los genes expresados diferencialmente de esta comparación son la endocitosis mediada por clatrina y la síntesis de sulfato de condroitina, que también han sido implicadas en la migración neural (Shieh et al., 2011; Sun et al., 2017). Esto sugiere una desregulación en esta función en los suicidas con TUS, que pudiera ser parte de un proceso de refinamiento sináptico, es decir, la reorganización de sinapsis sin cambios significativos en el número de conexiones (Uribe & Wix, 2012; Hoel et al., 2016).

Este proceso de refinamiento sináptico, que no ha sido estudiado hasta el momento en suicidas ha sido descrito en neuronas GABAérgicas en trastorno bipolar. Durante el neurodesarrollo, inicialmente se establecen conexiones sinápticas supernumerarias. Las sinapsis que son poco eficientes son eliminadas con lo que se obtiene un conectoma más preciso y funcional (Vonhoff F & Keshishian, 2017). Brevemente, durante el neurodesarrollo se ha descrito una alta expresión de genes proapoptóticos (BAX, BAD, caspasa-9 y caspasa-3), que pudiera causar apoptosis y un subsecuente déficit de interneuronas en la corteza cerebral e hipocampo en los individuos con trastorno bipolar. Posteriormente, las neuronas GABAérgicas migran y completan su maduración a fin de alcanzar una apropiada inclusión en un circuito específico bajo la influencia de BDNF, reelina y neuroregulina 1 (Uribe & Wix, 2012).

#### *Suicidas con TUS vs. no suicidas con TUS*

De forma similar a la comparación anterior, encontramos una sobreexpresión de genes involucrados en la función mitocondrial. Esta observación es interesante, ya que ambas comparaciones son entre individuos suicidas y no suicidas en presencia o ausencia de TUS, respectivamente. Lo cual sugiere que el aumento de la expresión

de genes mitocondriales podría ser relevante en la fisiopatología del suicidio independientemente de la comorbilidad con TUS.

Pantazatos y sus colaboradores (2017), reportaron un aumento en la expresión de genes relacionados con la actividad de la ATPasa en la corteza prefrontal de suicidas en comparación con no suicidas (valor de corregido por *FDR* <0.1). Por lo tanto, anticipamos que estudios futuros centrados en la función mitocondrial de sujetos con comportamiento suicida serán útiles para esclarecer el papel de este proceso en la patología del suicidio.

#### *No suicidas con TUS vs. no suicidas sin TUS*

Al comparar el perfil de expresión génica de los no suicidas con TUS con el de no suicidas sin este trastorno, detectamos la subexpresión de *LOC285074*, que codifica para un pseudogén. El que hayamos encontrado un mayor número de genes diferencialmente expresados en otras comparaciones con respecto a esta puede deberse a que nuestros criterios para considerar un gen como diferencialmente expresado entre los grupos probablemente fueron estrictos para detectar diferencias en esta comparación. Pudiendo ser el caso que los genes con expresión diferencial entre estos grupos no tuvieran la suficiente significancia estadística para ser considerados como diferencialmente expresados de acuerdo con nuestros criterios.

Es de destacar que, de acuerdo con estudios en enfermedades neurodegenerativas, los pseudogenes y otros RNA no codificantes, por ejemplo, *CRYBB2P1* (pseudogen) y *BACE1-AS* (RNA no codificante) en enfermedad de Alzheimer y *CHCHD2P2* en enfermedad de Parkinson podrían participar en la regulación de la expresión génica a través de la competencia por los sitios ocupados por *miRNAs* (Costa et al., 2012). Además, los pseudogenes pueden participar en otras formas de regulación génica como la formación de RNA pequeño de interferencia (*siRNA*) y al competir por la unión con factores que modulan la estabilidad del RNA, interfiriendo con la estabilidad de esta molécula (Tutar, 2011; Pink et al., 2011).

Por lo que, aunque por el momento no contamos información sobre la función que pudiera desempeñar este pseudogén en la patología de los TUS, no podríamos descartar que tuviera un papel en la regulación de la expresión génica. Futuros estudios nos permitirán determinar si este pseudogén es relevante en la patología de TUS en individuos no suicidas.

#### *Interacción entre suicidio y TUS*

Además de encontrar una sobreexpresión de genes involucrados en la proliferación celular en la comparación entre suicidas con y sin TUS, también encontramos genes involucrados en este proceso entre los genes cuya expresión está influenciada por la interacción entre TUS y suicidio, incluyendo los genes *CNOT*, *ATP6VOC*,

*MARCKSL1*, *NDRG1* y *RAN*. Este resultado sugiere que la proliferación celular y su regulación podrían ser relevantes en la interacción de ambos trastornos.

La sobreexpresión de los genes que participan en la diferenciación de las células gliales, como *SOX10*, *OLIG1*, *NDRG1*, *CNP* y *PTPN11*, añade evidencia de la probable participación de las células gliales en la interacción entre suicidio y TUS. Anteriormente, se ha demostrado que los sujetos suicidas con dependencia del alcohol presentan una mayor densidad glial en la corteza del cíngulo anterior en comparación con suicidas sin dependencia (Hercher et al., 2009). Si esta mayor densidad glial es a expensas de algún tipo específico de células gliales deberá ser determinado en estudios futuros, ya que en el estudio de Hercher y sus colaboradores (2009) se utilizó una tinción no específica que permitiera identificar subtipos celulares.

Aunque no evaluamos la expresión génica en la corteza del cíngulo anterior, el estudio de Hercher y sus colaboradores (2009) sugiere que la dependencia a sustancias, en este caso, el alcohol, en interacción con el suicidio puede influir en la densidad glial. En este contexto, la sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación celular sugiere que la mayor densidad glial reportada en el cíngulo anterior también podría encontrarse en la corteza prefrontal dorsolateral, que fue el área analizada en nuestro estudio.

Un posible mecanismo que podría contribuir al aumento de la expresión de genes relacionados con la proliferación glial es la combinación de efectos inmunomoduladores y factores relacionados con el estrés, que conducirían a una mayor densidad glial (Hercher et al., 2009). En nuestros resultados encontramos a la respuesta al estrés y la regulación de procesos del sistema inmune dentro de los términos relacionados con los genes influidos por la interacción de suicidio y TUS. Lo cual, concuerda con el mecanismo propuesto por Hercher y sus colaboradores (2009).

Se ha sugerido que la interacción entre depresión y TUS podría conducir a una disfunción glial y una consecuente alteración en las funciones generales de estas células, incluyendo soporte metabólico, modulación de la neurotransmisión GABA y glutamatérgica (Niciu et al., 2014; Goodwani et al., 2017; Kimelberg & Nedergaard, 2010). La modulación farmacológica de la neurotransmisión glutamatérgica podría ser clave en el tratamiento del TUS en comorbilidad con otros desórdenes mentales, ya que se ha demostrado que la ketamina, un agente modulador del glutamato, reduce el índice de suicidio en poblaciones de alto riesgo (Goodwani et al., 2017; Price et al., 2009; DiazGranados et al., 2010), por lo que la inclusión de este medicamento en el tratamiento de sujetos con TUS con riesgo suicida es una opción que debe ser explorada en investigaciones futuras.

### **Expresión génica en individuos con patología dual que murieron por suicidio**

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto a la edad ( $p = 0.769$ ), sexo ( $p = 0.133$ ), mecanismo de muerte ( $p = 0.15$ ) e intervalo *post mortem* ( $p = 0.48$ ). El trastorno por uso de alcohol fue el TUS más frecuente en los grupos de individuos con patología dual y TUS. En el grupo de individuos con patología dual, nueve individuos tenían trastorno por uso de alcohol y un individuo presentó trastorno por uso de benzodiazepinas.

De los individuos con trastorno por uso de alcohol en el grupo de patología dual, dos individuos además tenían trastorno por uso de *cannabis*, uno tenía trastorno por uso de cocaína y un individuo presentaba trastorno por uso de tabaco. En el grupo de TUS, ocho individuos presentaron trastorno por uso de alcohol, uno tenía trastorno por uso de cocaína y otro tenía trastorno por uso de inhalantes. Entre los sujetos con trastorno por uso de alcohol en el grupo de TUS, dos individuos además tenían trastorno por uso de tabaco.

El DM fue el trastorno del estado de ánimo más frecuente en los grupos de patología dual y trastornos del estado del ánimo (90% y 77%, respectivamente). Las características demográficas y clínicas de la muestra analizada en este re-análisis se muestran en la Tabla 22.

**Tabla 22. Características de la muestra reanalizada**

	Patología dual	TUS	Trastornos del estado del ánimo	Suicidas sin comorbilidad mental	Valor de p
Número de individuos	10	10	13	5	
Edad (años)	36.5 ± 22.51	29.7 ± 13.58	30.92 ± 16.87	36.40 ± 12.62	0.769
Sexo (H:M)	9:1	10:0	9:4	3:2	0.133
IPM (horas)	15.4 ± 4.02	14.5 ± 4.39	14.40 ± 4.13	18.41 ± 5.47	0.48
Trastorno psiquiátrico <sup>1</sup>	9/1/10	0/0/10	10/3/0	0/0/0	
RIN	6.1 ± 1.08	6.37 ± 1.20	6.55 ± 1.20	5.96 ± 1.29	0.30
Mecanismo de muerte <sup>2</sup>	7/0/2/0/1	10/0/0/0/0	9/1/1/1/1	5/0/0/0/0	0.15
Resultado positivo en examen toxicológico	8	7	2	1	0.003

Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS); hombres (H); mujeres (M); Intervalo *post mortem* (IPM).

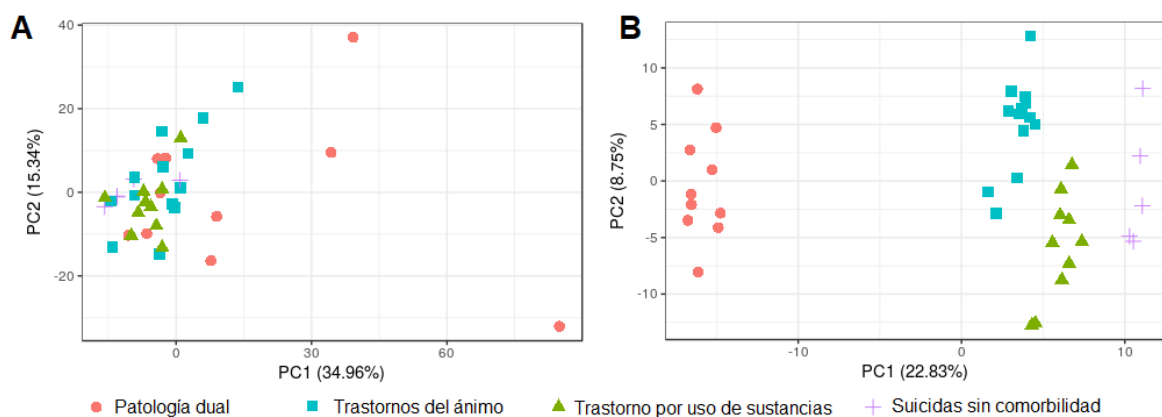
<sup>1</sup>Trastorno de depresión mayor/Trastorno bipolar/TUS

<sup>2</sup>Asfixia/Disparo/Intoxicación/Trauma/Punzocortante



Se evaluó la presencia de posibles efectos de lote en la muestra estudiada al graficar la distribución de las muestras de acuerdo con los dos primeros componentes principales determinados por un análisis de componentes principales. En esta gráfica observamos que los grupos de comparación presentaban un efecto de lote asociado a una fuente de variabilidad no identificada (Figura 23A). Por lo que, este efecto de lote fue corregido con el paquete *ARSyN* (Nueda, Conesa & Ferrer, 2012).

Al graficar la distribución de las muestras sobre los dos primeros componentes principales después de la corrección del efecto de lote con *ARSyN*, notamos una separación de las muestras en los grupos de comparación sobre el primer componente principal, como se indica en la Figura 23B.



**Figura 23. Análisis de componentes principales de las muestras.** A) Después de la normalización por cuantiles de los datos. Se observa un efecto de lote asociado a una fuente de variabilidad no identificada en los grupos de comparación. B) Eliminación del efecto de lote con un análisis multidimensional con *ARSyN*. Se observa separación de las muestras de acuerdo con los grupos de comparación.

### Patología dual vs. TUS

Al comparar el perfil de expresión génica de suicidas con patología dual vs. suicidas con TUS, se identificaron 255 genes diferencialmente expresados, de los cuales 32 se encontraban sobre-expresados y 223 sub-expresados en los suicidas con patología dual con respecto a los suicidas con TUS. De estos 225 genes, 224 genes eran codificantes y uno no codificante. Los 10 genes con el menor valor de *p* corregido por FDR, y por lo tanto mayor significancia estadística de esta comparación se muestran en la Tabla 23.

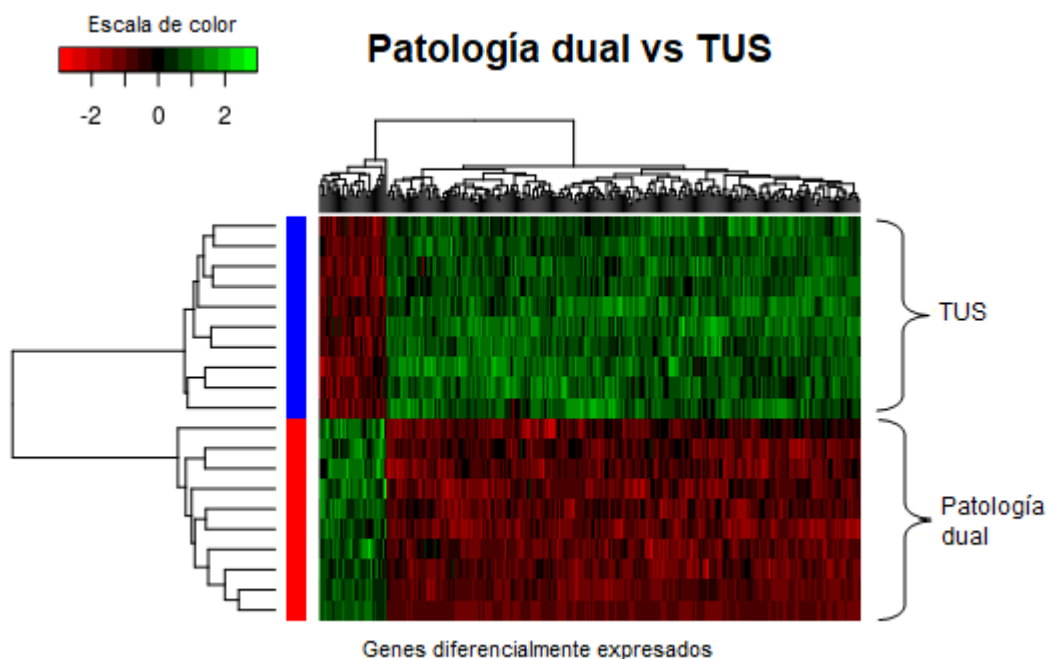
**Tabla 23. Los diez genes diferencialmente expresados con mayor significancia estadística entre suicidas con patología dual y suicidas con TUS**

Símbolo	FC	Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i> corregido por FDR*	Nombre del gen
<i>EPHA4</i>	-2.07	4.05E-14	3.01E-10	Receptor de EPH A4
<i>PAK1</i>	-1.69	9.62E-14	3.01E-10	Serina / treonina-proteína cinasa PAK 1
<i>SYT1</i>	-2.25	9.66E-14	3.01E-10	Synaptotagmina-1

<i>NELL2</i>	-1.81	2.65E-13	6.17E-10	Proteína de unión a la proteína cinasa C NELL2
<i>BTBD10</i>	-1.61	5.08E-13	9.49E-10	Proteína que contiene el dominio BTB / POZ 10
<i>WDR47</i>	-1.75	1.02E-12	1.55E-09	Dominio de repetición WD 47
<i>RGS4</i>	-1.70	1.17E-12	1.55E-09	Regulador de la señalización de la proteína G4
<i>SV2B</i>	-1.61	3.03E-12	3.54E-09	Glicoproteína 2B de la vesícula sináptica
<i>DYNC111</i>	-1.63	4.99E-12	5.17E-09	Cadena intermedia 1 de la dineína citoplasmática 1
<i>PHF24</i>	-1.67	9.60E-12	8.96E-09	Proteína en dedos de zinc 24

Abreviaturas: Fold-change (FC); False Discovery Rate (FDR)

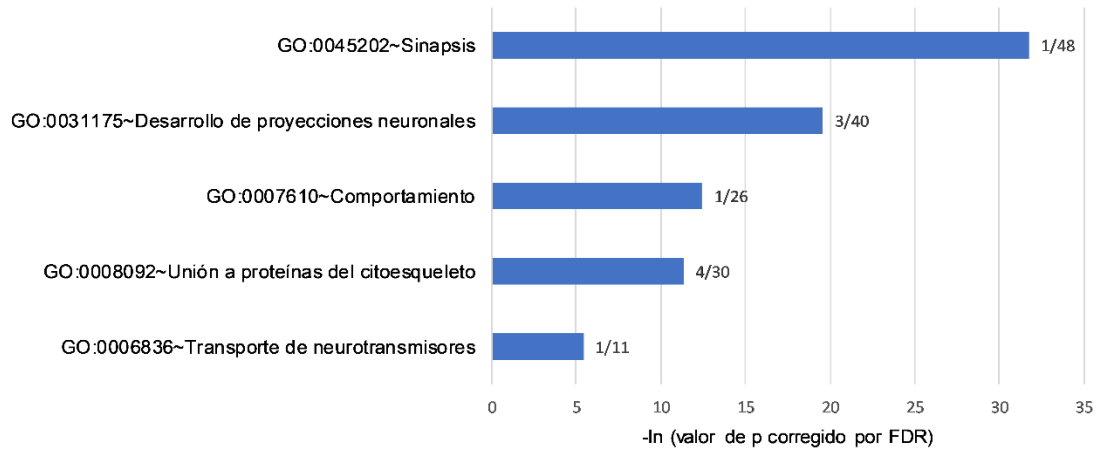
El mapa de calor de los genes diferencialmente expresados de esta comparación mostró una clara separación de los grupos (Figura 24).



**Figura 24. Mapa de calor de los genes expresados diferencialmente entre suicidas con patología dual y suicidas con TUS.** Los genes expresados diferencialmente se muestran en columnas y las muestras en filas. Los niveles de expresión génica se representan en el espectro rojo-verde para genes sub y sobre-expresados, respectivamente.

Los resultados del análisis de ontología génica incluyendo tanto a los genes sub-expresados como los sobre-expresados identificados en la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con TUS, se muestran en la Figura 25.

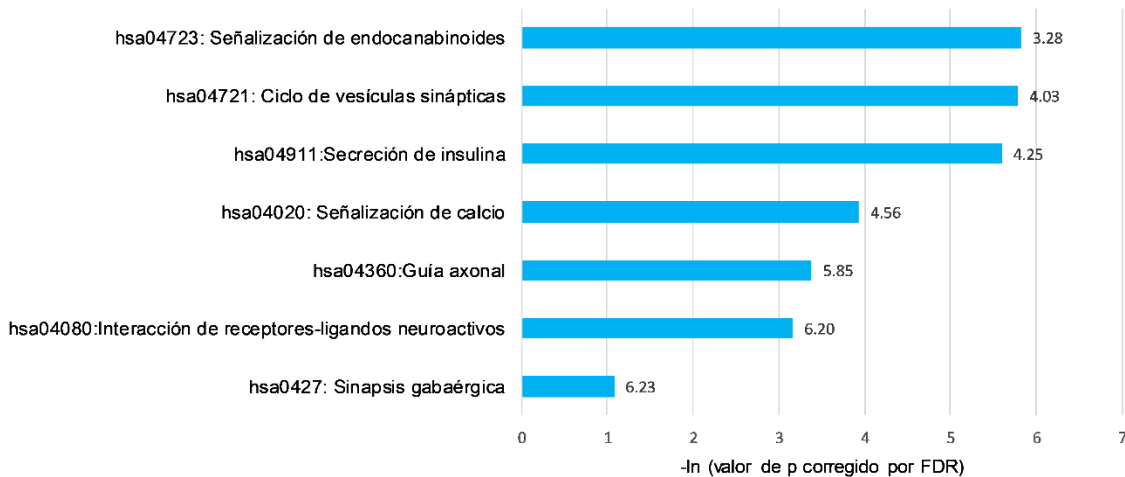
## Ontología génica: Patología dual vs TUS



**Figura 25.** Términos de ontología génica relacionados con genes expresados diferencialmente de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con TUS. Al final de cada barra se indica el número de genes sobre-expresados/ sub-expresados relacionado con cada término, respectivamente.

Las vías biológicas relacionadas con los genes diferencialmente expresados de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con TUS identificadas en el análisis con *WebGestalt*, se muestran en la Figura 26.

## Vías biológicas: Patología dual vs TUS



**Figura 26.** Vías biológicas relacionadas con los genes expresados diferencialmente de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con TUS. El puntaje de enriquecimiento asociado con cada vía se muestra al final de cada barra.

### *Patología dual vs. trastornos del estado del ánimo*

La comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del ánimo arrojó 172 genes diferencialmente expresados. De estos genes, 52 se encontraron sobre-expresados y 120 sub-expresados en los suicidas con patología dual con respecto a los suicidas con trastornos del ánimo. De estos 172 genes, 171 genes eran

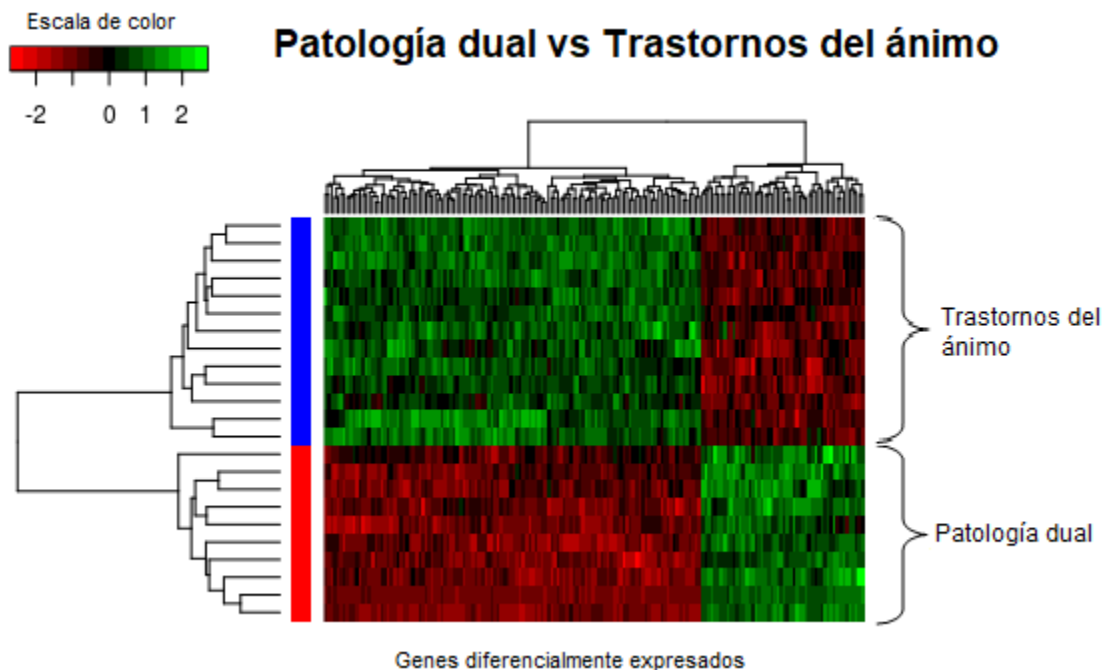
codificantes y uno no codificante. Los 10 genes con el menor valor de p corregido por FDR, y por lo tanto mayor significancia estadística de esta comparación se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24. Los diez genes diferencialmente expresados con mayor significancia estadística entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del estado del ánimo**

Símbolo	FC	Valor de p	Valor de p corregido por FDR*	Nombre del gen
<i>ADCY1</i>	-1.75	2.51E-11	7.80E-08	Adenilato ciclasa 1
<i>GLRB</i>	-1.70	2.16E-11	7.80E-08	Receptor de glicina Beta
<i>GABBR2</i>	-1.54	9.08E-12	7.80E-08	Receptor B de ácido gamma-aminobutírico B2
<i>PHF24</i>	-1.60	4.01E-11	9.37E-08	Proteína en dedos de zinc 24
<i>SYT1</i>	-1.89	6.18E-11	1.15E-07	Synaptotagmina-1
<i>EPHA4</i>	-1.74	1.21E-10	1.88E-07	Receptor de EPH A4
<i>OPCML</i>	-1.47	2.21E-10	2.58E-07	Molécula de adhesión de opioides
<i>CRYAB</i>	1.78	2.21E-10	2.58E-07	Cadena B de alfa-cristalina
<i>TMEM155</i>	-1.74	2.90E-10	2.62E-07	Proteína transmembrana 155
<i>WDR47</i>	-1.58	3.09E-10	2.62E-07	Dominio de repetición WD 47

Abreviaturas: Fold-change (FC); False Discovery Rate (FDR)

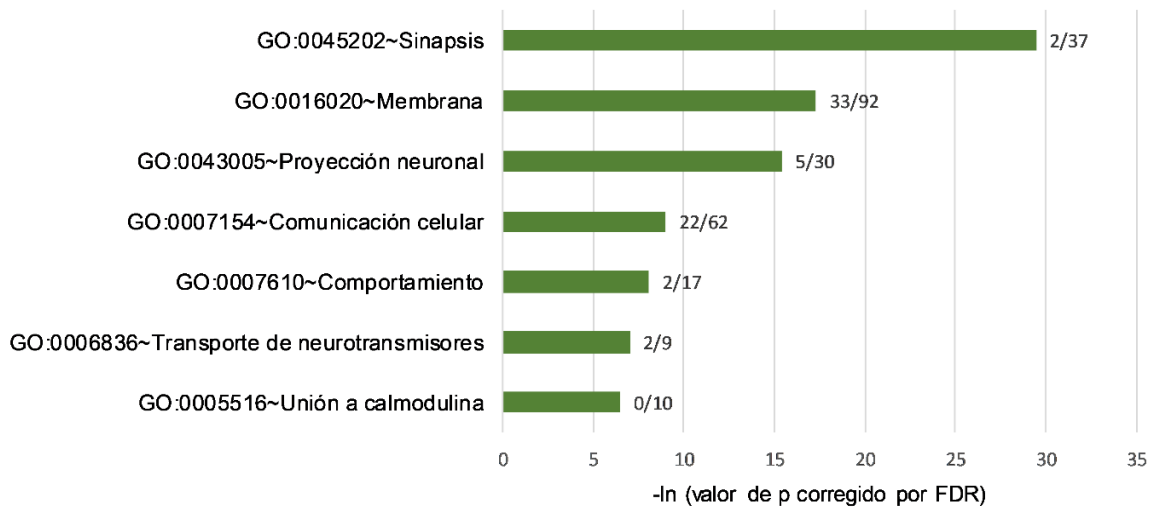
El mapa de calor de los genes diferencialmente expresados de esta comparación mostró una clara separación de los grupos, como se muestra en la Figura 27.



**Figura 27. Mapa de calor de los genes expresados diferencialmente entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del ánimo.** Los genes expresados diferencialmente se muestran en columnas y las muestras en filas. Los niveles de expresión génica se representan en el espectro rojo-verde para genes sub y sobre-expresados, respectivamente.

Los resultados del análisis de ontología génica de los genes diferencialmente expresados de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del ánimo se muestran en la Figura 28.

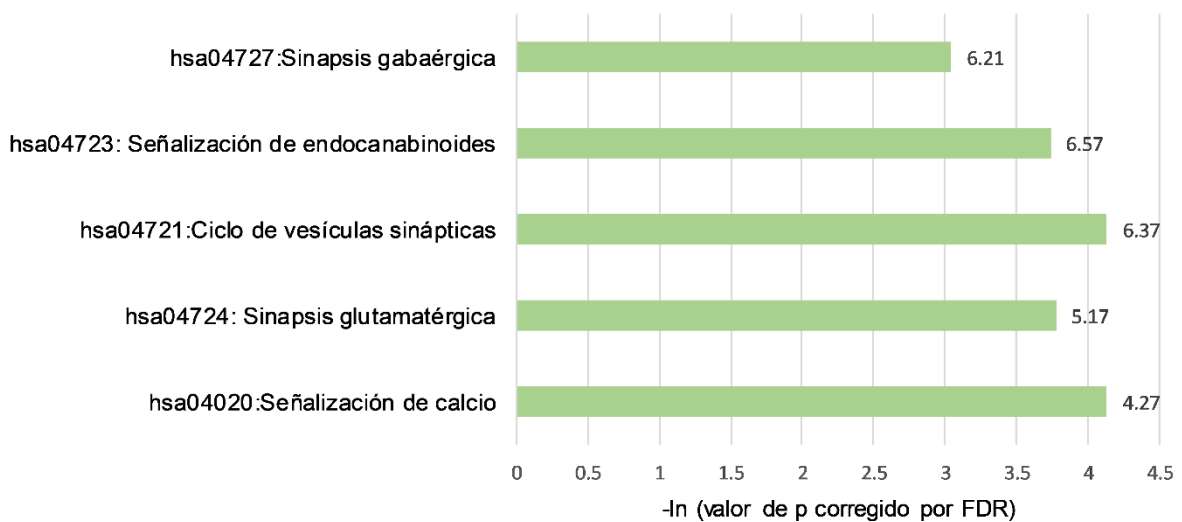
### Ontología génica: Patología dual vs trastornos del ánimo



**Figura 28.** Términos de ontología génica relacionados con genes expresados diferencialmente de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del ánimo. Al final de cada barra se indica el número de genes sobre-expresados/ sub-expresados relacionado a cada término, respectivamente.

Las vías biológicas relacionadas con los genes diferencialmente expresados de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del ánimo se muestran en la Figura 29.

### Vías biológicas: Patología dual vs trastornos del ánimo



**Figura 29.** Vías biológicas relacionadas con los genes expresados diferencialmente de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del ánimo. El puntaje de enriquecimiento asociado con cada vía se muestra al final de cada barra.

### *Patología dual vs. suicidas sin comorbilidad mental*

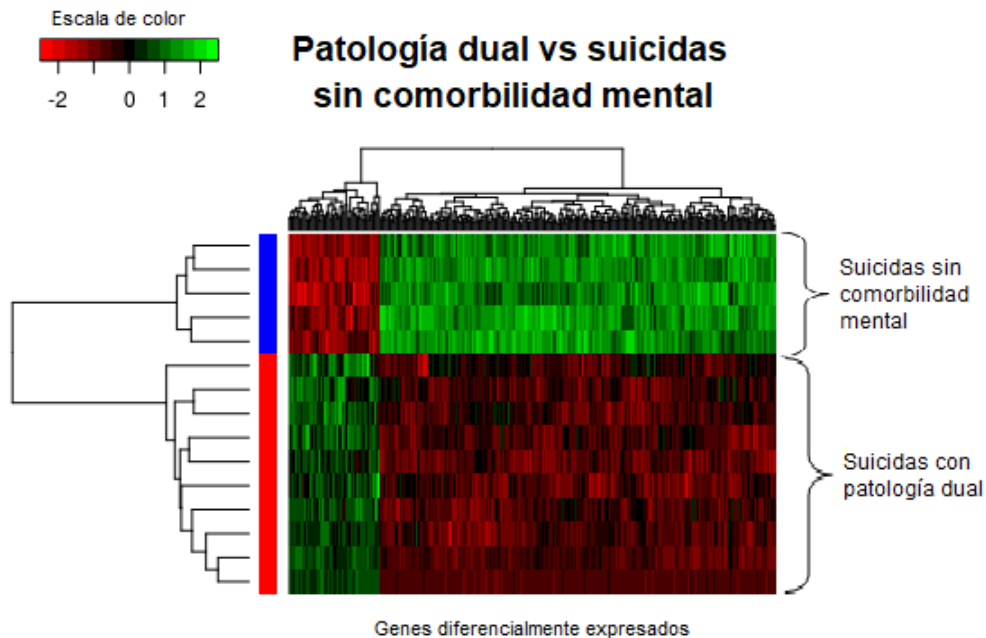
En la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas sin ningún trastorno mental, encontramos 330 genes diferencialmente expresados. 62 de ellos se encontraron sobre-expresados y 268 sub-expresados en los suicidas con patología dual con respecto a los suicidas sin comorbilidad mental. De estos 330 genes, 326 genes eran codificantes y 4 no codificantes. Los 10 genes con el menor valor de p corregido por FDR, y por lo tanto mayor significancia estadística de esta comparación se muestran en la Tabla 26.

**Tabla 26. Los diez genes diferencialmente expresados con mayor significancia estadística entre suicidas con patología dual y suicidas sin comorbilidad mental**

Símbolo	FC	Valor de p	Valor de p corregido por FDR*	Nombre del gen
<i>EPHA4</i>	-2.30054	1.44E-13	6.73E-10	Receptor de EPH A4
<i>PAK1</i>	-1.843359	1.44E-13	6.73E-10	Serina / treonina-proteína cinasa PAK 1
<i>SYT1</i>	-2.55874	2.20E-13	6.84E-10	Synaptotagmina-1
<i>GABBR2</i>	-1.766776	3.26E-13	7.60E-10	Receptor B de ácido gamma-aminobutírico B2
<i>NELL2</i>	-1.980002	6.27E-13	1.17E-09	Proteína de unión a la proteína cinasa C NELL2
<i>WDR47</i>	-1.943109	8.13E-13	1.23E-09	Dominio de repetición WD 47
<i>PHF24</i>	-1.895608	9.24E-13	1.23E-09	Proteína en dedos de zinc 24
<i>GLRB</i>	-2.030365	1.06E-12	1.24E-09	Receptor de glicina Beta
<i>OPCML</i>	-1.699581	1.32E-12	1.37E-09	Molécula de adhesión de opioides
<i>RGS4</i>	-1.850237	1.75E-12	1.63E-09	Regulador de la señalización de la proteína G 4

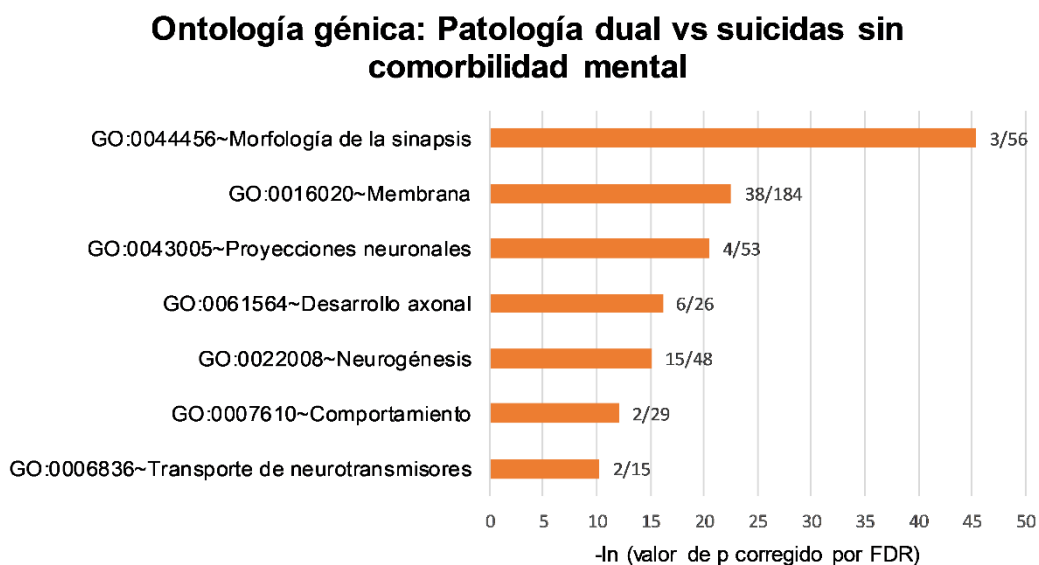
Abreviaturas: Fold-change (FC); False Discovery Rate (FDR)

El mapa de calor de los genes diferencialmente expresados de esta comparación mostró una clara separación de los grupos, como se muestra en la Figura 30.



**Figura 30. Mapa de calor de los genes expresados diferencialmente entre suicidas con patología dual y suicidas sin comorbilidad mental.** Los genes expresados diferencialmente se muestran en columnas y las muestras en filas. Los niveles de expresión génica se representan en el espectro rojo-verde para genes sub y sobreexpresados, respectivamente.

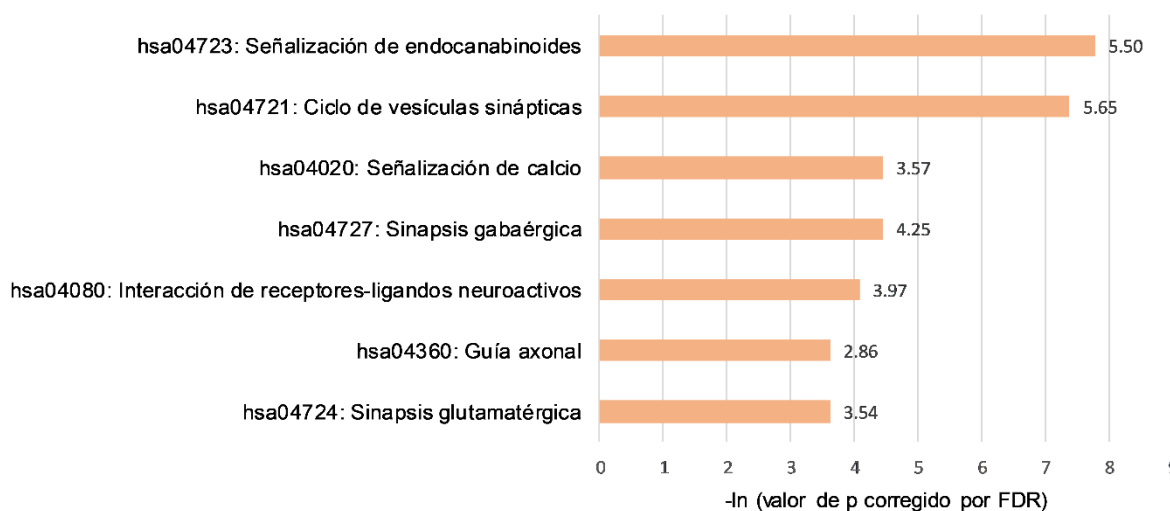
Los resultados del análisis de ontología génica de los genes diferencialmente expresados de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas sin comorbilidad mental se muestran en la Figura 31.



**Figura 31. Términos de ontología génica relacionados con genes expresados diferencialmente de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas sin comorbilidad mental.** Al final de cada barra se indica el número de genes sobre-expresados/ sub-expresados relacionado a cada término, respectivamente.

Las vías biológicas relacionadas con los genes diferencialmente expresados de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas sin comorbilidad mental se muestran en la Figura 32.

## Vías biológicas: Patología dual vs suicidas sin comorbilidad mental



**Figura 32.** Vías biológicas relacionadas con los genes expresados diferencialmente de la comparación entre suicidas con patología dual y suicidas sin comorbilidad mental. El puntaje de enriquecimiento asociado con cada vía se muestra al final de cada barra.

### *Interacción entre TUS y trastornos del ánimo*

La interacción TUS x trastornos del ánimo influyó sobre la expresión de 133 genes. El análisis de ontología génica de estos genes mostró enriquecimiento en el término “vesículas” (GO: 0031982, 58 genes). Los genes relacionados con este término se encontraron enriquecidos específicamente con la exocitosis (13 genes), endosomas (10 genes), vesículas sinápticas (11 genes) y vesículas extracelulares (36 genes).

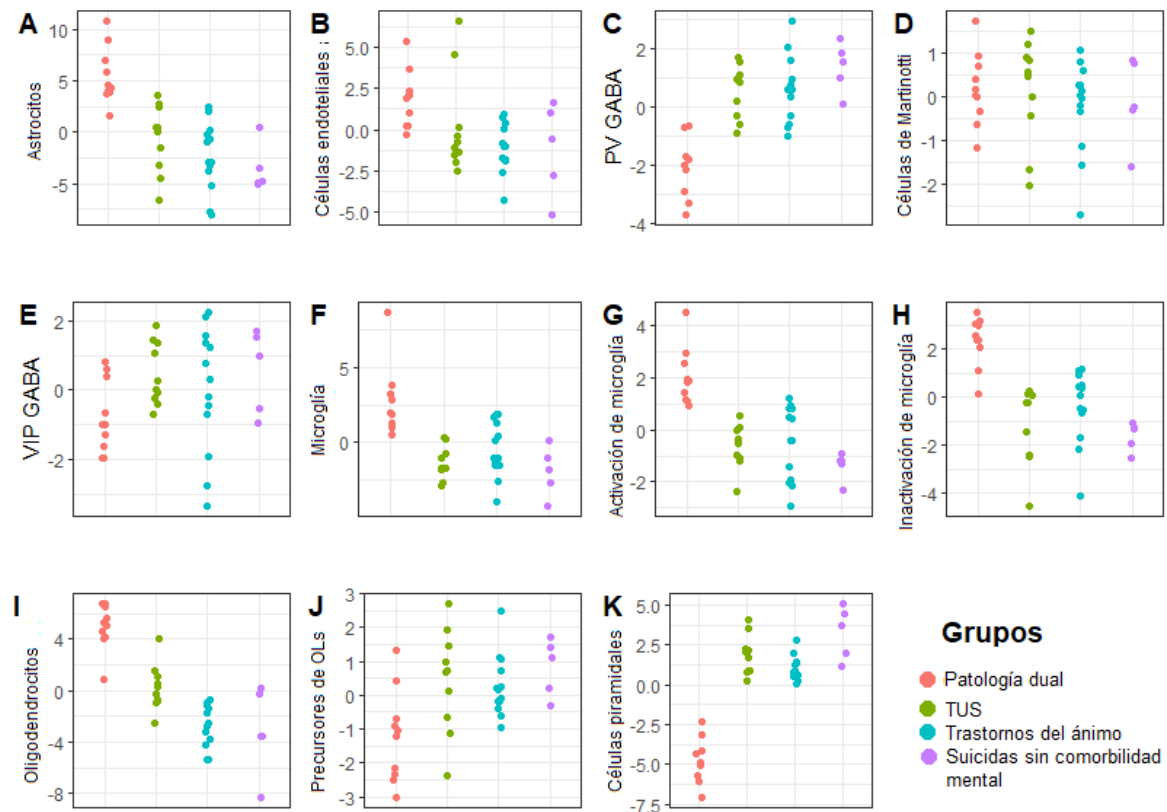
Otros términos que mostraron enriquecimiento fueron: “sinapsis” (GO: 0045202, 31 genes), “neurogénesis” (GO: 0022008, 26 genes), “unión celular” (GO: 0030054, 21 genes) y “formación de vainas de mielina” (GO: 0043209, 13 genes). El análisis de vías biológicas de estos genes indicó asociación con el ciclo de vesículas sinápticas (hsa04721, 6 genes: *ATP6V1A*, *ATP6V1G2*, *SNAP25*, *STX1A*, *VAMP2*, *SYT1*) y la ruta de señalización de calcio (hsa04020, 7 genes: *ADCY1*, *SLC25A4*, *ITPKB*, *PPP3CB*, *PRKCB*, *VDAC3*, *CAMK2B*).

### *Enriquecimiento de marcadores específicos de tipo celular*

El enriquecimiento de marcadores específicos de tipo celular indicó niveles de expresión más altos de marcadores para células gliales tales como astrocitos, microglía y oligodendrocitos en suicidas con patología dual en comparación con suicidas con TUS, suicidas con trastornos del estado del ánimo y suicidas sin trastornos mentales.



Por el contrario, se observó una disminución en la expresión de marcadores específicos de las neuronas piramidales y neuronas GABAérgicas positivas a parvalbúmina (PV) en suicidas con patología dual en comparación con los otros grupos. Los resultados completos del enriquecimiento de marcadores específicos de tipo celular se muestran en la Figura 33.



**Figura 33.** Distribución de marcadores específicos de tipo celular entre los grupos. Los gráficos muestran la distribución de marcadores específicos para los siguientes tipos de células: A) astrocitos, B) células endoteliales, C) interneuronas GABAérgicas positivas a parvalbúmina, D) células de Martinotti, E) neuronas GABAérgicas positivas a péptido intestinal vasoactivo, F) Microglía, G) Activación de la microglía, H) Inactivación de la microglía I) Oligodendrocitos, J) Precursores de oligodendrocitos, K) Neuronas piramidales.

La significancia estadística de las diferencias de los marcadores específicos de tipo celular para cada comparación se muestra en la Tabla 27.

**Tabla 27.** Diferencias en la expresión de marcadores específicos de tipo celular en la corteza prefrontal dorsolateral de suicidas

Marcador de tipo celular	Patología dual vs. TUS	Patología dual vs. trastornos del ánimo	Patología dual vs. suicidas sin comorbilidad mental
Astrocitos	*	*	*
Células endoteliales	*	*	*
Neuronas gabaérgicas PV+	**	*	*
Células de Martinotti			

Neuronas gabaérgicas VIP+			
Microglía	*	*	*
Activación de la microglía	**	*	**
Inactivación de la microglía	*	*	*
Oligodendrocitos	*	*	*
Precusores de oligodendrocitos		**	
Neuronas piramidales	**	*	**

Abreviaturas: Trastorno por uso de sustancias (TUS); neuronas Positivas a parvalbúmina (PV+); neuronas Positivas a péptido intestinal vasoactivo (VIP+)

El número de genes influenciados por la heterogeneidad de tipo celular se estimó mediante la inclusión de los resultados del enriquecimiento de marcadores específicos de tipo celular en el modelo lineal utilizado para el análisis de expresión diferencial entre los grupos. En esta nueva estimación del modelo, encontramos que las diferencias en la expresión de marcadores específicos de la activación de la microglía, la inactivación de la microglía y las células de Martinotti influyeron en la expresión de cinco, doce y un gen, respectivamente, con un valor de p corregido por  $FDR < 0.1$ , como se muestra en la Tabla 28.

**Tabla 28. Genes cuya expresión está influenciada por marcadores específicos de tipo celular en la corteza prefrontal dorsolateral de suicidas**

Marcador de tipo celular	Entrez ID	Símbolo del gen	Valor de p corregido por $FDR$
Activación de la microglía	51191	<i>HERC5</i>	0.06930055
	10561	<i>IFI44</i>	0.02326712
	115361	<i>GBP4</i>	0.02326712
	4939	<i>OAS2</i>	0.06930055
Células de Martinotti	1	<i>A1BG</i>	0.08878915
Inactivación de la microglía	9140	<i>ATG12</i>	0.09802112
	23670	<i>TMEM2</i>	0.09802112
	139411	<i>PTCHD1</i>	0.09802112
	3983	<i>ABLIM1</i>	0.09802112
	6711	<i>SPTBN1</i>	0.09802112
	201266	<i>SLC39A11</i>	0.09802112
	116843	<i>SLC18B1</i>	0.09802112
	51191	<i>HERC5</i>	0.09802112
	29106	<i>SCG3</i>	0.09802112
	115361	<i>GBP4</i>	0.09202061
	4939	<i>OAS2</i>	0.09802112
4281	<i>MID1</i>	0.09802112	

Abreviaturas: *False Discovery Rate (FDR)*.

Dado que el punto de corte para el valor de p corregido por  $FDR$  seleccionado para el presente estudio fue 0.001, los tipos celulares mencionados no se consideraron como covariables en este análisis.

### ***Discusión: Expresión génica en individuos con patología dual que murieron por suicidio***

Los factores neurobiológicos subyacentes a la patología dual han sido poco explorados (Balhara, Kuppili y Gupta, 2017). Este es el primer estudio a nivel del transcriptoma que compara los perfiles de expresión génica en el tejido cerebral humano de individuos con patología dual y de individuos con TUS y trastornos del ánimo.

La caracterización de rasgos moleculares en individuos con patología dual permitirá el diseño de medidas preventivas y terapéuticas orientadas al tratamiento adecuado de esta entidad. Actualmente, el tratamiento está dirigido principalmente a uno de los trastornos de esta comorbilidad (Schiffer et al., 2010), lo que resulta en resultados clínicos subóptimos.

#### *Patología dual vs. TUS*

La expresión diferencial de genes relacionados con la señalización sináptica sugiere una función sináptica comprometida a múltiples niveles, como en el ensamble del citoesqueleto, receptores de neurotransmisores y el tráfico de vesículas. Este hallazgo indica una posible alteración en la transmisión sináptica, que pudiera conducir a un deterioro de la función cognitiva (Berchtold et al., 2013). Dado que los individuos de ambos grupos presentaron TUS, es poco probable que las diferencias observadas en el patrón de expresión génica puedan atribuirse al solo efecto del uso de sustancias.

En esta comparación, identificamos la sobreexpresión de *GFAP* en individuos con patología dual con respecto a los individuos con TUS. Este hallazgo aporta evidencia al posible papel de las células gliales, en particular los astrocitos, en la patología dual como se ha propuesto anteriormente (Miguel-Hidalgo et al., 2002). La sobreexpresión de *GFAP* sugiere una posible activación de astrocitos en individuos con patología dual con respecto a los individuos con TUS. Esta posible activación de astrocitos pudiera ser parte de un proceso de neuroinflamación, que se ha propuesto como un mecanismo subyacente a los trastornos del ánimo (cuya presencia que fue la diferencia en esta comparación) (Lurie, 2018).

Además, el enriquecimiento de marcadores específicos de tipo celular sugirió una mayor expresión de genes específicos de células gliales, incluidos los astrocitos, en suicidas con patología dual en comparación con suicidas con un solo trastorno y suicidas sin trastornos mentales. La sobreexpresión de los genes implicados en la regulación negativa de la apoptosis observada en esta comparación pudiera ser

consecuencia de la liberación de factores neurotróficos por los astrocitos activados (Brahmachari, Fung y Pahan, 2006).

En contraste con nuestros resultados, un modelo animal de patología dual exhibió una subexpresión de *GFAP* en la corteza prefrontal en respuesta a la exposición a la cocaína (Chambers et al., 2013). Sin embargo, esta discrepancia puede deberse a la evaluación del efecto de diferentes sustancias. En ese modelo animal, los autores evaluaron el transcriptoma de ratas con sensibilización a la cocaína (Chambers et al., 2013); mientras que en el presente estudio la sustancia más utilizada por los individuos fue el alcohol. A pesar de la inconsistencia en la dirección del cambio de *GFAP* entre ambos estudios, la expresión mixta de este gen en dos fenotipos de patología dual diferentes sugiere que este gen pudiera tener un papel relevante en la patogénesis de la patología dual. La participación de *GFAP* en otros trastornos concurrentes debe evaluarse en futuros estudios (Chambers et al., 2013).

Los genes *HMG20B*, *PCDH7*, *YES1* (sobreexpresados en humanos y ratas con patología dual en ambos estudios) y *NXT2* (subreexpresado en humanos y ratas con patología dual en ambos estudios) se detectaron como diferencialmente expresados en el estudio de Chambers y colaboradores y el nuestro. Sin embargo, en el estudio del modelo murino, los cambios en la expresión génica de estos genes fueron detectados en el caudado, el putamen y el núcleo accumbens de las ratas y no en la corteza prefrontal, que fue el área evaluada en nuestro estudio. Sería necesario examinar los patrones de expresión génica en individuos con patología dual en las mismas regiones cerebrales donde se realizó el estudio de Chambers y sus colaboradores (2013) para poder realizar una adecuada comparación de los cambios de expresión génica en cada región cerebral en el modelo murino y en humanos.

Sin embargo, es interesante que los mencionados cambios de expresión génica en humanos no se hayan encontrado en la corteza prefrontal de las ratas. Lo cual podría deberse a la diferencia en las sustancias evaluadas en cada estudio, como se discutió en párrafos anteriores, o a una poca concordancia en los niveles de expresión entre humanos y ratas en patología dual. Definitivamente, más estudios en seres humanos y modelos animales para patología dual son necesarios para poder esclarecer estas discrepancias.

#### *Patología dual vs. trastornos del ánimo*

Además de los cambios en la expresión génica en vías biológicas similares a la comparación previa, como la señalización sináptica, detectamos una expresión diferencial de los genes implicados en la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica entre suicidas con patología dual y suicidas con trastornos del ánimo. La sobreexpresión del gen que codifica para el transportador de glutamato *SLC1A3* en suicidas con patología dual con respecto a suicidas con trastornos del ánimo es interesante, ya que se ha reportado la sub-expresión de este gen en pacientes con

trastornos del ánimo (Sequeira et al., 2009; Choudary et al., 2005). Este hallazgo podría ser una diferencia fundamental entre los pacientes con patología dual y los pacientes con trastornos del ánimo y podría ser parte de las causas del mal pronóstico asociado a los pacientes con patología dual en comparación con los individuos con trastornos del ánimo.

#### *Patología dual vs. suicidas sin comorbilidad mental*

Detectamos la subexpresión de genes involucrados en la neurogénesis, así como la regulación positiva de los reguladores negativos de dicha vía en suicidas con patología dual en comparación con suicidas sin ninguna comorbilidad mental. Este hallazgo sugiere una disminución de la neurogénesis en individuos con patología dual en comparación con individuos sin comorbilidad mental. Las posibles implicaciones de este resultado son poco claras, ya que la función de la neurogénesis cortical en adultos, como lo son los individuos de nuestra muestra no ha sido elucidada hasta el momento (Ohira, 2018).

Se ha prestado especial atención a la posible disminución de la neurogénesis en el hipocampo de individuos con patología dual (Chambers, 2013). Además, debido a la interacción entre el hipocampo y la corteza prefrontal, es razonable suponer que la neurogénesis anormal podría afectar a ambas regiones del cerebro, así como a otras áreas que participan en el circuito cortico-hipocampal. La subexpresión de genes implicados en la axogénesis y la neurotransmisión podría ser una consecuencia de la disminución de la neurogénesis.

#### *Interacción entre TUS y trastornos del ánimo*

Entre los genes cuya expresión se vio influenciada por la interacción entre TUS y trastornos del ánimo, fue evidente la gran cantidad de genes relacionados con la función vesicular, particularmente con vesículas extracelulares y exocitosis. Las vesículas participan de manera importante en la modulación de la comunicación célula-célula en el sistema nervioso central (Pegtel et al., 2014; Fries y Quevedo, 2018; Fries et al., 2019) y su relación con trastornos mentales, recientemente se ha explorado en DM y TB (Ilgin & Topuzoğlu, 2018; Fries y Quevedo, 2018; Fries et al., 2019). Además de su ya mencionada participación en la comunicación intercelular, las vesículas participan en la mielinización, plasticidad sináptica, presentación de antígenos y como soporte trófico a las neuronas (Shi et al., 2019; Budnik et al., 2016; Coleman y Hill, 2015; Thompson et al., 2016). Por lo tanto, la evaluación del posible papel de los genes involucrados en la función vesicular en la patología dual y su asociación con el suicidio es de suma importancia para futuros estudios.

Además, nuestros resultados sugieren que la interacción entre TUS y trastornos del ánimo podría alterar la expresión de genes que participan en la neurogénesis. La expresión alterada de los genes de neurogénesis podría ser parte de los mecanismos

subyacentes a las diferencias en los marcadores específicos de tipo celular encontradas en los sujetos con patología dual con respecto a los otros grupos.

El enriquecimiento de marcadores de tipo celular sugirió diferencias previamente discutidas en la expresión de marcadores específicos de tipo celular para varios tipos de células entre los grupos. Una interpretación para estas diferencias encontrados son posibles cambios en la abundancia relativa del tipo de célula correspondiente (Mancarci et al., 2017).

Por lo tanto, los cambios observados en la expresión génica entre los grupos pueden ser debido a diferencias de composición de tipo celular, en lugar de diferencias transcripcionales (Tsoucas et al., 2019). En estudios en los que se ha utilizado tejido cerebral de ratones (McKenzie et al., 2018) y pacientes humanos con trastornos psiquiátricos, se ha sugerido que los cambios en la expresión génica pudieran atribuirse a alteraciones en la abundancia celular relativa (Toker et al., 2018; Ramaker et al., 2017). Aunque en este re-análisis hicimos una estimación de los genes cuya expresión estuvo influida por diferencias en los marcadores específicos de tipo celular y no fue significativa en el punto de corte utilizado en este estudio, no podemos descartar la influencia de este efecto en nuestros resultados. Para determinar las variaciones en la expresión génica de acuerdo con el subtipo celular podrían realizarse estudios utilizando técnicas como RNA-seq de una sola célula y/o clasificar los tipos celulares presentes en el tejido cerebral que es heterogéneo previo a la evaluación de la expresión génica por medio de tinciones, marcajes específicos para cada tipo celular. Otra alternativa para seleccionar ciertos tipos celulares y evaluar su perfil de expresión génica es la microdissección con rayo láser (Tagliafierro et al., 2016).

## **Limitaciones, conclusiones y perspectivas**

Cabe señalar que los estudios que integran la presente tesis son los primeros estudios de expresión génica en cerebro de suicidas en una población latinoamericana. El suicidio es un fenómeno en el que interactúan diferentes factores individuales, sociodemográficos y situacionales, y estos factores pueden variar según el lugar y la etnia. Los factores ambientales a los que están expuestos los individuos de la población mexicana pueden conducir a cambios epigenéticos que pudieran ser diferentes a los encontrados en otras poblaciones, y esto podría conducir a influencias únicas en la expresión génica.

El presente estudio tiene algunas limitaciones, como el tamaño relativamente pequeño de la muestra, especialmente en los grupos de sujetos no suicidas. Sería deseable aumentar el número de la muestra e incluir más sujetos con abuso de sustancias distintas al alcohol, con el fin de explorar el efecto de estas sustancias en la interacción con el suicidio. Otra limitación es la falta de análisis en otras regiones

del cerebro potencialmente relevantes para el suicidio y TUS. Estudios futuros deberán centrarse en los cambios epigenéticos y genotípicos que podrían causar las alteraciones del transcriptoma observadas en este estudio.

Una limitación metodológica inherente a las plataformas de microarreglos es la restricción del análisis a las sondas elegidas por el fabricante. Esta limitación metodológica puede superarse mediante el uso de la secuenciación de RNA en futuros estudios. Además, algunas limitaciones son intrínsecas a los estudios *post mortem*, como el método de diagnóstico basado solo en los registros médico-legales y que no contempló la gravedad de los trastornos, el uso de medicamentos, entre otros factores que pudieran influir en los resultados obtenidos.

Nuestro estudio sugiere que los suicidas con TUS presentan alteraciones en la expresión génica que son diferentes de las de suicidas sin esta comorbilidad, y los no suicidas con TUS. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la interacción del suicidio con TUS conduce a un perfil de expresión único en la corteza prefrontal. Nuestros resultados también sugieren una alteración en la expresión de genes implicados en la diferenciación glial y la neurotransmisión glutamatérgica en suicidas con TUS.

El re-análisis de los datos enfocado a patología dual, tiene limitaciones adicionales, como el tamaño de muestra aún más reducido y la restricción del análisis a individuos que murieron por suicidio. Por lo tanto, son necesarios estudios futuros que incluyan suicidas y no suicidas para dilucidar los mecanismos subyacentes involucrados en la asociación entre patología dual y otras causas de mortalidad, además del suicidio.

El presente análisis se realizó en tejido cerebral heterogéneo, es decir que incluía distintos tipos celulares, lo cual no permitió una descripción precisa de los patrones de expresión génica específicos de cada tipo celular. El uso de métodos especializados, como la secuenciación de RNA de células individuales y la micro-disección, permitirá la identificación de patrones relevantes de expresión génica de tipo celular en estudios posteriores.

Estudios en otras poblaciones y en muestras más grandes son necesarios para corroborar los resultados obtenidos en los estudios que integran la presente tesis. La caracterización a nivel molecular de los individuos con TUS y patología dual en el contexto del suicidio permitirá un mejor entendimiento de la asociación de ambos trastornos con el suicidio y el diseño de medidas adecuadas de tratamiento específico para estas comorbilidades.

## Brain Gene Expression Pattern of Subjects with Completed Suicide and Comorbid Substance Use Disorder

Molecular  
Neuropsychiatry

Original Paper

Mol Neuropsychiatry 2019;5:60–73  
DOI: 10.1159/000493940

Received: May 4, 2018  
Accepted: September 20, 2018  
Published online: November 12, 2018

# Brain Gene Expression Pattern of Subjects with Completed Suicide and Comorbid Substance Use Disorder

Brenda Cabrera<sup>a,b</sup> Nancy Monroy-Jaramillo<sup>c</sup> Gabriel Rodrigo Fries<sup>d</sup>  
Roberto Cuauhtemoc Mendoza-Morales<sup>e</sup> Fernando García-Dolores<sup>e</sup>  
Alejandra Mendoza-Larios<sup>e</sup> Carlos Diaz-Otañez<sup>e</sup>  
Consuelo Walss-Bass<sup>d</sup> David Colin Glahn<sup>f,9</sup> Patricia Ostrosky-Wegman<sup>h</sup>  
Cristobal Fresno<sup>l</sup> Humberto Nicolini<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico; <sup>b</sup>PECEM, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>c</sup>Department of Genetics, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico; <sup>d</sup>Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA; <sup>e</sup>Institute of Forensic Sciences (INCIFO), Mexico City, Mexico; <sup>f</sup>Department of Psychiatry, Yale School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA; <sup>9</sup>Olin Neuropsychiatric Research Center, Institute of Living, Hartford, CT, USA; <sup>h</sup>Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>i</sup>Computational Genomics Department, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico

### Keywords

Postmortem · Dorsolateral prefrontal cortex · Expression study · Microarray · Transcriptomics · Substance use disorder

### Abstract

**Background/Aim:** Although individuals with substance use disorder (SUD) are at high risk of committing suicide, most studies of postmortem gene expression exclude subjects with SUD due to the potential confounding effect of drugs in the transcriptome. Thus, little is known about the gene expression profile in suicides with SUD. The identification of altered biological processes in suicides with SUD is crucial in the comprehension of the interaction between both pathologies. **Methods:** We evaluated the gene expression profile in

the dorsolateral prefrontal area of suicides and nonsuicides with and without SUD by microarrays. **Results:** We identified 222 differentially expressed genes, predominately enriched in cell proliferation in the comparison between suicides with and without SUD. When comparing the transcriptome of suicides with SUD to nonsuicides with SUD, we identified 550 differentially expressed genes, mainly enriched in oxidative phosphorylation. Differentially expressed genes (1,417) between suicides and nonsuicides without SUD were detected. Most of them were related to mitochondrial function. **Conclusion:** Interaction between suicide and SUD seems to influence the expression of genes involved in glial proliferation and glutamatergic neurotransmission. These results highlight, for the first time, that suicides with SUD have a gene expression profile distinct from that of subjects with only one of these disorders.

© 2018 S. Karger AG, Basel

KARGER

© 2018 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/mnp

Humberto Nicolini  
National Institute of Genomic Medicine  
Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory  
Periférico Sur 4809, Tlalpan, Arenal Tepepan, Mexico City 14610 (Mexico)  
E-Mail hnicolini@inmegen.gob.mx



## Introduction

According to the World Health Organization's latest report, more than 800,000 people committed suicide in 2015, making it the 17th most frequent cause of death worldwide [1]. Suicide rates have been increasing in many countries, including Mexico, where they increased from 3.5 to 5.2 suicides per 100,000 inhabitants between 2000 and 2014 [2]. A first step in decreasing the suicide rate is to identify the factors associated with this behavior. There has been an association between suicidal behavior and certain sociocultural, situational, and individual factors, such as access to health services, interpersonal conflicts, divorce, unemployment, isolation, lack of social support, previous suicide attempt, and presence of mental disorders [1, 3].

Several postmortem studies using a psychological autopsy have confirmed the association between suicide and the presence of mental disorders. The well-known review of Fleischmann et al. [4] reported that 88.6% of the suicide victims suffered from a mental disorder, where mood disorders were the most frequent diagnosis (42.1%), followed very closely by substance use disorder (SUD) [4]. Similar rates of mental illnesses among individuals who successfully committed suicide have been recently reported [5, 6].

It is estimated that, compared to the general population, subjects with alcohol abuse are almost ten times more likely to commit suicide, whereas people with abuse of other substances are approximately fourteen times more likely to commit this act [7]. Dependence on several substances such as alcohol, inhalants, heroin [8], and tobacco [9] have also been associated with suicidal behavior. Although subjects with SUD are at an increased risk for suicidal behavior, most postmortem suicide gene expression studies have excluded this group of patients [10]. Therefore, little is known about the molecular basis of the association between SUD and suicidal behavior. A recent study by Gandal et al. [11] (2018) evaluated the transcriptome of five mental disorders; autism, schizophrenia, bipolar disorder, major depression, and alcohol use disorder (AUD), where they observed a lack of overlap between the AUD and the other mental disorders. This result suggests that a different gene expression profile exists in suicides with SUD compared to subjects with other mental pathologies.

The prefrontal cortex is the brain region responsible for decision making, inhibition and short-term memory, functions known to be altered in subjects with suicidal behavior [12, 13]. Structural and functional changes in

the prefrontal cortex, specifically the dorsolateral prefrontal cortex, as well as alterations in cognitive abilities associated with the prefrontal region, have been identified in subjects with suicidal behavior and in subjects with SUD [14]. Therefore, it is of particular interest to evaluate gene expression in this brain region in suicidal subjects with and without SUD, in order to have a better understanding of the interaction between suicide and SUD. The identified genes could be used as potential biomarkers of suicidal behavior in subjects with SUD and ultimately for the implementation of novel treatments for this population. In this preliminary study, we compared the gene expression profile in the dorsolateral prefrontal area of subjects who committed suicide with and without SUD to the transcriptome of subjects with and without SUD who died due to a cause other than suicide.

## Materials and Methods

### *Subjects and Brain Samples*

Postmortem brain samples were obtained from the Institute of Forensic Sciences (INCIFO) in Mexico City, Mexico, from subjects who committed suicide and subjects with sudden death in 2016 in Mexico City. Suicide completers are defined as those individuals whose causes of death were self-inflicted injuries, which correspond to X60–X84 codes of the International Classification of Diseases, 10th Revision (ICD-10). The nonsuicidal subjects presented sudden, not self-inflicted death (for example, a car accident) without a period of prolonged agonal state or prolonged illness. The Ethics Committee for Human Research at the National Institute of Genomic Medicine approved this research.

Fresh brain tissue samples from the dorsolateral prefrontal cortex (Brodmann area 9) were dissected using the middle frontal gyrus and the precentral sulcus anatomical references and stored in RNAlater, an RNA stabilization reagent (Qiagen, Singapore) at  $-80^{\circ}\text{C}$  until its use. The postmortem interval (PMI) represents the time interval between the estimated time of death and the sample collection, which ranged from 06:50 to 29:30 h. A toxicology test for detecting substance consumption at the time of death was performed in both peripheral blood and brain tissue.

Subjects were psychiatrically characterized by a diagnostic estimation based on data obtained through from the legal medical records, which contain (i) declarations from the police, relatives, and witnesses, (ii) demographic information, (iii) acute and chronic stressful life situations, (iv) autopsy and toxicological reports, and (v) clinical records in case the individual received medical attention. A consensus diagnosis, based on the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5) criteria, was achieved between a pathologist, a psychologist, and a psychiatrist, and then reviewed and confirmed by an independent experienced psychiatrist. The complete methods for diagnostic estimation are described elsewhere [15].

Sixty-six samples were collected, considering the following experimental groups: 23 suicide completers with comorbid SUD (Suicidal SUD+ group), 20 suicide completers without SUD (Sui-

**Table 1.** Demographic, clinical, and suicide subjects' characteristics

SUD	Suicides		Nonsuicides		p value
	+	-	+	-	
Subjects	23	20	9	14	
Age, years	31.95±17.43	32.8±15.19	30.88±7.04	31.78±19.51	0.645
Gender (M:F)	21:2	12:8	8:1	8:6	0.028
PMI, h	14.91±3.91	15.03±4.81	17.76±7.07	16.84±4.44	0.128
AUD	17	0	8	0	
Positive result in toxicology test	16	3	4	0	
Cause of death <sup>a</sup>	19/0/2/1/1/0/0	16/1/1/1/1/0/0	1/2/0/3/2/1/0	4/4/0/2/0/1/4	

Values indicate number of subjects unless otherwise indicated. Continuous data is presented as mean ± standard deviation. +, positive; -, negative; SUD, substance use disorders; M, male; F, female; PMI, postmortem interval; AUD, alcohol use disorder. <sup>a</sup> Asphyxia/gunshot/intoxication/trauma/puncture wound/traffic accident/shock. Two-tailed *p* value test is described in Methods.

cidal SUD- group), 9 subjects with SUD whose cause of death was not suicide (Nonsuicidal SUD+ group), and 14 nonsuicide subjects without SUD (Nonsuicidal SUD- group); the latter two groups were named as nonsuicides for the purposes of this study. Demographic, clinical, and suicide subjects' characteristics are described in Table 1. Categorical variables between experimental groups, such as gender, were assessed by Fisher's exact test, and continuous variables, for instance age and PMI, using analysis of the variance (ANOVA) tests. The interactive comparison between the experimental groups is illustrated in Figure 1.

#### RNA Isolation

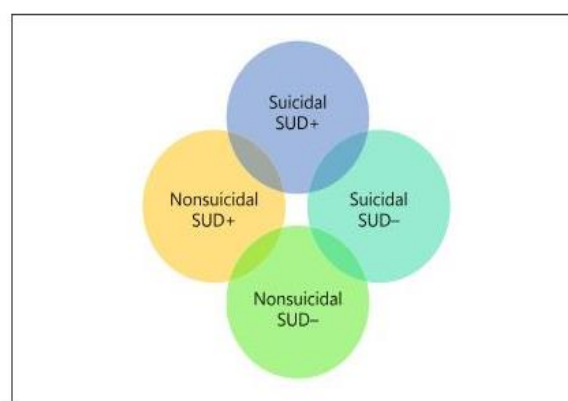
RNA isolation was performed using the RNeasy kit from Qiagen<sup>TM</sup> following the manufacturer's instructions. The purity of the extracted RNA was evaluated on the NanoDrop1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and its integrity by electrophoresis with 1% agarose gel. Subsequently, the RNA integrity number of the samples was evaluated using the Agilent Bioanalyzer. Only samples with an RNA integrity number >7 were further processed.

#### Microarray Detection

The gene expression of the 66 samples was analyzed using the Illumina HumanHT-12 v4 BeadChip microarray, which contains 47,231 probes. RNA samples were labeled into biotinylated cRNAs with the TargetAmp<sup>TM</sup>-Nano Labeling Kit (Epicentre), followed by hybridization into the BeadChips according to the manufacturer's protocol. The BeadChips were scanned on an iScan Microarray Scanner (Illumina) immediately after the protocol.

#### Microarray Analysis

For data pre-processing the 47,231 probes contained in the microarray were annotated so that each one was assigned their respective EntrezID and gene symbol with the Bioconductor "IlluminaHumanv4.db" package [16]. Then, raw probe intensities were background corrected with the "normexp" method with "mle" maximum likelihood approximation in the "limma" package [17-19]. Subsequently, control, ERCC, and unannotated probes (without a valid EntrezID number) were filtered out. Low detection probes, namely those with a detection *p* value >0.05 and those not

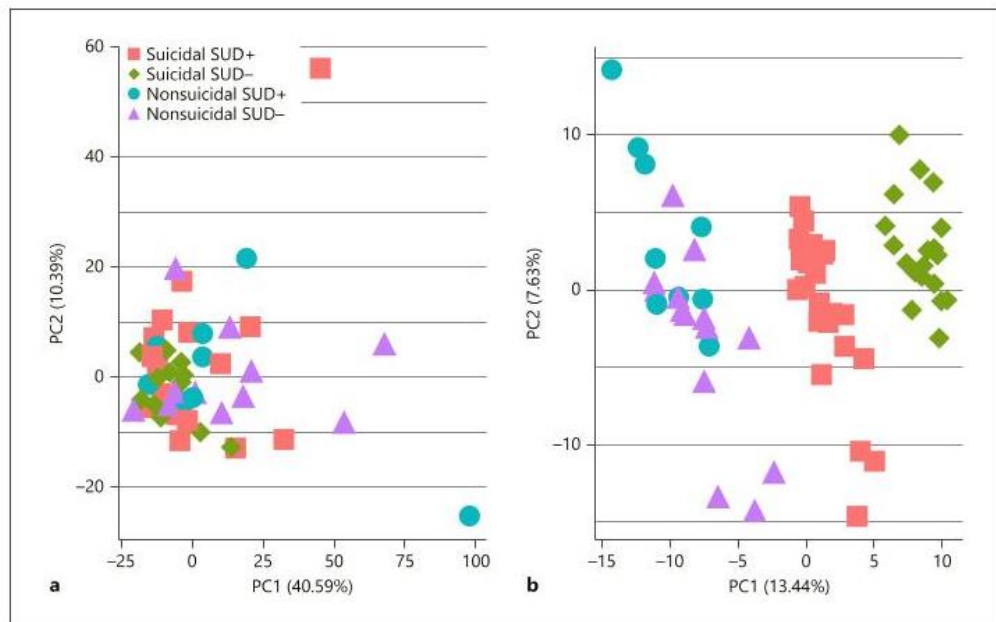


**Fig. 1.** Venn diagrams for the interactive comparison between experimental groups. In this study, the gene expression profile of Brodmann area 9 of suicides with substance use disorder (Suicidal SUD+) and nonsuicides without SUD (Nonsuicidal SUD) were compared to suicides without SUD (Suicidal SUD-) and nonsuicides with SUD (Nonsuicidal SUD+). The complete lists of differentially expressed genes in these comparisons are shown in the online supplementary material.

present in at least 50% of arrays in each experimental group, were removed.

Gene expression values were normalized to compensate for systematic technical differences between the arrays by the quantile method and  $\log_2$ -transformed [20]. Replicate probes within the arrays were summarized and replaced with their average value. To visualize the data and evaluate possible batch effects, we performed a principal component analysis where we could detect a batch effect associated with an unknown source of variation. A multivariate analysis with the ARSyN package was executed to remove such an effect [21].

The resulting data comprises a  $2 \times 2$  factorial experimental design. The first factor is whether the individual committed suicide



**Fig. 2.** Principal component analysis (PCA) scatter plot of the studied subjects. **a** Using quantile-normalized gene expression levels. **b** After multi-dimensional normalization using ARSyN. It is worth noting that in **a** the experimental groups are confounded due to an excess of uncontrolled variability (batch effect). This effect was corrected in **b**, where the first two principal components (PC1 and PC2) demonstrated a clear separation of these groups. Experimental groups: suicide (Suicidal), nonsuicide (Nonsuicidal), with or without substance use disorder (SUD+/SUD-).

or not. The second factor is the absence or presence of SUD. The data was analyzed using a gene by gene independent linear model using the Bioconductor “limma” package [17, 18] according to equation (1):

$$y_{ijk} = \mu + \alpha I_{Suicide_i} + \beta \gamma I_{Substance_j} + \gamma I_{Suicide_i} \times I_{Substance_j} + \epsilon_{ijk} \quad (1)$$

where,  $y_{ijk}$  is the  $\log_2$  gene expression level for the  $i$ -th suicide level, under the  $j$ -th SUD level, in the  $k$ -th biological replicate;  $\mu$  is the global average gene expression;  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  are the suicide and SUD coefficients, respectively;  $I_{Suicide_i}$  and  $I_{Substance_j}$  are the indicator dummy functions (0 or 1), for  $i$ -th suicide and  $j$ -th SUD levels, respectively;  $\epsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$  is the random error which is normally distributed with zero expected value and variance equal to  $\sigma^2$  for the  $i$ -th suicide,  $j$ -th substance, and  $k$ -th biological replicate respective levels.

Principal effect and corresponding double interaction assessments were carried out using Type-III sum of squares. Biological marginal hypothesis tests between specific experimental groups were performed using a two-tailed F test using the complete estimated linear model parameters.  $p$  values associated with the differentially expressed genes were corrected for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg false discovery rate method [22]. For the purposes of this study, the significant level was set to 0.001. Visualization of the results from each comparison was car-

ried out by means of heatmaps using “gplot” [23]. The data preprocessing and processing were executed in R [24].

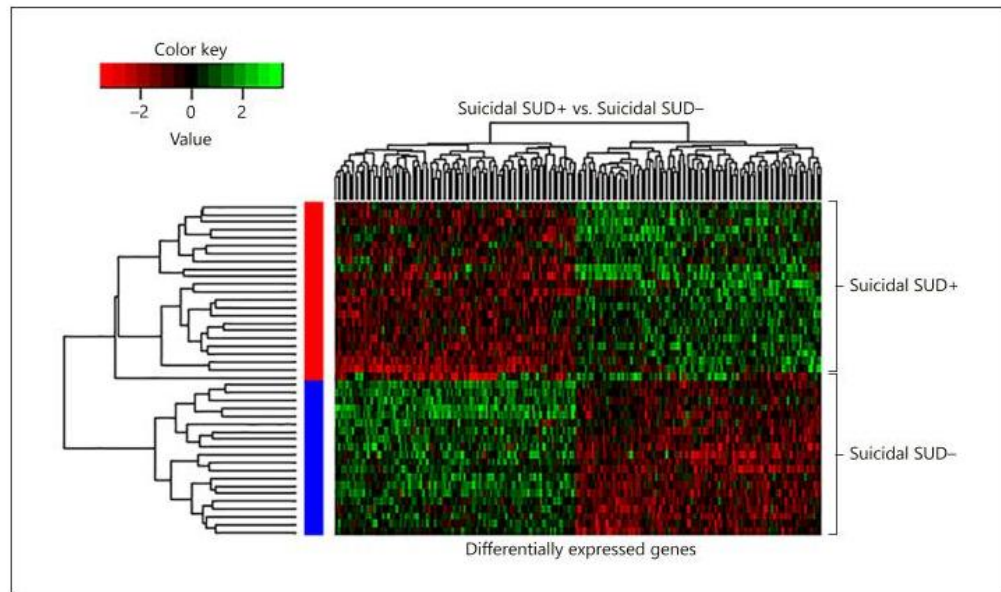
#### Functional Annotation Analysis

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), version 6.8, was used for over-representation analysis [25, 26]. The annotation categories were restricted to use: Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG), Gene Ontology (GO), and Reactome. The up- and downregulated genes were analyzed separately in DAVID, since this approach is more powerful for finding significant functional pathways documented in the databases [27]. Only the resulting 6,862 transcripts were used as background reference. Biological pathways with a modified Fisher exact  $p$  value  $< 0.05$  (EASE score) were considered enriched [28]. In addition, Ingenuity® Pathway Analysis software (IPA®; QIAGEN Redwood City) was used to complement the analysis [29].

## Results

### Subjects and Brain Samples

According to the demographic, clinical, and suicide subjects’ characteristics presented in Table 1, no signifi-



**Fig. 3.** Substance use comparison heatmap for suicide subjects. The 222 differentially expressed genes (in columns) between suicide subjects with substance use disorder (Suicidal SUD+) and suicide subjects without SUD (Suicidal SUD-), with red and blue color, respectively (in rows). Gene expression levels are depicted in red-green spectrum for down-/upregulated genes.

cant differences were observed between the experimental groups in terms of age ( $p$  value = 0.645) and PMI ( $p$  value = 0.128). However, there was an association between gender and experimental group ( $p$  value = 0.028). In this context, more men than women successfully committed suicide across all the groups. This fact is consistent with previous reports in the Mexican population, where it is known that the majority of those who commit suicide or suffer from SUD belong to the male gender [2].

In the suicide with SUD group, 73.91% (20/23) of the subjects had AUD, whereas in the nonsuicidal group with SUD, 88.88% (8/9) of the subjects had AUD. From the subjects who obtained a positive result in the toxicology test from the suicide with SUD group, 87.5% were positive for alcohol only and 12.5% were positive for alcohol and cocaine. Subjects from the other groups were only positive for alcohol.

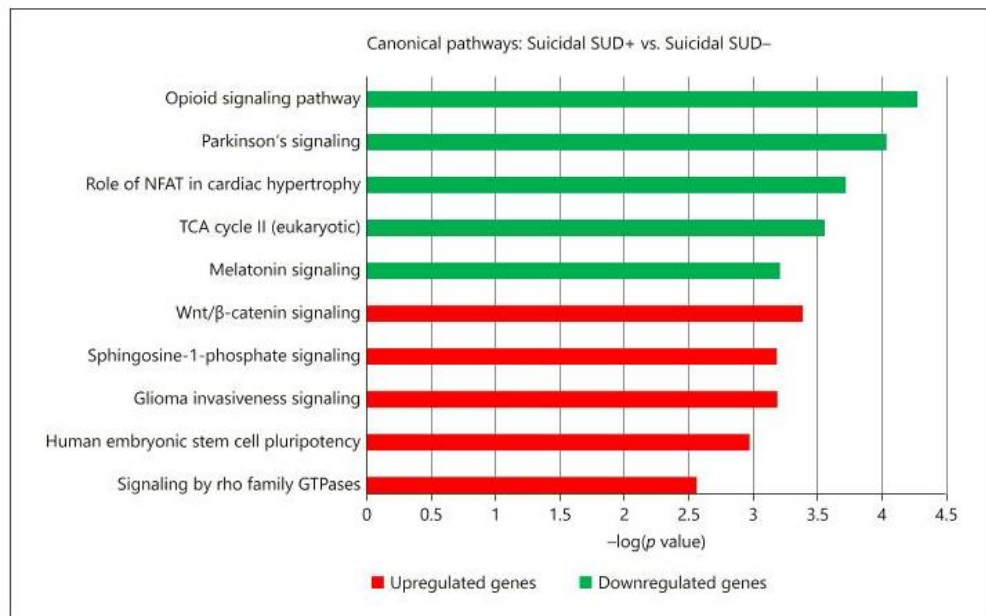
The quantile-normalized gene expression levels were inspected for batch effects using principal component analysis (PCA) over the subjects (Fig. 2a). Together, the first two components (PC1 and PC2) represented 50.98% of the total variability. Unfortunately, the experimental groups were mixed together whereas one would have ex-

pected that they clustered. However, after applying AR-SyN (Fig. 2b), a noteworthy separation along the PC1 axis formed three clusters: (i) Suicidal SUD- subjects, (ii) Suicidal SUD+ subjects, and (iii) nonsuicides (Nonsuicidal SUD+ and Nonsuicidal SUD-), using only 13.44% of the total gene expression variance.

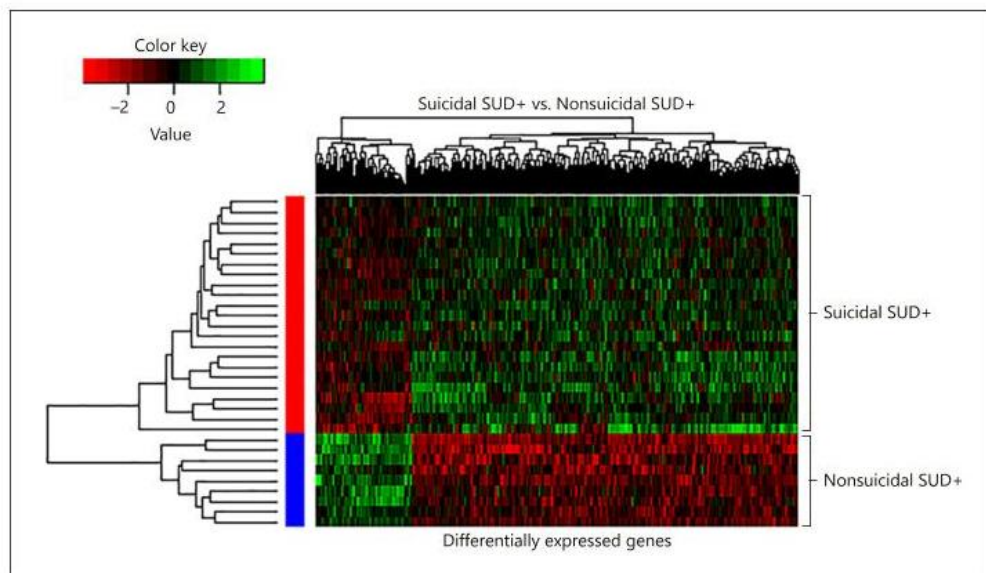
#### *Suicidal SUD+ versus Suicidal SUD-*

In the comparison between subjects who committed suicide and had SUD ( $n = 23$ ) and subjects who committed suicide without SUD ( $n = 20$ ), 222 differentially expressed genes were detected, yielding 112/110 genes up-/downregulated, respectively. Visual inspection over the corresponding heatmap showed that the two experimental groups clustered together (Fig. 3). The complete list of differentially expressed genes in this comparison is shown in the online supplementary material (for all online suppl. material, see [www.karger.com/doi/10.1159/000493940](http://www.karger.com/doi/10.1159/000493940)).

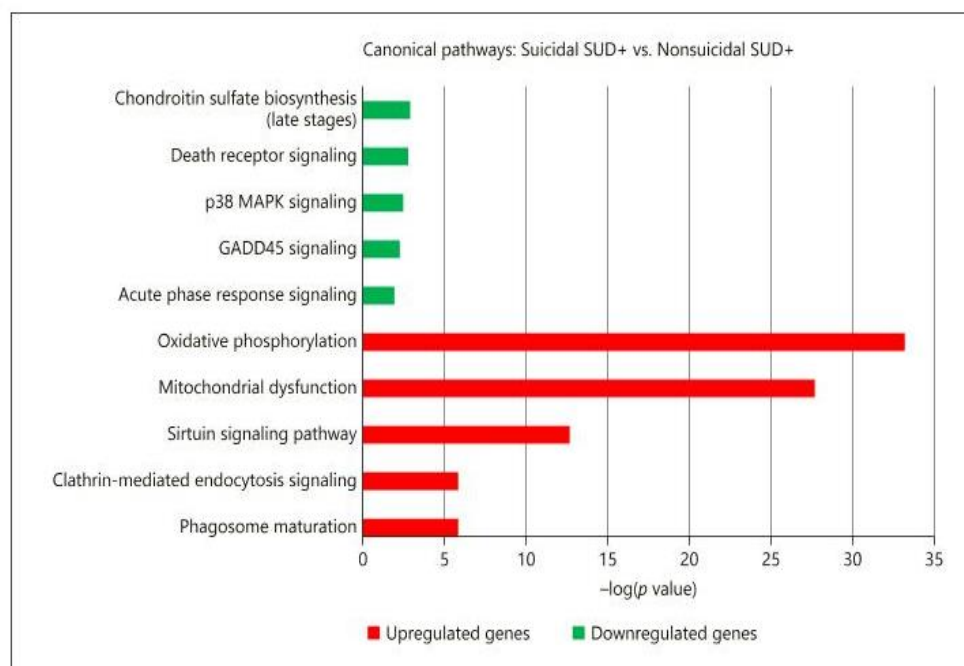
The functional analysis results of the downregulated genes showed that GO terms were significantly enriched in cation transport, neuron part, signaling, synapse, immune response receptors, behavior, learning or memory, and cellular respiration. The upregulated genes showed



**Fig. 4.** Top 5 enriched canonical pathways from IPA. Canonical pathways related to upregulated genes (red bars) and downregulated genes (green bars) detected when comparing suicides with substance use disorder (Suicidal SUD+) to suicides without SUD (Suicidal SUD-).



**Fig. 5.** Suicide comparison heatmap for subjects with substance use disorder (SUD). The 550 differentially expressed genes (in columns) between suicides with SUD (Suicidal SUD+) and nonsuicidal subjects with SUD (Nonsuicidal SUD+), with red and blue color, respectively (in rows). Gene expression levels are depicted in red-green spectrum for down-/upregulated genes.



**Fig. 6.** Top 5 enriched canonical pathways from IPA. Canonical pathways related to upregulated genes (red bars) and downregulated genes (green bars) detected when comparing suicides with substance use disorder (Suicidal SUD+) to nonsuicides with SUD (Nonsuicidal SUD+).

enrichment for GO terms related to epithelium development, cell adhesion, regulation of nervous system development, regulation of gene expression, and phosphatidylinositol-mediated signaling. The complete list of related GO terms is available in online supplementary Table 1.

The joint functional analysis, including both up- and downregulated genes, indicated that the genes identified as differentially expressed genes between suicidal with SUD (Suicidal SUD+) and suicidal without SUD (Suicidal SUD-) groups were associated with cell differentiation, cell death, cell adhesion, and neurogenesis. Since cell differentiation was the GO term associated with the highest percentage of genes, we further investigated terms related to this GO category in this comparison and found “neuron and glial cell differentiation” with a significant  $p$  value. The complete list of related GO terms resulting from this joint analysis is available in online supplementary Table 2.

Moreover, the top five canonical pathways identified by IPA ranked by their  $p$  value related to the up- and downregulated genes are illustrated in Figure 4. The top ten canonical pathways derived from the analysis of all

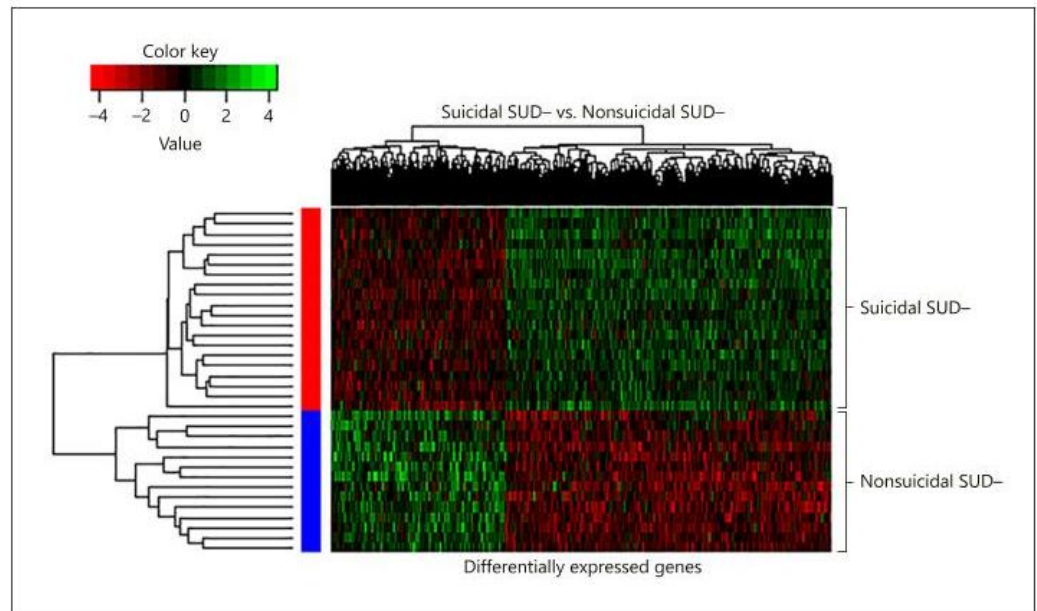
differentially expressed genes is available in online supplementary Figure S1.

#### *Suicidal SUD+ versus Nonsuicidal SUD+*

The gene expression profile for suicides with SUD ( $n = 23$ ) with respect to suicides without SUD ( $n = 9$ ) showed 550 differentially expressed genes, of which 438 were upregulated and 112 downregulated. Visual inspection over the corresponding heatmap showed that the two experimental groups clustered together (Fig. 5). The complete list of differentially expressed genes in this comparison is in the online supplementary material.

In this comparison, the downregulated genes showed enriched GO terms related to signal peptides, receptor, zinc finger proteins, and metabolic processes. The upregulated genes were associated with the mitochondrial membrane, antigen processing and presentation, and cytoskeleton. The complete list of GO terms is available in online supplementary Table 3.

When analyzing the complete list of differentially expressed genes between suicidal individuals with SUD and nonsuicidal individuals with SUD, we found that they were associated with immune response, oxidative phosphoryla-



**Fig. 7.** Suicide comparison heatmap for subjects without substance use disorder (SUD). The 1,417 differentially expressed genes (in columns) between suicides without SUD (Suicidal SUD-) and nonsuicidal subjects without SUD (Nonsuicidal SUD-), with red and blue color, respectively (in rows). Gene expression levels are depicted in red-green spectrum for down-/upregulated genes.

tion, Parkinson's disease, and mitotic cell cycle phase transition. The complete list of GO terms obtained from this joint analysis is available in online supplementary Table 4.

The top five canonical pathways identified by IPA ranked by *p* value related to differentially expressed genes are illustrated in Figure 6. The top ten canonical pathways resulting from the joint analysis of differentially expressed genes identified in this comparison are available in online supplementary Figure S2.

#### *Suicidal SUD- versus Nonsuicidal SUD-*

In the comparison between suicides without SUD ( $n = 20$ ) and nonsuicides without SUD ( $n = 14$ ), 1,417 differentially expressed genes were detected, yielding 923/494 genes up-/downregulated, respectively. The corresponding heatmap showed that the two experimental groups clustered together (Fig. 7). The complete list of differentially expressed genes identified in this comparison is available in the online supplementary material.

In this comparison, the downregulated genes exhibited enriched GO terms associated with cell communication, regulation of gene expression, neurogenesis, and programmed cell death. Regarding the last term, it is

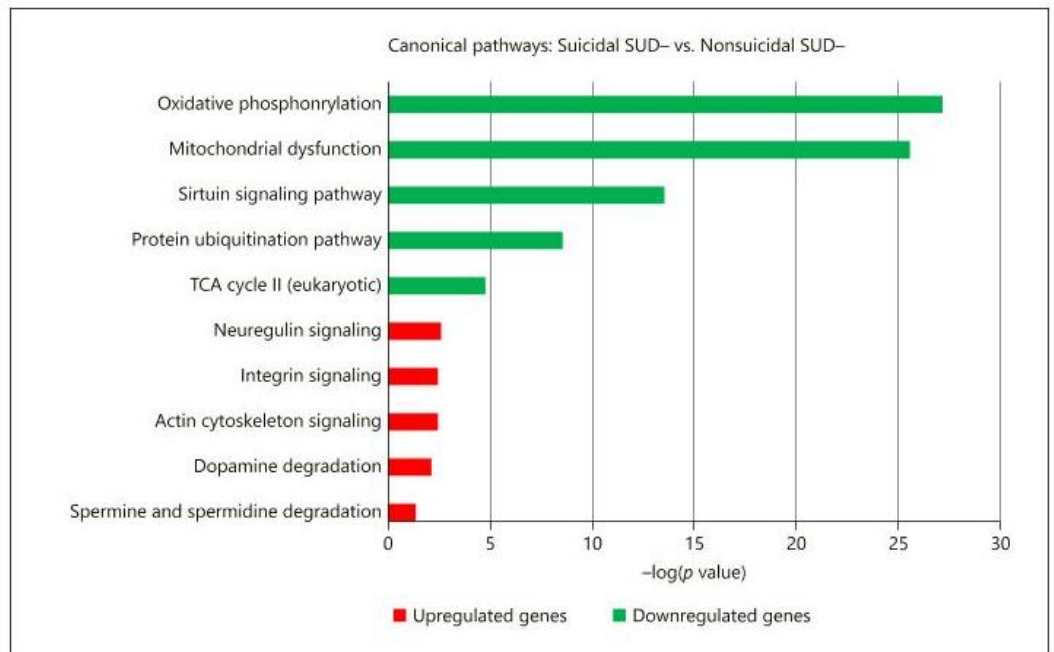
noteworthy that it includes genes of both positive and negative regulation of this process. The upregulated genes were related to mitochondria, programmed cell death, ion transport, and neuron projection. The complete list of GO terms from this analysis is available in online supplementary Table 5.

In the joint functional analysis, with both up- and downregulated genes, we observed that most of the genes identified as differentially expressed genes between suicidal without SUD and nonsuicidal without SUD groups were enriched in GO terms related to mitochondrion, regulation of cell communication, programmed cell death, and neuron differentiation (online suppl. Table 6).

The top five canonical pathways identified by IPA ranked by *p* value related to differentially expressed genes are illustrated in Figure 8. The top ten canonical pathways resulting from the analysis of all differentially expressed genes identified in this comparison is available in online supplementary Figure S3.

#### *Nonsuicidal SUD+ versus Nonsuicidal SUD-*

When comparing nonsuicides with SUD to nonsuicides without SUD, we identified only one gene to be



**Fig. 8.** Top 5 enriched canonical pathways from IPA. Canonical pathways related to upregulated genes (red bars) and downregulated genes (green bars) detected when comparing suicides with substance use disorder (Suicidal SUD-) to nonsuicides with SUD (Nonsuicidal SUD-).

downregulated, *LOC285074*, which encodes for the anaphase promoting complex subunit 1 pseudogene.

#### *Interaction between Suicide and SUD*

The interaction term (suicide by SUD) exhibited influence in the expression of 55 genes; 26 of these genes were downregulated and 29 were upregulated. The functional enriched GO terms related to these genes are shown in Table 2. Results of IPA for such genes are available in online supplementary Figure S4.

#### **Discussion**

To the best of our knowledge, this is the first transcriptome-level study comparing gene expression profiles in the dorsolateral prefrontal cortex of suicides with SUD and suicides without this disorder, as SUD has been considered in most studies as a confounder and hence excluded from the analysis. Two studies identified multiple probesets whose expression was influenced by alcohol or cocaine use in the ventral prefrontal cortex [30], limbic system, and posterior cingulate gyrus [31] in suicides

with major depression of French-Canadian origin. One of these studies [32] included drug or alcohol use in their statistical models, without finding an association between substance abuse and the expression of differentially expressed genes in Brodmann area 46. The other examined the effects of alcohol on genes identified as differentially expressed in a larger French-Canadian sample and in a murine model of acute and chronic alcohol use, discarding the fact that the pattern of gene expression observed in the study was due to the use of substances [33]. Most of the studies have either excluded subjects based on toxicology reports, which only provide information about the use of certain drugs at the moment of death, or ignored the issue altogether [10].

#### *Suicidal SUD+ versus Suicidal SUD-*

When comparing suicides with SUD to suicides without SUD, an evident overexpression of genes participating in pathways involved in the regulation of cellular proliferation and migration, such as Rho family GTPases, glioma invasiveness signaling, and SP1 signaling, known for its determinant role in cell survival and proliferation, was identified [34, 35]. Parkinson's signaling is one of the



**Table 2.** GO functional terms associated with the genes participating in the interaction between SUD and suicide

GO ID	GO name	n (%)	EASE*	Upregulated genes	Downregulated genes
GO:0016740	Transferase activity	14 (25.92)	0.037	<i>CDK19, PACSIN3, PTARI, RASSF2, YES1, PTPN11</i>	<i>HSP90AA1, MAP2K4, POLR3A, SMS, UHMK1, ISCU, KLHL28, GTF2H3</i>
GO:0016301	Kinase activity	9 (16.66)	0.007	<i>CDK19, HSP90AA1, PACSIN3, RASSF2, GTF2H3, YES1, UHMK1, PTPN11</i>	<i>MAP2K4</i>
GO:0010001	Glial cell differentiation	5 (9.25)	0.005	<i>SOX10, OLIG1, NDRG1, CNP, PTPN11</i>	
GO:0006950	Response to stress	18 (33.33)	0.027	<i>CDK19, HMGB1, HSP90AA1, SNX6, AP2S1, GTF2H3, COPS8, CNOT7, PTPN11, LSM14A, PCBP4, RASSF2, NDRG1, YES1,</i>	<i>UCHL1, MAP2K4, POLR3A, AACS</i>
GO:0002682	Regulation of immune system process	9 (16.66)	0.016	<i>LSM14A, HMGB1, HSP90AA1, SNX6, AP2S1, RASSF2, YES1, PTPN11</i>	<i>MAP2K4</i>

GO, Gene Ontology; SUD, substance use disorder. \* Modified Fisher exact *p* value.

enriched pathways for the downregulated genes in this comparison, which include the pro-apoptotic genes *CYCC*, *UCHL1*, and *SNCA* [36]. Of note, the abnormal expression of genes involved in cell proliferation and its regulation, such as *MAPK*, suggests that suicides with SUD may have an increased cell proliferation, which could lead to structural abnormalities in the prefrontal cortex of suicides with SUD and lead to an impaired function of this brain area.

This probable increased cell proliferation, if corroborated by other studies, could lead to a higher cell density which would be different from the decreased neuronal and glial density in the prefrontal cortex reported for subjects with AUD in suicides [37–39]. Lower neuronal density has been reported in Brodmann area 9 [40]; however, the glial density has only been evaluated in the white matter of this brain area, where abnormal density of microglia was found in subjects who committed suicide [41].

Among the genes identified as differentially expressed between suicides with SUD and suicides without SUD are *SLC1A2*, *SLC1A3*, and *GLUD1*, which encode for proteins involved in glutamate metabolism. The first two genes are transporters of this neurotransmitter; *GLUD 1*, glutamate dehydrogenase, catalyzes the oxidative deamination of glutamate. The alteration of glutamatergic neurotransmission in subjects with suicidal behavior is well documented; however, an interesting finding from our

study is the overexpression of these genes in suicide subjects with SUD, contrary to previous postmortem studies of suicide with depression [42] and bipolar disorder [43] in the same brain area. This overexpression could be due to the chronic exposure to ethanol in most of the suicide subjects with SUD in our sample, as alterations in glutamatergic neurotransmission have been reported in subjects with alcohol dependence [44] and in animal models of alcoholism [45]. Our finding suggests that suicide with SUD present alterations in glutamatergic neurotransmission, and these abnormalities are different from those found in suicide without this comorbidity.

Another interesting finding is the overexpression of genes that encode for connexins 30 and 43 in suicide with SUD. Reduced expression of these genes has been reported in suicide cases [33] in addition to a reduced expression of its protein in subjects with alcohol dependence [46]. The finding that the expression of genes involved in glutamatergic neurotransmission and genes for connexins 30 and 43 are in the opposite direction to that previously reported in suicide with other psychiatric pathologies indicates that the presence of SUD leads to unique changes in gene expression in suicide subjects. If replicated in other populations, and corroborated by functional analysis, these findings could have important therapeutic implications, leading to treatment strategies focused on specific alterations in patients with SUD who could be at risk of committing suicide.

#### *Suicidal SUD+ versus Nonsuicidal SUD+*

An overexpression of genes involved in oxidative phosphorylation and mitochondrial function was detected in suicides with SUD compared to nonsuicide subjects with SUD, which may indicate an increased energy demand with a potential impact on synaptic and neuronal function. Since mitochondrially formed oxidants activate several signaling pathways related to apoptosis [47], this GO term was associated with the differentially expressed genes identified in this comparison, as expected.

In addition, mitochondrial function is crucial in neural migration, an especially relevant process, given the nature of the tissue studied [48–50]. Other canonical pathways associated with the differentially expressed genes from this comparison are the clathrin-mediated endocytosis [51] and chondroitin sulfate synthesis [52], which are also implicated in neural migration. This suggests a dysregulation in this function in suicides with SUD, perhaps as part of a synaptic refinement process [53].

#### *Suicidal SUD- versus Nonsuicidal SUD-*

As in the previous comparison, we detected an overexpression of genes involved in mitochondrial function. This observation is interesting, since both comparisons are between suicidal and nonsuicidal subjects in the presence of SUD and in the absence of this disorder, respectively. This suggests that the increased expression of mitochondrial genes could be relevant in the pathophysiology of suicide independently of the comorbidity with SUD.

Pantazatos et al. [54] reported an increased expression of genes involved in “DNA-dependent ATPase activity” in suicides compared to nonsuicides ( $p < 0.1$  corrected). Therefore, we anticipate that future studies focusing on the mitochondrial function of subjects with suicidal behavior may help to clarify the role of this process in suicide.

#### *Nonsuicidal SUD+ versus Nonsuicidal SUD-*

When we compared the gene expression profile of nonsuicides with SUD to nonsuicides without SUD we detected the downregulation of *LOC285074*, which encodes for a pseudogene. Our criteria for considering a transcript as differentially expressed between groups was probably especially strict in order to detect more differences in this comparison. In the future, with the knowledge generated from other studies, we may be able to confirm if this pseudogene is relevant in the SUD pathology in nonsuicidal subjects.

Of note, results obtained from studies in neurodegenerative diseases suggest that pseudogenes and other non-

coding transcripts could participate in the regulation of gene expression through competition for miRNA-occupied sites [55].

#### *Interaction between Suicide and SUD*

In addition to finding an overexpression of genes involved in cell proliferation in the comparison between suicides with SUD and suicides without this comorbidity, genes involved in this process were detected among the probes influenced by the interaction between SUD and completed suicide, including *CNOT*, *ATP6VOC*, *MARCKSL1*, *NDRG1*, and *RAN*, suggesting that this process may be relevant in the interaction of both disorders. The overexpression of genes that participate in the differentiation of glial cells, such as *SOX10*, *OLIG1*, *NDRG1*, *CNP*, and *PTPN11*, may be potentially relevant in suicide with SUD. Suicide subjects with alcohol dependence have been shown to present higher glial density in the anterior cingulate cortex compared with suicide subjects without dependence [56].

Although we did not evaluate gene expression in this specific brain area, these results indicate that substances, such as alcohol, in interaction with completed suicide may influence glial density. A possible mechanism that could contribute to the increase in the expression of genes related to glial proliferation is the combination of immunomodulatory effects and factors related to stress, which would lead to higher glial density [56]. This also coincides with the GO categories of other genes that participate in the interaction of both disorders, such as the response to stress and the regulation of immune system processes.

It has been suggested that the interaction between depression and SUD could lead to glial dysfunction and a consequent alteration in glutamatergic neurotransmission [57, 58], so the pharmacological modulation of this circuit may play a key role in the treatment of SUD in comorbidity with other mental disorders. Ketamine, a glutamate-modulating agent, has been shown to reduce suicide in high-risk populations [58–60], so the inclusion of this medication in the treatment of subjects with SUD with suicidal tendencies is an option that would be worth exploring.

It should be noted that this is the first study to carry out a transcriptome analysis of suicide in a Latino population. Suicide is a phenomenon where different individual, sociodemographic, and situational factors interact, and these factors can vary according to place and ethnicity. The environmental factors to which subjects in the Mexican population are exposed may lead to epigenetic changes that are different from those of other popula-

tions, and this could lead to unique influences on gene expression.

The present study has some limitations, such as the relatively small sample size, especially in the nonsuicidal groups; it would be desirable to increase the sample number and include more subjects with abuse to substances other than alcohol, so we could explore the effect of these substances in interaction with suicide. Another limitation is the lack of analysis in other brain regions potentially relevant for suicide and SUD. Future studies should focus on epigenetic changes and/or genotype changes that might be underlying the transcriptome alterations observed in this study, as well as the inclusion of other potential confounding clinical characteristics not examined in this study (for instance, medications and co-occurring drug dependence not detected by our methods).

### Conclusion

Our study suggests that suicide with SUD presents alterations in gene expression that are different from those of suicide without this comorbidity and nonsuicide subjects with SUD. Therefore, our results suggest that the interaction of suicide with SUD leads to a unique expression profile. Our results also suggest an alteration in the expression of genes implicated in glial differentiation and glutamatergic neurotransmission in suicides with SUD.

### Acknowledgments

We thank Dr. Simon Wallace for his appreciable help in the language editing and proofreading of this paper.

### References

- 1 World Health Organization. Preventing suicide: a global imperative. 2015 [accessed 2018 Mar 18]. Available from: [http://www.who.int/mental\\_health/suicide-prevention/world\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/world_report_2014/en/).
- 2 Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas a propósito del día mundial para la prevención del suicidio. 2017. Available from: [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/suicidios2017\\_Nal.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/suicidios2017_Nal.pdf).
- 3 Haw C, Hawton K, Niedzwiedz C, Platt S. Suicide clusters: a review of risk factors and mechanisms. *Suicide Life Threat Behav*. 2013 Feb;43(1):97–108.
- 4 Fleischmann A, Bertolote JM, Belfer M, Beautrais A. Completed suicide and psychiatric diagnoses in young people: a critical examination of the evidence. *Am J Orthopsychiatry*. 2005 Oct;75(4):676–83.
- 5 Cho SE, Na KS, Cho SJ, Im JS, Kang SG. Geographical and temporal variations in the prevalence of mental disorders in suicide: systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2016 Jan;190:704–13.
- 6 Turecki G, Brent DA. Suicide and suicidal behaviour. *Lancet*. 2016 Mar;387(10024):1227–39.
- 7 Wilcox HC, Conner KR, Caine ED. Association of alcohol and drug use disorders and completed suicide: an empirical review of cohort studies. *Drug Alcohol Depend*. 2004 Dec;76 Suppl:S11–9.
- 8 Borges G, Walters EE, Kessler RC. Associations of substance use, abuse, and dependence with subsequent suicidal behavior. *Am J Epidemiol*. 2000 Apr;151(8):781–9.
- 9 Miller M, Borges G, Orozco R, Mukamal K, Rimm EB, Benjet C, et al. Exposure to alcohol, drugs and tobacco and the risk of subsequent suicidality: findings from the Mexican Adolescent Mental Health Survey. *Drug Alcohol Depend*. 2011 Jan;113(2-3):110–7.

### Statement of Ethics

The Ethics Committee for Human Research at the National Institute of Genomic Medicine approved this research (CEI 2016/33).

### Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Funding Sources

This work was funded by a grant from the National Council for Science and Technology (CONACyT: #233695)

### Author Contributions

B.C. participated in the conception of the work, sample processing, analysis and interpretation of the data. She also wrote the present paper; this work is part of her PhD program. N.M.-J. and G.R.F. participated in the design of the work, sample processing, acquisition of the data (microarrays), and results interpretation. In addition, they revised the present manuscript, providing essential ideas, and approved its final version. R.C.M.-M., F.G.-D., A.M.-L., and C.D.-O. participated in the sample acquisition and revised the present paper, providing relevant content. C.F. contributed to the data analysis, results interpretation, and writing of the present paper. C.W.-B., D.C.G., H.N., and P.O.-W. contributed to the conception and design of the work, and interpretation of the data. They participated actively in the writing of the present paper and provided key ideas for results interpretation. All the authors revised and approved the final version of the manuscript. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy and integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

- 10 Fiori LM, Turecki G. Gene expression profiling of suicide completers. *Eur Psychiatry*. 2010 Jun;25(5):287–90.
- 11 Gandal MJ, Haney JR, Parikshak NN, Leppa V, Ramaswami G, Hartl C, et al.; Common-Mind Consortium; PsychENCODE Consortium; iPSYCH-BROAD Working Group. Shared molecular neuropathology across major psychiatric disorders parallels polygenic overlap. *Science*. 2018 Feb;359(6376):693–7.
- 12 Raust A, Slama F, Mathieu F, Roy I, Chenu A, Koncke D, et al. Prefrontal cortex dysfunction in patients with suicidal behavior. *Psychol Med*. 2007 Mar;37(3):411–9.
- 13 Richard-Devantoy S, Berlim MT, Jollant F. A meta-analysis of neuropsychological markers of vulnerability to suicidal behavior in mood disorders. *Psychol Med*. 2014 Jun;44(8):1663–73.
- 14 Goldstein RZ, Volkow ND. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Oct;12(11):652–69.
- 15 Romero-Pimentel AL, et al. Socio-demographic and clinical characteristics of completed suicides in Mexico City 2014–2015. *Front Psychiatry*. 2018 Sep 7;9:402.
- 16 Dunning M, Lynch A, Eldridge M. illumina-Humanv4.db: Illumina HumanHT12v4 annotation data (chip illuminaHumanv4). 2015. R package version 1.26.0.
- 17 Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr;43(7):e47.
- 18 Phipson B, Lee S, Majewski IJ, Alexander WS, Smyth GK. Robust hyperparameter estimation protects against hypervariable genes and improves power to detect differential expression. *Ann Appl Stat*. 2016 Jun;10(2):946–63.
- 19 Silver JD, Ritchie ME, Smyth GK. Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*. 2009 Apr;10(2):352–63.
- 20 Smyth GK, Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods*. 2003 Dec;31(4):265–73.
- 21 Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A. ARSYn: a method for the identification and removal of systematic noise in multifactorial time course microarray experiments. *Biostatistics*. 2012 Jul;13(3):553–66.
- 22 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1995;57:289–300.
- 23 Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Liaw A, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M, Venables B: R package gplots. 2014. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/gplots.pdf>.
- 24 R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Available from: <https://www.r-project.org/>.
- 25 Huang W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44–57.
- 26 Huang W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(1):1–13.
- 27 Hong G, Zhang W, Li H, Shen X, Guo Z. Separate enrichment analysis of pathways for up- and downregulated genes. *J R Soc Interface*. 2013 Dec;11(92):20130950.
- 28 Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol*. 2003;4(10):R70.
- 29 Krämer A, Green J, Pollard J Jr, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*. 2014 Feb;30(4):523–30.
- 30 Klempan TA, Sequeira A, Canetti L, Lalovic A, Ernst C, ffrench-Mullen J, et al. Altered expression of genes involved in ATP biosynthesis and GABAergic neurotransmission in the ventral prefrontal cortex of suicides with and without major depression. *Mol Psychiatry*. 2009 Feb;14(2):175–89.
- 31 Sequeira A, Klempan T, Canetti L, ffrench-Mullen J, Benkelfat C, Rouleau GA, et al. Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. *Mol Psychiatry*. 2007 Jul;12(7):640–55.
- 32 Kim S, Choi KH, Baykiz AF, Gershenfeld HK. Suicide candidate genes associated with bipolar disorder and schizophrenia: an exploratory gene expression profiling analysis of post-mortem prefrontal cortex. *BMC Genomics*. 2007 Nov;8(1):413.
- 33 Ernst C, Nagy C, Kim S, Yang JP, Deng X, Hellstrom IC, et al. Dysfunction of astrocyte connexins 30 and 43 in dorsal lateral prefrontal cortex of suicide completers. *Biol Psychiatry*. 2011 Aug;70(4):312–9.
- 34 Karnoub AE, Der CJ. Rho Family GTPases and Cellular Transformation. *Madame Curie Bioscience Database* Austin (TX): Landes Bioscience; p. 2000–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6594/>.
- 35 Karunakaran I, van Echten-Deckert G. Sphingosine 1-phosphate - A double edged sword in the brain. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017 Sep;1859(9 Pt B):1573–82.
- 36 Li YX, Yu ZW, Jiang T, Shao LW, Liu Y, Li N, et al. SNCA, a novel biomarker for Group 4 medulloblastomas, can inhibit tumor invasion and induce apoptosis. *Cancer Sci*. 2018 Apr;109(4):1263–75.
- 37 Johansson S, Ekström TJ, Marinova Z, Okvist A, Sheedy D, Garrick T, et al. Dysregulation of cell death machinery in the prefrontal cortex of human alcoholics. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 Feb;12(1):109–15.
- 38 Harper C, Dixon G, Sheedy D, Garrick T. Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Sep;27(6):951–61.
- 39 Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Andrew M, Overholser JC, Jurjus G, Stockmeier CA, et al. Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biol Psychiatry*. 2002 Dec;52(12):1121–33.
- 40 Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Galfalvy H, Mann JJ, Arango V. Neuron Density and Serotonin Receptor Binding in Prefrontal Cortex in Suicide. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012 May;15(4):435–47.
- 41 Schnieder TP, Trencsevska I, Rosoklija G, Stankov A, Mann JJ, Smiley J, et al. Microglia of prefrontal white matter in suicide. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014 Sep;73(9):880–90.
- 42 Sequeira A, Mamdani F, Ernst C, Vawter MP, Bunney WE, Lebel V, et al. Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS One*. 2009 Aug;4(8):e6585.
- 43 Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, Tomita H, Li JZ, Vawter MP, et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Oct;102(43):15653–8.
- 44 Chandler LJ, Newsom H, Sumners C, Crews F. Chronic ethanol exposure potentiates NMDA excitotoxicity in cerebral cortical neurons. *J Neurochem*. 1993 Apr;60(4):1578–81.
- 45 Selim M, Bradberry CW. Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between the Lewis and Fischer 344 rat strains. *Brain Res*. 1996 Apr;716(1-2):157–64.
- 46 Miguel-Hidalgo JJ, Wilson BA, Hussain S, Meshram A, Rajkowska G, Stockmeier CA. Reduced connexin 43 immunolabeling in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and depression. *J Psychiatr Res*. 2014 Aug;55:101–9.
- 47 Beech RD, Lowther L, Leffert JJ, Mason PN, Taylor MM, Umlauf S, et al. Increased peripheral blood expression of electron transport chain genes in bipolar depression. *Bipolar Disord*. 2010 Dec;12(8):813–24.
- 48 Austin CD, Lawrence DA, Peden AA, Varfolomeev EE, Totpal K, De Mazière AM, et al. Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jul;103(27):10283–8.
- 49 Lin-Hendel. Erika G. Differential Requirements For Mitochondria During Neuronal Migration. 2017. Publicly Accessible Penn Dissertations. 2424. Available from: <https://repository.upenn.edu/edissertations/2424>.
- 50 Devaraju P, Zakharenko SS. Mitochondria in complex psychiatric disorders: Lessons from mouse models of 22q11.2 deletion syndrome: Hemizygous deletion of several mitochondrial genes in the 22q11.2 genomic region can lead to symptoms associated with neuropsychiatric disease. *BioEssays*. 2017 Feb;39(2):1600177.

- 51 Shieh JC, Schaar BT, Srinivasan K, Brodsky FM, McConnell SK. Endocytosis regulates cell soma translocation and the distribution of adhesion proteins in migrating neurons. *PLoS One*. 2011 Mar;6(3):e17802.
- 52 Sun Y, Deng Y, Xiao M, Hu L, Li Z, Chen C. Chondroitin sulfate proteoglycans inhibit the migration and differentiation of oligodendrocyte precursor cells and its counteractive interaction with laminin. *Int J Mol Med*. 2017 Dec;40(6):1657–68.
- 53 Uribe E, Wix R. Neuronal migration, apoptosis and bipolar disorder. *Rev Psiquiatr Salud Ment*. 2012 Apr-Jun;5(2):127–33. English, Spanish.
- 54 Pantazatos SP, Huang YY, Rosoklija GB, Dwork AJ, Arango V, Mann JJ. Whole-transcriptome brain expression and exon-usage profiling in major depression and suicide: evidence for altered glial, endothelial and ATPase activity. *Mol Psychiatry*. 2017 May; 22(5):760–73.
- 55 Costa V, Esposito R, Aprile M, Ciccodicola A. Non-coding RNA and pseudogenes in neurodegenerative diseases: “The (un)Usual Suspects”. *Front Genet*. 2012 Oct;3:231.
- 56 Hercher C, Parent M, Flores C, Canetti L, Tu-recki G, Mechawar N. Alcohol dependence-related increase of glial cell density in the anterior cingulate cortex of suicide completers. *J Psychiatry Neurosci*. 2009 Jul;34(4):281–8.
- 57 Niciu MJ, Henter ID, Sanacora G, Zarate CA Jr. Glial abnormalities in substance use disorders and depression: does shared glutamatergic dysfunction contribute to comorbidity? *World J Biol Psychiatry*. 2014 Jan;15(1):2–16.
- 58 Goodwani S, Saternos H, Alasmari F, Sari Y. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Jun;77:14–31.
- 59 Price RB, Nock MK, Charney DS, Mathew SJ. Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry*. 2009 Sep;66(5):522–6.
- 60 DiazGranados N, Ibrahim LA, Brutsche NE, Ameli R, Henter ID, Luckenbaugh DA, et al. Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2010 Dec;71(12):1605–11.

# Brain gene expression profiling of individuals with dual diagnosis who died by suicide



Journal of Dual Diagnosis

research and practice in substance abuse comorbidity



ISSN: 1550-4263 (Print) 1550-4271 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/wjdd20>

## Brain Gene Expression Profiling of Individuals With Dual Diagnosis Who Died by Suicide

Brenda Cabrera-Mendoza, Cristóbal Fresno, Nancy Monroy-Jaramillo, Gabriel Rodrigo Fries, Consuelo Walss-Bass, David C. Glahn, Patricia Ostrosky-Wegman, Alma Delia Genis-Mendoza, José Jaime Martínez-Magaña, Ana Luisa Romero-Pimentel, Carlos Enrique Díaz-Otañez, Fernando García-Dolores, Eli Elier González-Sáenz, Roberto Cuauhtemoc Mendoza-Morales, Gonzalo Flores, Rubén Vázquez-Roque & Humberto Nicolini

To cite this article: Brenda Cabrera-Mendoza, Cristóbal Fresno, Nancy Monroy-Jaramillo, Gabriel Rodrigo Fries, Consuelo Walss-Bass, David C. Glahn, Patricia Ostrosky-Wegman, Alma Delia Genis-Mendoza, José Jaime Martínez-Magaña, Ana Luisa Romero-Pimentel, Carlos Enrique Díaz-Otañez, Fernando García-Dolores, Eli Elier González-Sáenz, Roberto Cuauhtemoc Mendoza-Morales, Gonzalo Flores, Rubén Vázquez-Roque & Humberto Nicolini (2019): Brain Gene Expression Profiling of Individuals With Dual Diagnosis Who Died by Suicide, Journal of Dual Diagnosis, DOI: [10.1080/15504263.2019.1692160](https://doi.org/10.1080/15504263.2019.1692160)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15504263.2019.1692160>



View supplementary material ↗



Published online: 27 Nov 2019.



Submit your article to this journal ↗



View related articles ↗



View Crossmark data ↗

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=wjdd20>



## Brain Gene Expression Profiling of Individuals With Dual Diagnosis Who Died by Suicide

Brenda Cabrera-Mendoza, MD<sup>a,b</sup>, Cristóbal Fresno, PhD<sup>c</sup>, Nancy Monroy-Jaramillo, PhD<sup>d</sup>, Gabriel Rodrigo Fries, PhD<sup>e</sup>, Consuelo Walss-Bass, PhD<sup>e</sup>, David C. Glahn, PhD<sup>f,g</sup>, Patricia Ostrosky-Wegman, PhD<sup>h</sup>, Alma Delia Genis-Mendoza, PhD<sup>a</sup>, José Jaime Martínez-Magaña, MSc<sup>a</sup>, Ana Luisa Romero-Pimentel, MSc<sup>a</sup>, Carlos Enrique Díaz-Otañe, MD<sup>i</sup>, Fernando García-Dolores, MD<sup>j</sup>, Eli Elier González-Sáenz, MD<sup>j</sup>, Roberto Cuauhtemoc Mendoza-Morales, MD<sup>j</sup>, Gonzalo Flores, PhD<sup>k</sup>, Rubén Vázquez-Roque, PhD<sup>k</sup>, and Humberto Nicolini, PhD<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico; <sup>b</sup>PECEM, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>c</sup>Computational Genomics Department, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico; <sup>d</sup>Department of Genetics, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico; <sup>e</sup>Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas, USA; <sup>f</sup>Tommy Fuss Center for Neuropsychiatric Disease Research, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts, USA; <sup>g</sup>Department of Psychiatry, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA; <sup>h</sup>Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>i</sup>Department of Pathology, Institute of Forensic Sciences (INCIFO), Mexico City, Mexico; <sup>j</sup>High Specialty Program in Legal and Forensic Psychiatry, Psychiatric Hospital Fray Bernardino Álvarez, Mexico City, Mexico; <sup>k</sup>Neuropsychiatry Laboratory, Institute of Physiology, Meritorious Autonomous University of Puebla, Puebla, Mexico

### ABSTRACT

**Objective:** Dual diagnosis (DD) is the co-occurrence of at least one substance use disorder and one or more mental disorders in a given individual. Despite this comorbidity being highly prevalent and associated with adverse clinical outcomes, its neurobiology remains unclear. Furthermore, patients with DD are at higher risk for suicidal behavior in comparison with single disorder patients. Our objective was to evaluate brain gene expression patterns in individuals with DD who died by suicide. **Methods:** We compared the gene expression profile in the dorsolateral prefrontal cortex of suicides with DD ( $n = 10$ ) to the transcriptome of suicides with substance use disorder alone ( $n = 10$ ), suicides with mood disorders (MD) alone ( $n = 13$ ), and suicides without mental comorbidities ( $n = 5$ ). Gene expression profiles were assessed by microarrays. In addition, we performed a brain cell type enrichment to evaluate whether the gene expression profiles could reflect differences in cell type compositions among the groups. **Results:** When comparing the transcriptome of suicides with DD to suicides with substance use disorder alone and suicides with MD alone, we identified 255 and 172 differentially expressed genes (DEG), respectively. The overlap of DEG between both comparisons (112 genes) highlighted the presence of common disrupted pathways in substance use disorder and MD. When comparing suicides with DD to suicides without mental comorbidities, we identified 330 DEG, mainly enriched in neurogenesis. Cell type enrichment indicated higher levels of glial markers in suicides with DD compared to the other groups. **Conclusions:** Suicides with DD exhibited a gene expression profile distinct from that of suicides with a single disorder, being substance use disorder or MD, and suicides without mental disorders. Our results suggest alteration in the expression of genes involved in glial specific markers, glutamatergic and GABAergic neurotransmission in suicides with DD compared to suicides with a single disorder and suicides without mental comorbidities. Alterations in the expression of synaptic genes at different levels were found in substance use disorder and MD.



### KEYWORDS

Transcriptome; dual diagnosis; substance use disorder; comorbidity; co-occurring disorders


## Introduction

The co-occurrence of at least one substance use disorder and one or more mental disorders in a given

individual is known as dual diagnosis (DD; Center for Substance Abuse Treatment, 2005). This comorbidity is highly prevalent in the general population

**CONTACT** Humberto Nicolini, PhD  hnicolini@inmegen.gob.mx  Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur 4809, Tlalpan, Arenal Tepepan, Mexico City, 14610, Mexico.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/wjdd](http://www.tandfonline.com/wjdd).

 Supplemental data for this article can be accessed here.

(Carrà et al., 2012; Regier et al., 1990) and even higher in those with substance use disorder under treatment in hospital care units, namely treatment populations (Nubukpo et al., 2016; Weaver et al., 2003).

It has been suggested that DD implies the interaction of both disorders producing a synergistic effect (Kelly & Daley, 2013). Individuals with DD are at a higher risk of presenting adverse clinical outcomes (Ringen et al., 2008) and higher rates of premature death (Volkow, 2009) compared to individuals with a single mental disorder. Furthermore, there is evidence suggesting that common genetic factors influence both disorders, raising the possibility of shared pathology between substance use disorder and affective disorders (Carmioli et al., 2014; Olvera et al., 2011).

Patients with DD are at higher risk for suicidal behavior in contrast with patients with a single mental illness (Abroms & Sher, 2016). Therefore, the evaluation of gene expression patterns in those with DD in a suicidal context is fundamental in the understanding of mechanisms involved in its poor prognosis and high mortality.

Abnormalities in the prefrontal cortex have been implicated in the pathogenesis of mood disorder (MD) and substance use disorder (Goldstein & Volkow, 2011; Nolan et al., 2002). Hence, this brain area could be relevant to study these comorbidities. In this preliminary study, we compared the gene expression profile in the prefrontal area of suicides with DD to the transcriptome of suicides with substance use disorder, suicides with MD, and suicides without mental disorders.

## Methods

Data from 38 individuals who died by suicide were obtained from a previously described sample (Cabrera et al., 2019). The study by Cabrera et al. (2019) focused on the effects of substance use disorder in the gene expression pattern between suicides and nonsuicides. Due to the association between DD and suicidal behavior, the present study was conducted only in persons who died by suicide. In addition, the restriction of the analysis to suicides could minimize sources of heterogeneity that would make it difficult to detect differentially expressed genes (DEG) in a small sample.

Postmortem brain samples were collected at the Institute of Forensic Sciences in Mexico City, Mexico. All subjects were Mexican Mestizos and Mexico City residents. We considered the following groups: (1) 10 suicides with DD (i.e., substance use disorder and MD in the same individual), (2) 10 suicides with substance

use disorder, (3) 13 suicides with MD, and (4) 5 suicides without any mental disorder.

During autopsy, fresh samples from Brodmann area 9 corresponding to dorsolateral prefrontal cortex were sectioned. To locate this area, the middle frontal gyrus and the precentral sulcus were used as anatomical references. Samples were stored in RNAlater (Qiagen, Singapore) at  $-80^{\circ}\text{C}$  until its use. Postmortem interval (PMI), which is the lapse between the estimated time of death and sample collection, ranged from 6.5 to 23.5 hours in the analyzed sample. A toxicology test for detecting substance consumption at the time of death was performed in both peripheral blood and brain tissue during autopsy protocol.

All procedures were approved by the Ethical Committee for Human Research at National Institute of Genomic Medicine (No. CEI/2016/33) and the Bioethics Committee of the Faculty of Medicine at UNAM (COFEPRIS 15 CI 09 003 021).

## Demographic and clinical data retrieval

Demographic and clinical data were obtained from coroner's records. The records included (1) demographic information, (2) autopsy reports, (3) description of death circumstances, (4) acute and chronic stressful life situations, (5) toxicology reports, (6) police reports, (7) medical and psychiatric notes from hospitals, (8) suicide notes, (9) death certification, and (10) testimonies from relatives and witnesses of the person who carried out the suicide.

With the information contained in coroner's records, a consensus diagnosis was reached for each individual. Consensus diagnosis was conducted by a pathologist, a psychologist, and a psychiatrist according to *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition* criteria (American Psychiatric Association, 2013). An independent experienced psychiatrist reviewed and confirmed each diagnosis. The complete data retrieval protocol from coroner's records is described by Romero-Pimentel et al. (2018). Individuals with DD were those who met diagnostic criteria for both substance use disorder and any MD.

Between-group differences in categorical (i.e., gender, tobacco use, and mechanism of death) and continuous variables (i.e., age, PMI) were evaluated by Fisher's exact test and analysis of variance, respectively.

## RNA isolation

Total RNA was isolated from  $\sim 100$  mg of brain tissue with the RNeasy kit from Qiagen<sup>TM</sup>, according to



manufacturer's instructions. RNA concentration was assessed on the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo, Waltham, Massachusetts, USA) and its integrity by electrophoresis with 1% agarose gel. In addition, the RNA integrity number (RIN) of the samples was evaluated using Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

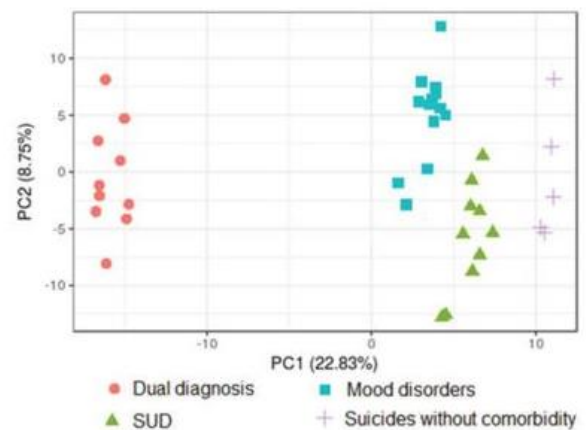
### Microarray detection

Gene expression of the 38 samples was assessed with the Illumina HumanHT-12 v4 BeadChip microarray (Illumina, California, USA), which contains 47,231 probes. For this, cDNA was prepared from 250–500 ng of total RNA from each sample and subsequently biotin-labeled with the TargetAmp™ Nano Labeling Kit (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA). Biotinylated cDNA was hybridized into the BeadChips according to manufacturer's protocol. Next, BeadChips were scanned with an iScan Microarray Scanner (Illumina, California, USA). Microarray data are accessible through the Gene Expression Omnibus repository (Edgar, Domrachev, & Lash, 2002) with access number GSE125681.

### Data preprocessing

Microarray probes were annotated, assigning them to their respective Entrez gene ID number and gene symbol with the *IlluminaHumanv4.db* package (Dunning, Lynch, & Eldridge, 2015). Raw intensity data were background-corrected by the *normexp* method (Silver et al., 2009) implemented in the *limma* package (Ritchie et al., 2015). Probes without Entrez gene ID, control probes, and external RNA Consortium probes were filtered out. In a subsequent step, probes with a detection  $p$  value  $> .05$ , as well as probes absent in more than 50% of arrays per group, were excluded from further analysis.

Gene expression values were quantile normalized and log<sub>2</sub> transformed (Smyth & Speed, 2003). Replicate probes (i.e., those with same probe ID) were summarized by their mean value. After quality control, 9,333 probes were obtained and further analyzed. Then, we performed a principal component analysis (PCA) to evaluate the presence of batch effects. We detected a batch effect associated with an unknown source of variation, but this was corrected with the *ARSyN* package (Nueda, Ferrer, & Conesa, 2011). The PCA plot after batch effect removal is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Principal component analysis plot after multidimensional normalization with ARSyN. The first two principal components (PC1 and PC2) demonstrated a clear separation of the groups. Colored symbols correspond to the groups defined in this study. The percentage in variation accounted for each principal component is shown in parenthesis with the axis label.

### Data processing

We compared the gene expression profile of suicides with DD to suicides with only substance use disorder and to suicides with only MD, as well as to suicides without any mental disorder. Gene expression differences among the groups were evaluated by a linear model implemented in the *limma* package (Ritchie et al., 2015). This model included substance use disorder and MD as well as the interaction of substance use disorder and MD, as shown in the following equation (1):

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i I_{MD} + \beta_j \gamma I_{SUD} + \gamma_{ij} I_{MD} \times I_{SUD} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

where  $y_{ijk}$  is the log<sub>2</sub> gene expression level for the  $i$ -th MD level, under the  $j$ -th substance use disorder level, in the  $k$ -th biological replicate;  $\mu$  is the global average gene expression;  $\alpha_i$ ,  $\beta_j$  and  $\gamma_i$  are the MD and substance use disorder coefficients, respectively;  $I_{MD}$  and  $I_{SUD}$  are the indicator dummy functions (0 or 1), for  $i$ -th MD and  $j$ -th substance use disorder levels, respectively;  $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$  is the random error which is normally distributed with zero expected value and variance equal to  $\sigma^2$  for the  $i$ -th MD,  $j$ -th substance use disorder, and  $k$ -th biological replicate respective levels.

A stepwise backward elimination approach was used to select the adequate linear model that best describes the observed gene expression patterns in our sample. This approach consisted of the inclusion of all potential covariates in the linear model, followed by

the reiterated removal of the least statistically significant variable and the re-estimation of the model after each removal (Heinze, Wallisch, & Dunkler, 2018). This process was repeated until the model included all the statistically significant variables. The variables sex, age, RIN, toxicology results, mechanism of death, tobacco use, and PMI were tested as potential covariates in our sample by this approach. All the candidate covariates examined were dismissed during model selection process as they did not show any effect in the gene expression changes observed in our sample.

In addition, the genes whose expression was influenced by the interaction between substance use disorder and MD were obtained from the interaction term included in the linear model (MD x substance use disorder). Biological marginal hypothesis tests between specific experimental groups were performed with a two-tailed *F* test using the complete estimated linear model parameters.

In order to reduce false-positive results, *p* values were corrected for multiple testing by the false discovery rate (FDR) method (Benjamini & Hochberg, 1995). Considering that this is an exploratory analysis, we tested different fold-change and FDR-corrected *p* value cutoffs, as no previous reports are available for the assessed comparisons. A detailed description of this procedure is available in the Supplementary Material. Finally, we selected a threshold for differentially expressed genes of FDR corrected *p* value < .001, and an absolute fold change of 1.15. The *TREAT* function was used to select the genes whose expression change was greater than 1.15 in any direction (McCarthy & Smyth, 2009).

Unsupervised hierarchical clustering was performed to determine the similarity in expression patterns among the samples with the *heatmap.2* function in the *gplot* package (Warnes et al., 2014). Since it is an unsupervised method, no information about the individuals was used for cluster assignation. Sample clustering is based solely on the similarity of the gene expression profiles, which was determined by the Euclidean distance measure and visualized by a heatmap for each comparison. Heatmaps were generated in order to obtain a visual confirmation of the experimental design. Data analysis was executed in R (R Core Team, 2013).

### Overlap analysis

We compared the list of DEG of the contrasts “DD vs. substance use disorder” and “DD vs. MD” to determine the number of DEG shared by these two contrasts, as depicted by the Venn diagram in

Figure 2A. The reasoning was to determine whether there were common altered genes and, subsequently, common altered processes in substance use disorder and MD. Therefore, we analyzed the overlap in the two lists of differentially expressed genes identified in the comparisons “DD vs. substance use disorder” and “DD vs. MD.” Then, we determined which genes presented a differential expression in a unique disorder (either substance use disorder or MD) to identify disorder-specific alterations.

To simplify this analysis, the direction of gene expression change was not considered. Thus, overlap was performed with the complete lists of DEG found in both comparisons. The association between both lists was calculated using Fisher’s exact test, which indicated an association (*p* value < .001), as expected.

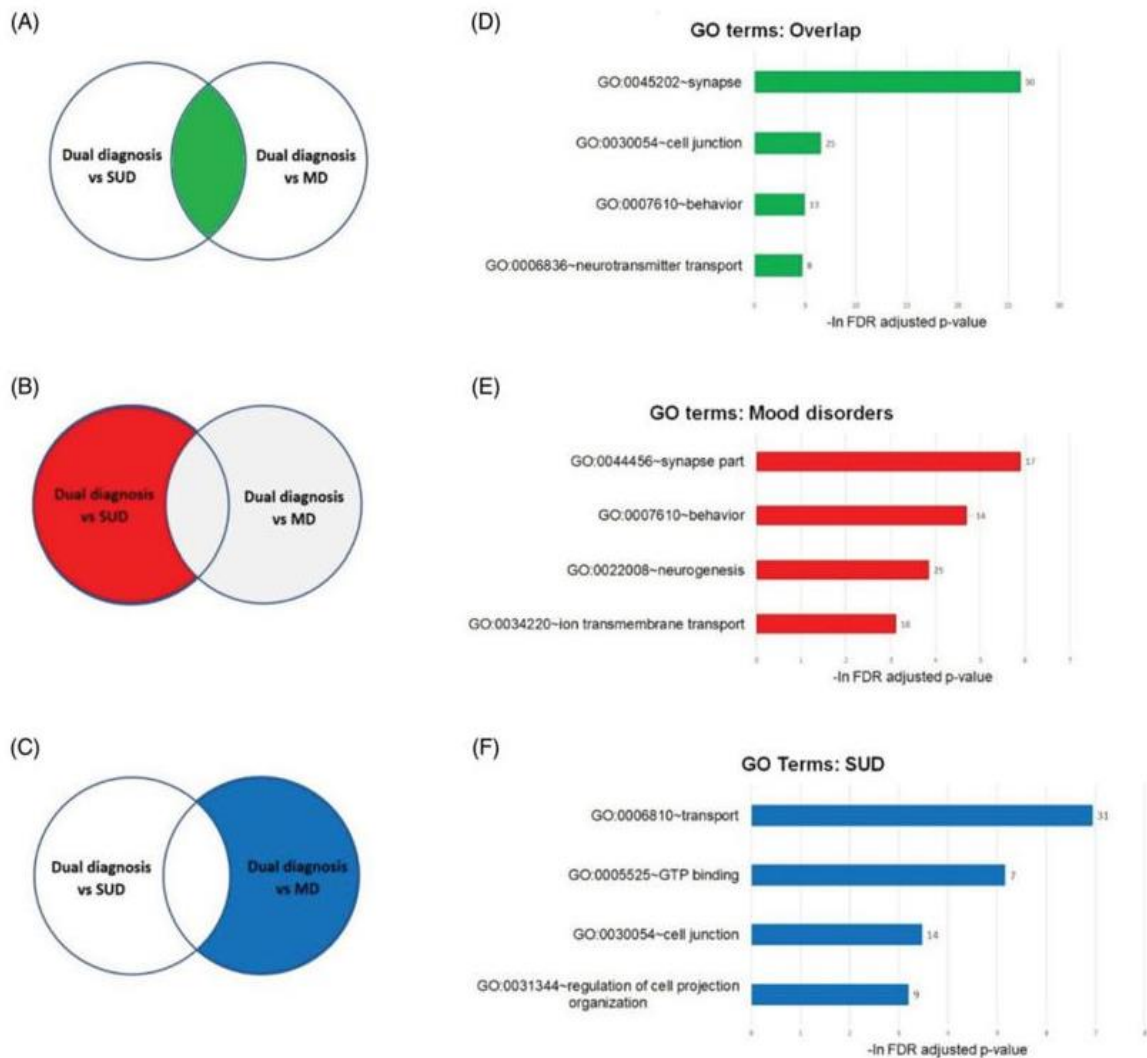
### Functional annotation analysis

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), version 6.8, was used for gene ontology (GO) enrichment analysis (Huang, Sherman, & Lempicki, 2009a, 2009b), while the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (Kanehisa & Goto, 2000) in WebGestalt (Wang, Vasaiakar, Shi, Greer, & Zhang, 2017; Zhang, Kirov, & Snoddy, 2005) was used for pathway analysis. *p* Values associated to each pathway were corrected for multiple testing by the FDR method (Benjamini & Hochberg, 1995). Pathways identified as enriched were post-processed by weighted set cover to reduce the redundancy.

GO terms and pathways with an FDR corrected *p* value < .05 were considered enriched. The 9,333 genes resulting after quality control were used as background reference in GO enrichment and pathway analyses. Functional analysis was performed over the complete lists of DEG identified in each comparison, as well as separating up- and downregulated genes.

### Cell type-specific marker enrichment

To identify whether the gene expression profiles could reflect differences in cell type compositions among the groups, we performed a cell type-specific marker enrichment with NeuroExpresso, which is a database of brain cell type-specific gene expression profiles (Mancarci et al., 2017). This tool was used through its implementation as R package known as markerGeneProfile (Mancarci et al., 2017). Briefly, the estimation of marker gene profiles was performed for each cellular type as described in Mancarci et al. (2017). This estimation is based on a PCA obtained



**Figure 2.** Overlapping and unique differentially expressed genes in “DD vs. substance use disorder” and “DD vs. mood disorder.” (a) Venn diagram of the overlap between differentially expressed genes in the dual diagnosis vs. substance use disorder and dual diagnosis vs. mood disorders comparisons. (b) Gene ontology (GO) terms related to overlapping genes in the dual diagnosis vs. substance use disorder and dual diagnosis vs. mood disorders comparisons. At the end of the bar chart, the number of genes associated to each pathway is indicated. (c) Venn diagram of the non-overlapping genes identified in the dual diagnosis vs. substance use disorder comparison. (d) GO terms related to the non-overlapping genes identified in the dual diagnosis vs. substance use disorder comparison. (e) Venn diagram of the non-overlapping genes identified in the dual diagnosis vs. mood disorders comparison. (f) GO terms related to the non-overlapping genes identified in the dual diagnosis vs. mood disorders comparison.

from the expression of mouse cell type-specific markers provided by NeuroExpresso to estimate the relative abundance of a cell type. Mouse cell type-specific markers were transformed to their respective human gene orthologs with the *homoloGene* tool (NCBI Resource Coordinators, 2017). For comparing the proportion of cell type-specific markers between the groups, we used a two-side Wilcoxon rank sum test for each cellular type.

The results of the cell type-specific marker enrichment were used to recalculate the linear model

used for the evaluation of differentially expressed genes among the groups. For this, the estimates of cell type-specific marker were included in the linear model in order to identify the genes influenced by cell type-specific marker differences among the groups.

### Results

No significant differences were found among the groups regarding age ( $p = .769$ ), sex ( $p = .133$ ),

**Table 1.** Sample characteristics.

	DD	Substance use disorder	Mood disorders	Suicides without mental disorders	<i>p</i>
Number of subjects	10	10	13	5	
Age (years)	36.5 ± 22.51	29.7 ± 13.58	30.92 ± 16.87	36.40 ± 12.62	.77
Sex (M:F)	9:1	10:0	9:4	3:2	.13
PMI (hours)	15.4 ± 4.02	14.5 ± 4.39	14.40 ± 4.13	18.41 ± 5.47	.48
Comorbid psychiatric disorder <sup>a</sup>	9/1/10	0/0/10	10/3/0	0/0/0	
RIN	6.1 ± 1.08	6.37 ± 1.20	6.55 ± 1.20	5.96 ± 1.29	.30
Mechanism of death <sup>b</sup>	7/0/2/0/1	10/0/0/0/0	9/1/1/1/1	5/0/0/0/0	.15
Positive result in toxicology test	8	7	2	1	.003
Smokers	6	7	2	0	.006

Note. Continuous data are presented as mean ± standard deviation. Two-tailed *p* value tests are described in methods.

DD = dual diagnosis; M = male; F = female; PMI = postmortem interval; RIN = RNA integrity number.

<sup>a</sup>Major depression disorder/bipolar disorder/substance use disorder.

<sup>b</sup>Asphyxia by hanging/gunshot/intoxication/trauma/puncture wound.

mechanism of death ( $p = .15$ ), and PMI ( $p = .48$ ). Alcohol use disorder (AUD) was the most frequent substance use disorder in the DD and substance use disorder groups. In the DD group, nine individuals had AUD, and one individual presented with benzodiazepine use disorder. From the individuals with AUD in the DD group, two had cannabis use disorder, one had cocaine use disorder, and one had tobacco use disorder as well. In the substance use disorder group, eight individuals presented with AUD, one had cocaine use disorder, and one had inhalant use disorder. Among those with AUD in the substance use disorder group, two had tobacco use disorder as well.

Major depression disorder was the most frequent MD in the DD and MD groups (90% and 77%, respectively). The most frequent mechanism of death in all the groups was asphyxia by hanging. Sample demographic and clinical characteristics are shown in Table 1.

### DD vs. substance use disorder

When comparing the gene expression profile of suicides with DD to suicides with substance use disorder, 255 DEG were identified, of which 32 were upregulated and 223 downregulated. The heatmap showed a clear separation of the groups, as shown in Figure 1A. The GO terms and pathways related to the DEG in this comparison are illustrated in Figure 3B and Figure 3C, respectively. Upregulated genes were related to negative regulation of apoptotic process and MAPK cascade.

### DD vs. MD

The comparison between suicides with DD and suicides with MD showed 172 DEG; 52 of them were upregulated and 120 were downregulated. Visual inspection over the corresponding heatmap showed that the two groups clustered separately (see

Figure 4A). Group clustering in the heatmaps suggests marked differences in the gene expression between the groups. The GO terms and pathways related to the DEG are shown in Figure 4B and Figure 4C, respectively.

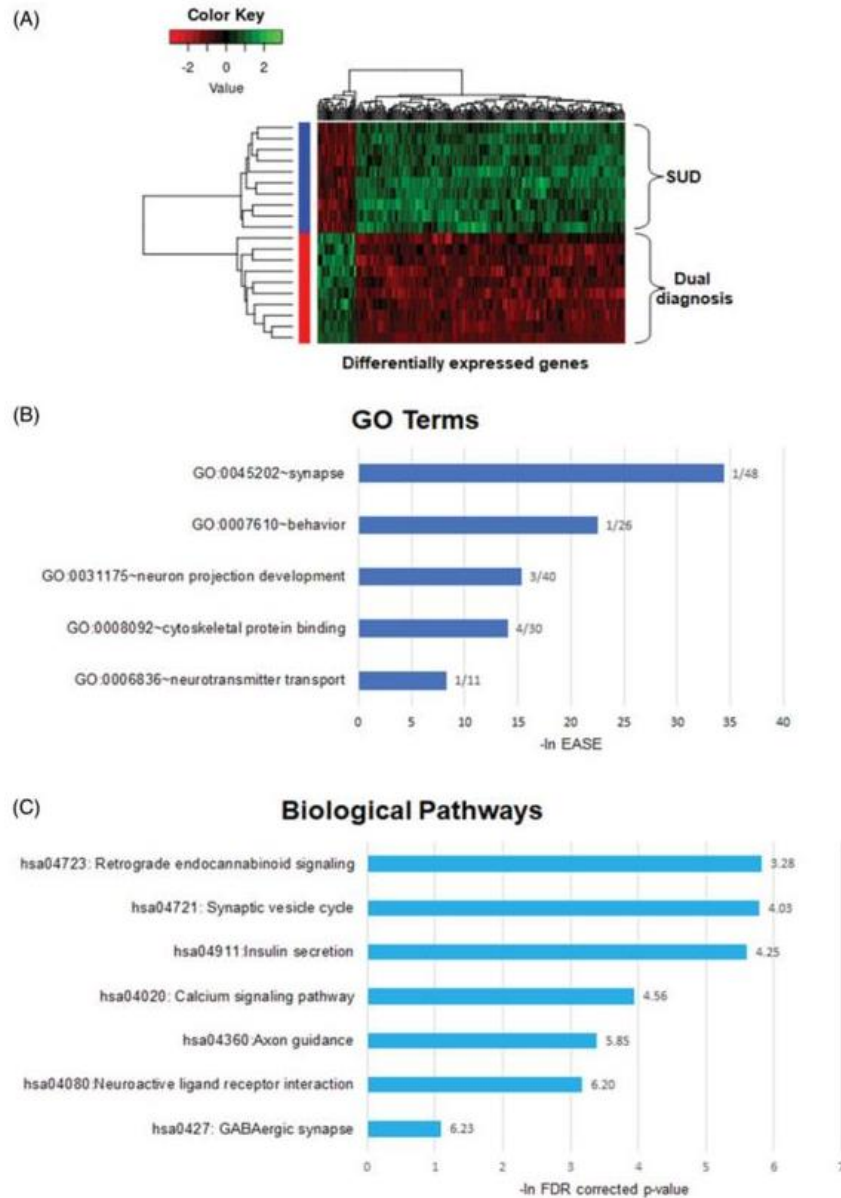
### Overlap of DEG in “DD vs. substance use disorder” and “DD vs. MD”

The overlap of the DEG from both comparisons “DD vs. substance use disorder” and “DD vs. MD” yielded 112 overlapping genes, corresponding to 26.22% of total DEG. The GO terms related to the overlapping genes are shown in Figure 2D. The genes associated with neurotransmission were not related to a specific type of neurotransmitter, except by *SLC17A7*, which codes for a glutamate transporter.

Then, we determined the DEG present only in one comparison (i.e., either in “DD vs. substance use disorder” or “DD vs. MD”). The “DD vs. substance use disorder” comparison comprised 143 unique genes that were enriched in the GO terms synapse, cytoskeletal organization, GABAergic and glutamatergic neurotransmission. Finally, the comparison between DD and MD yielded 60 unique genes. The GO terms related to the unique genes found in each comparison are shown in Figure 2E and 2EF, respectively.

### DD vs. suicide without mental comorbidity

In the comparison between suicides with DD and suicides without any mental disorder, 330 DEG were detected, including 62/268 genes up- and downregulated, respectively. A clear separation of the two groups was observed in the corresponding heatmap (Figure 5A), indicating that gene expression patterns in the prefrontal cortex between both groups are different. The GO terms and pathways related to the DEG found in this comparison are shown in Figure 5B and 5C, respectively. Functional analysis of



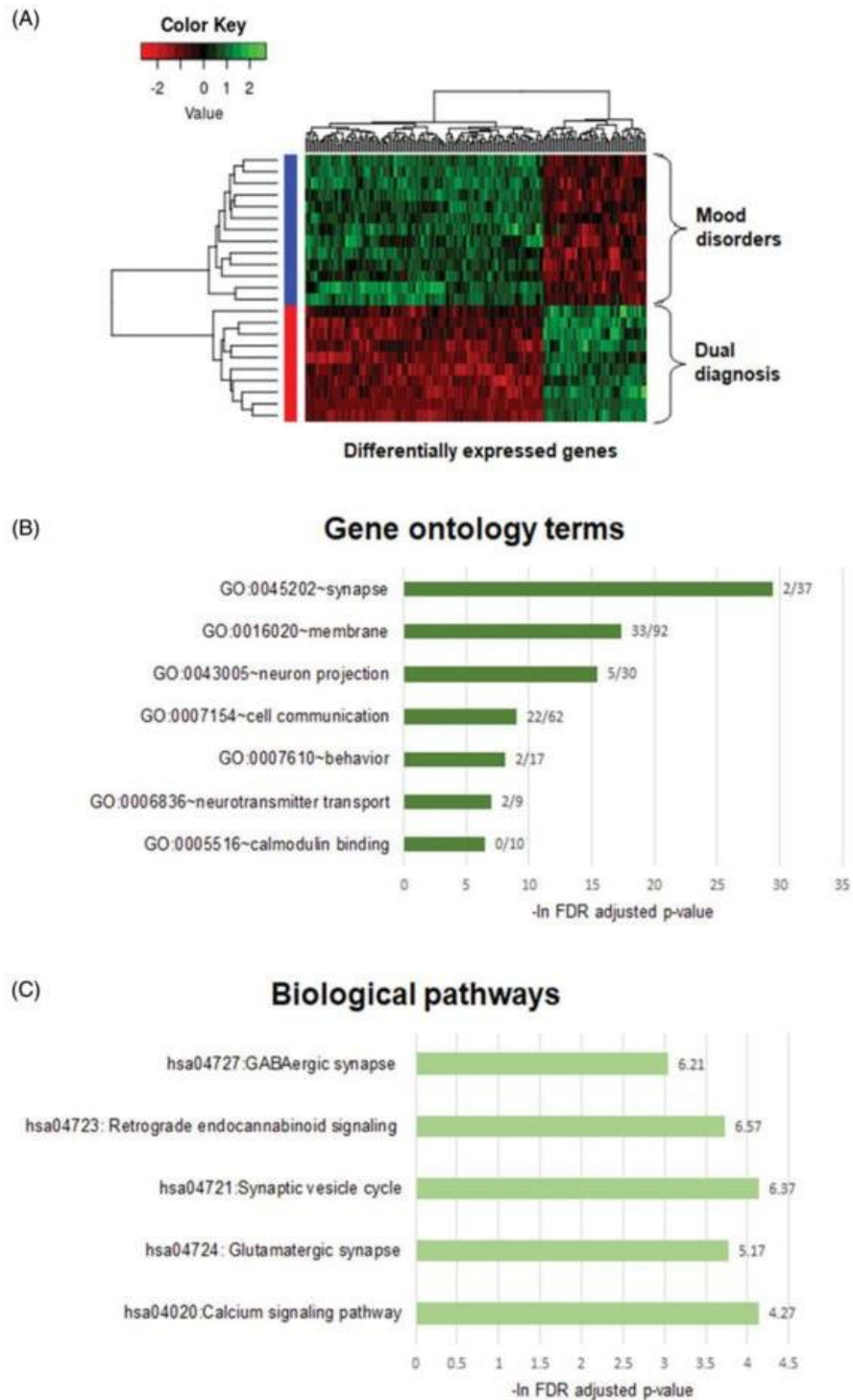
**Figure 3.** Dual diagnosis vs. substance use disorder comparison. (A) Heatmap visualization on the differentially expressed genes between persons with dual diagnosis and those with substance use disorder. Differentially expressed genes are in columns and samples in rows. Gene expression levels are depicted with a red-green spectrum for down-/upregulated genes, respectively. (B) Gene ontology terms related to differentially expressed genes. At the end of the bar chart, the number of upregulated/downregulated genes is indicated. (C) Biological pathways related to differentially expressed genes. The enrichment score associated with each pathway is shown at the end of the bar chart.

the upregulated genes indicated enrichment in myelin sheath, oligodendrocyte differentiation, and negative regulation of cell proliferation.

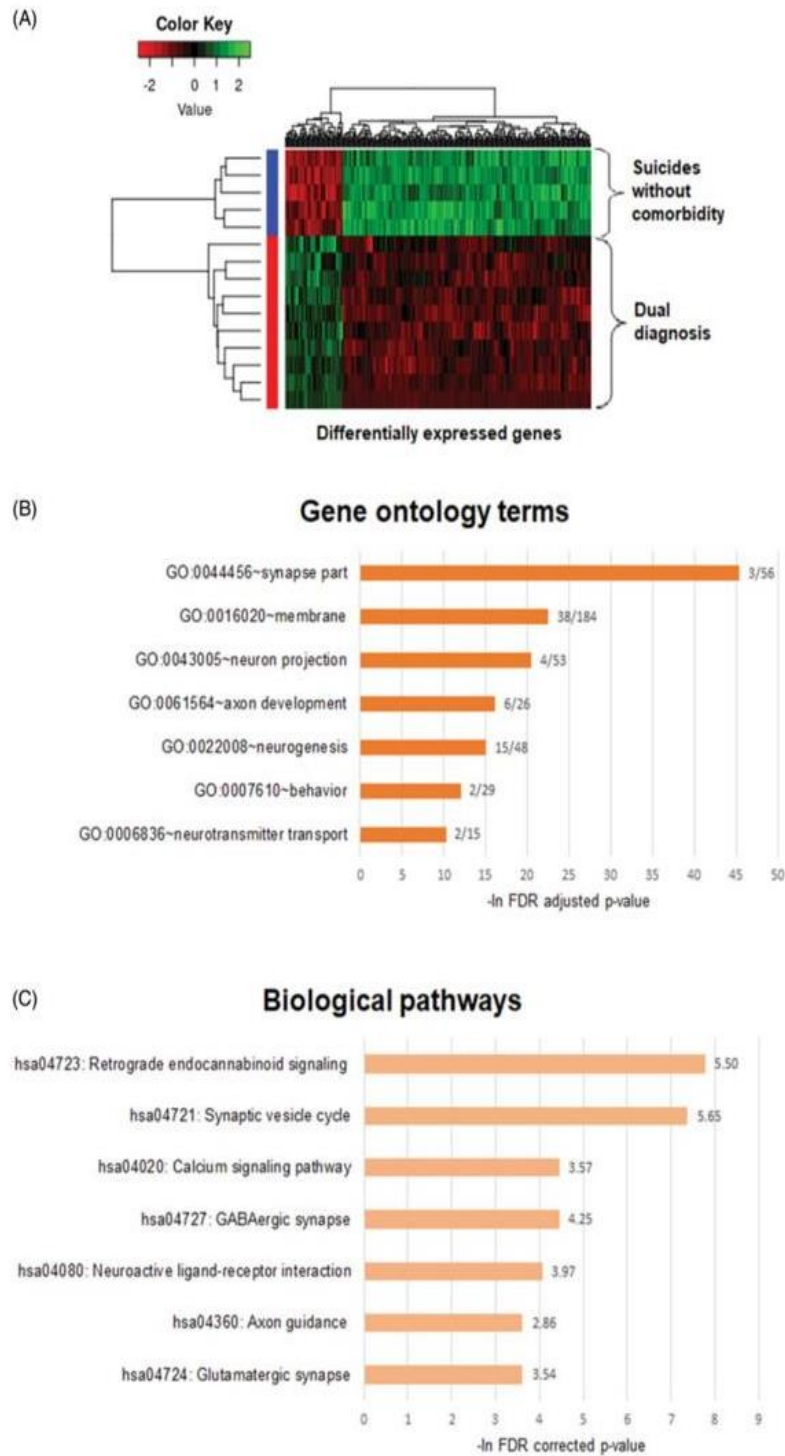
**Interaction between substance use disorder and MD**

The interaction term (substance use disorder x MD) indicated that the expression of 133 genes was

influenced by the interaction between substance use disorder and MD. Functional analysis of these genes showed enrichment in vesicle (GO:0031982, 58 genes), synapse (GO:0045202, 31 genes), neurogenesis (GO:0022008, 26 genes), cell junction (GO:0030054, 21 genes), and myelin sheath (GO:0043209, 13 genes). The pathway analysis indicated association to synaptic vesicle cycle (hsa04721, 6 genes: *ATP6V1A*, *ATP6V1G2*, *SNAP25*, *STX1A*, *VAMP2*, *SYT1*) and



**Figure 4.** Dual diagnosis vs. mood disorders comparison. (A) Heatmap visualization on the differentially expressed genes between persons with dual diagnosis and those with mood disorders. Differentially expressed genes are in columns and samples in rows. Gene expression levels are depicted with a red-green spectrum for down-/upregulated genes, respectively. (B) Gene ontology terms related to differentially expressed genes. At the end of the bar chart, the number of upregulated/downregulated genes is indicated. (C) Biological pathways related to differentially expressed genes. The enrichment score associated to each pathway is shown at the end of the bar chart.



**Figure 5.** Dual diagnosis vs. suicides without mental comorbidity comparison. (A) Heatmap visualization on the differentially expressed genes between persons with dual diagnosis and those without mental comorbidity. Differentially expressed genes are in columns and samples in rows, respectively. Gene expression levels are depicted in red-green spectrum for down-/upregulated genes. (B) Gene ontology terms related to differentially expressed genes. At the end of the bar chart, the number of upregulated/downregulated genes is indicated. (C) Biological pathways related to differentially expressed genes. The enrichment score associated to each pathway is shown at the end of the bar chart.

calcium signaling pathway (hsa04020, 7 genes: *ADCY1*, *SLC25A4*, *ITPKB*, *PPP3CB*, *PRKCB*, *VDAC3*, *CAMK2B*). The lists of DEG identified in each comparison as well as genes influenced by the interaction between substance use disorder and MD are available in the Supplementary Material.

### Cell type-specific marker enrichment

Cell type-specific marker enrichment indicated higher expression levels of marker genes for glial cells such as astrocytes, microglia, and oligodendrocytes in suicides with DD compared to suicides with substance use disorder, suicides with MD, and suicides without mental disorders. In contrast, a decreased expression of specific markers associated to parvalbumin (PV) GABAergic and pyramidal neurons was found in suicides with DD compared to the other groups. Complete results of cell type-specific marker enrichment are available in Supplementary Figure 1 and Supplementary Table S1.

The number of genes influenced by cell type heterogeneity was estimated by its inclusion in the linear model used for differential expression analysis among the groups. In this model re-estimation, we found the influence of microglial activation, microglial deactivation and Martinotti subpopulation of GABA neurons in the expression of five, twelve, and one gene, respectively, at an FDR corrected  $p$  value  $< .10$ . The genes influenced by potential changes in these cell populations and their respective FDR corrected  $p$  value are listed in Supplementary Table S2. As the selected FDR corrected  $p$  value cutoff for this study is .001, the mentioned cell types were not considered as covariates in our analysis.

### Discussion

Neurobiological factors underlying DD have been poorly explored (Balhara, Kuppili, & Gupta, 2017). To the extent of our knowledge, this is the first transcriptome-level study comparing gene expression profiles in human brain tissue of persons with DD to those with substance use disorder and MD.

The characterization of molecular traits in persons with DD will allow the design of prevention and therapeutic measures oriented to the adequate treatment of this entity. Currently, treatment is mainly aimed at only one of the disorders of this comorbidity (Schiffer et al., 2010), which results in suboptimal clinical outcomes.

### DD vs. substance use disorder

The differential expression of genes related to synaptic signaling suggests a compromised synaptic function at multiple levels, such as cytoskeletal assembly, neurotransmitter receptors, and vesicle trafficking. This finding indicates a possible disrupted synaptic efficacy, which may lead to an impaired cognitive function (Berchtold et al., 2013). Since persons of both groups presented with substance use disorder, it is unlikely that the observed differences in the gene expression pattern could be attributed to the effect of substance use alone.

In this comparison, we identified the upregulation of *GFAP*, which supports a role of glial cells, particularly astrocytes, in the pathology of DD, as has been proposed formerly (Miguel-Hidalgo et al., 2002). This finding suggests a possible astrocyte activation. In addition, cell type-specific marker enrichment suggested a higher expression of glial specific genes, including astrocytes, in suicides with DD in comparison to suicides with a single disorder and suicides without mental disorders. The observed upregulation of genes involved in negative regulation of apoptosis may be a consequence of neurotrophic factors release by activated astrocytes (Brahmachari, Fung, & Pahan, 2006).

Contrasting with our results, a DD animal model exhibited a downregulation of *GFAP* in the prefrontal cortex in response to cocaine exposure (Chambers et al., 2013). However, this discrepancy may be due to the assessment of the effect of different substances. In that animal model, authors evaluated the transcriptome of rats with cocaine sensitization (Chambers et al., 2013), while in our sample the most used substance was alcohol. Despite the inconsistency in the direction of change of *GFAP* between both studies, its misexpression in two different DD phenotypes suggests a role for this gene in dual diagnosis pathogenesis. The participation of *GFAP* in other co-occurring disorders should be evaluated in future studies (Chambers et al., 2013).

*GFAP*, *HMG20B*, *PCDH7*, *NXT2*, and *YES1* were detected as DEG in our study as in the study by Chambers et al. (2013). Nevertheless, they detected those gene expression changes in the caudate-putamen and nucleus accumbens of rats. This brain region discrepancy highlights the need of evaluating gene expression patterns in individuals with dual diagnosis in other brain regions besides the prefrontal cortex.

### DD vs. MD

Besides gene expression changes in biological pathways similar to the previous comparison, such as



synaptic signaling, a differential expression of genes involved in GABAergic and glutamatergic neurotransmission was detected between suicides with DD and suicides with MD. The upregulation of the glutamate transporter *SLC1A3* is remarkable, as the downregulation of this gene has been reported in persons with MD (Choudary et al., 2005; Sequeira et al., 2009). These could be a pivotal difference between patients with DD and patients with MD and might underlie the poor prognosis associated with patients with DD in comparison with those with MD.

Decreased levels of PV GABAergic interneurons and pyramidal neurons markers were found in suicides with DD in comparison to all other studied groups of suicides, as indicated in our cell type-specific marker enrichment analysis. This finding is in agreement with a possible alteration in the GABA and glutamatergic neurotransmission in suicides with DD, as suggested by our gene expression results. Whether differences in cell type-specific genes are related to cell number and density in individuals with DD should be further explored.

#### **Overlap of DEG in “DD vs. substance use disorder” and “DD vs. MD”**

The high comorbidity of substance use disorder and MD could be explained by shared environmental, genetic, and biological factors (Carrà, Bartoli, Clerici, & el-Guebaly, 2015). In line with this hypothesis, our results indicated a high overlap between the DEG identified in the comparisons “DD vs. substance use disorder” and “DD vs. MD,” suggesting that substance use disorder and MD have common disrupted pathways, as in the case of synaptic signaling.

A remarkable finding was that overlapping genes were not related to a specific neurotransmitter system; rather, they are involved in general synaptic mechanisms. This may suggest a global impairment of the synapsis underlying the comorbidity of substance use disorder and MD, which is relevant due to its potential impact in the disruption of neuronal circuits (van Spronsen & Hoogenraad, 2010).

However, there are genes whose expression may be altered according to the comorbid condition. For example, in MD (identified as the non-overlapping genes from the comparison DD vs. substance use disorder) we found alteration of genes related to specific neurotransmitter systems as GABA and glutamate signaling and cytoskeletal organization. Meanwhile in substance use disorder (identified as the non-overlapping genes from the comparison DD vs. MD),

we detected the alteration of genes related to transport, particularly GABA and glutamate transporters. Changes in the expression of genes from the same molecular pathway but at different levels may lead to different gene expression patterns and consequently to the observed phenotypical differences between individuals with MD and substance use disorder.

#### **DD vs. suicides without comorbidity**

We detected the downregulation of genes involved in neurogenesis, as well as the upregulation of negative regulators of such pathways in suicides with DD compared to suicides without any mental comorbidity. This finding suggests a decreased neurogenesis in persons with DD in comparison with those without mental comorbidity.

Special attention has been paid to the probable decrease of neurogenesis in the hippocampus of individuals with DD (Chambers, 2013). Moreover, due to the interplay between the hippocampus and the prefrontal cortex, it is reasonable to assume that abnormal neurogenesis could impact both brain regions, as well as other areas participating in the cortico-hippocampal circuit. The observed reduced expression of genes involved in axogenesis and neurotransmission could be a consequence of decreased neurogenesis.

#### **Interaction between substance use disorder and MD**

Among the genes whose expression was found to be influenced by the interaction of substance use disorder and MD, the large number of genes related to vesicular function was evident. Vesicles play an important role in the modulation of cell-to-cell communication in the central nervous system (Fries et al., 2019; Fries & Quevedo, 2018; Pegtel, Peferoen, & Amor, 2014) and the involvement of vesicles in mental disorders, including major depressive disorder and bipolar disorder, has been explored recently (Fries et al., 2019; Fries & Quevedo, 2018; Ilgin & Topuzoğlu, 2018). Thus, the role of genes involved in vesicular function in DD and its association with suicide should be further investigated.

Further, our results suggest that the interaction between substance use disorder and MD could alter the expression of genes participating in neurogenesis. The misexpression of neurogenesis genes might be part of the underpinning mechanisms of the differences in cell type of persons with DD relative to the

other groups observed in the cell type-specific marker enrichment.

The present study has some limitations, such as the relatively small sample size, the absence of persons with psychiatric diseases other than MD, and the restriction of the analysis to a single brain region. We hypothesize that relevant gene expression changes may also be present in other brain regions previously implicated in substance use disorder and MD, for instance, the hippocampus and amygdala.

This analysis was conducted only in suicides. Therefore, future studies including suicidal and non-suicidal persons are necessary to elucidate the underlying mechanisms involved in the association between DD and other mortality causes, apart from suicide.

A methodological limitation inherent to microarray platforms is the analysis restriction to the probes chosen by the manufacturer, which may be overcome by the use of RNA sequencing in future studies. Furthermore, some limitations are intrinsic to post-mortem studies, such as the limited diagnosis approach, which was only based on the medical records and did not contemplate the severity of the disorders, medication use, etc.

The present analysis was performed on bulk tissue, which did not allow a precise description of cell-specific gene expression patterns. Cell type marker enrichment suggests previously discussed differences in the expression of cell-specific genes for several cell types among the groups. A possible interpretation for the found cell-specific marker changes is a shift in the relative abundance of the corresponding cell type (Mancarci et al., 2017). Therefore, the observed gene expression changes among the groups may represent cell type composition differences, rather than transcriptional differences (Tsoucas et al., 2019). In brain tissue of mice (McKenzie et al., 2018) and human patients with psychiatric disorders, it has been suggested that gene expression changes can be attributed to alterations in the relative cell abundance (Ramaker et al., 2017; Toker, Mancarci, Tripathy, & Pavlidis, 2018). Although we made an estimation of the genes influenced by cell-specific markers and it was not significant at the cutoff used in this study, we cannot discard the influence of this effect in our results. The use of specialized methods in future research, such as single-cell RNA sequencing and microdissection, will enable the identification of relevant cell-type gene expression patterns.

Future research with larger sample sizes are needed to confirm our findings. If differences in the gene expression pattern between persons with DD and

those with a single mental disorder are established, subsequent studies could provide insight about the factors influencing gene expression patterns in DD (i.e., disorder-specific gene expression changes and the regulatory mechanisms underlying the observed gene expression patterns). Since mental disorders are complex phenotypes where several factors are involved, ethnicity and the environmental factors of the Mexican population may contribute to gene expression changes that could not be replicated in other populations.

In conclusion, our results suggest that suicides with DD present a gene expression profile distinct from that of suicides with a single disorder and suicides without mental disorders. In addition, suicides with DD, substance use disorder, and MD exhibited alterations in the expression of synaptic genes. However, suicides with each condition (DD, substance use disorder, or MD) exhibited unique gene expression changes at different levels within synaptic signaling. These gene expression differences might contribute to the phenotypical and clinical discrepancies observed in patients with DD and patients with a single disorder, such as MD or substance use disorder.

### Acknowledgments

We thank Professor Robert Simpson for his appreciable help in the language editing and proofreading of this manuscript. This project was awarded with the best oral presentation prize at the International Congress of Dual Diagnosis 2019.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACyT) under Grant number #233695. Brenda Cabrera-Mendoza is a doctoral student from the Plan of Combined Studies in Medicine at National Autonomous University of Mexico and was supported by CONACyT [#622945].

### Data availability

The data that support the findings of this study are openly available in the Gene Expression Omnibus repository with access number GSE125681.

## References

- Abroms, M., & Sher, L. (2016). Dual disorders and suicide. *Journal of Dual Diagnosis, 12*(2), 148–149. doi:10.1080/15504263.2016.1172898
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Arlington, VA: American Psychiatric Association.
- Balhara, Y., Kuppili, P. and Gupta, R. (2017). Neurobiology of comorbid substance use disorders and psychiatric disorders. *Journal of Addictions Nursing, 28*(1), 11–26. doi: 10.1097/JAN.0000000000000155
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B, 57*(1), 289–300. doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Berchtold, N. C., Coleman, P. D., Cribbs, D. H., Rogers, J., Gillen, D. L., & Cotman, C. W. (2013). Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging, 34*(6), 1653–1661. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.024
- Brahmachari, S., Fung, Y. K., & Pahan, K. (2006). Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *The Journal of Neuroscience, 26*(18), 4930–4939. doi:10.1523/JNEUROSCI.5480-05.2006
- Cabrera, B., Monroy-Jaramillo, N., Fries, G., Mendoza-Morales, R., García-Dolores, F., Mendoza-Larios, A., ... Nicolini, H. (2019). Brain gene expression patterns of subjects with substance use disorder. *Molecular Neuropsychiatry, 5*(1), 60–73. doi:10.1159/000493940
- Carmioli, N., Peralta, J. M., Almasy, L., Contreras, J., Pacheco, A., Escamilla, M. A., ... Glahn, D. C. (2014). Shared genetic factors influence risk for bipolar disorder and alcohol use disorders. *European Psychiatry, 29*(5), 282–287. doi:10.1016/j.eurpsy.2013.10.001
- Carrà, G., Bartoli, F., Clerici, M., & el-Guebaly, N. (2015). Psychopathology of dual diagnosis: New trumpets and old uncertainties. *Journal of Psychopathology, 21*(4), 390–399
- Carrà, G., Johnson, S., Bebbington, P., Angermeyer, M. C., Heider, D., Brugha, T., ... Toumi, M. (2012). The lifetime and past-year prevalence of dual diagnosis in people with schizophrenia across Europe: Findings from the European Schizophrenia Cohort (EuroSC). *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 262*(7), 607–616. doi:10.1007/s00406-012-0305-z
- Center for Substance Abuse Treatment. (2005). *Substance abuse treatment for persons with co-occurring disorders. Treatment improvement protocol (TIP) series 42*. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration.
- Chambers R. A. (2013). Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug and Alcohol Dependence, 130*(1–3), 1–12. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2012.12.005
- Chambers, R. A., McClintick, J. N., Sentir, A. M., Berg, S. A., Runyan, M., Choi, K. H., & Edenberg, H. J. (2013). Cortical-striatal gene expression in neonatal hippocampal lesion (NVHL)-amplified cocaine sensitization. *Genes, Brain, and Behavior, 12*(5), 564–575. doi:10.1111/gbb.12051
- Choudary, P. V., Molnar, M., Evans, S. J., Tomita, H., Li, J. Z., Vawter, M. P., ... 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), 15653–15658. doi:10.1073/pnas.0507901102
- Dunning, M., Lynch, A., Eldridge, M. (2015). *IlluminaHumanv4.db: Illumina HumanHT12v4 annotation data (chip illuminaHumanv4)*. R package version 1.26.0
- Edgar, R., Domrachev, M., & Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research, 30*(1), 207–210. doi:10.1093/nar/30.1.207
- Fries, G.R., Lima, C.N.C., Valvassori, S.S., Zunta-Soares, G., Soares, J.C., Quevedo, J., (2019). Preliminary investigation of peripheral extracellular vesicles' microRNAs in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders, 255*, 10–14. doi: 10.1016/j.jad.2019.05.020
- Fries, G.R., Quevedo, J., (2018). Exosomal microRNAs as potential biomarkers in neuropsychiatric disorders. *MicroRNA Protocols, 1733*, 79–85. doi:10.1007/978-1-4939-7601-0\_6
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: Neuroimaging findings and clinical implications. *Nature Reviews Neuroscience, 12*(11), 652–669. doi:10.1038/nrn3119
- Heinze, G., Wallisch, C., & Dunkler, D. (2018). Variable selection - A review and recommendations for the practicing statistician. *Biometrical Journal, 60*(3), 431–449. doi:10.1002/bimj.201700067
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols, 4*(1), 44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211
- Huang, d., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research, 37*(1), 1–13. doi:10.1093/nar/gkn923
- Ilgın, C., & Topuzoğlu, A. (2018). Extracellular vesicles in psychiatry research in the context of RDoC criteria. *Psychiatry Investigation, 15*(11), 1011–1018. doi:10.30773/pi.2018.09.17
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research, 28*(1), 27–30. doi:10.1093/nar/28.1.27
- Kelly, T. M., & Daley, D. C. (2013). Integrated treatment of substance use and psychiatric disorders. *Social Work in Public Health, 28*(3–4), 388–406. doi:10.1080/19371918.2013.774673
- Mancarci, B. O., Toker, L., Tripathy, S. J., Li, B., Rocco, B., Sibille, E., & Pavlidis, P. (2017). Cross-laboratory analysis of brain cell type transcriptomes with applications to interpretation of bulk tissue data. *eNeuro, 4*(6), doi:10.1523/ENEURO.0212-17.2017
- McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics, 25*(6), 765–771. doi:10.1093/bioinformatics/btp053
- McKenzie, A. T., Wang, M., Hauberg, M. E., Fullard, J. F., Kozlenkov, A., Keenan, A., ... Zhang, B. (2018). Brain cell type specific gene expression and co-expression

- network architectures. *Scientific Reports*, 8(1), 8868. doi:10.1038/s41598-018-27293-5
- Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Andrew, M., Overholser, J. C., Jurjus, G., Stockmeier, C. A., & Rajkowska, G. (2002). Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biological Psychiatry*, 52(12), 1121–1133. doi:10.1016/S0006-3223(02)01439-7
- NCBI Resource Coordinators. (2017). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D12–D17. doi:10.1093/nar/gkw1071
- Nolan, C. L., Moore, G. J., Madden, R., Farchione, T., Bartoi, M., Lorch, E., ... Rosenberg, D. R. (2002). Prefrontal cortical volume in childhood-onset major depression. *Archives of General Psychiatry*, 59(2), 173–179. doi:10.1001/archpsyc.59.2.173
- Nubukpo, P., Girard, M., Sengelen, J. M., Bonnefond, S., Varnoux, A., Marin, B., & Malauzat, D. (2016). A prospective hospital study of alcohol use disorders, comorbid psychiatric conditions and withdrawal prognosis. *Annals of General Psychiatry*, 15(1), 22. doi:10.1186/s12991-016-0111-5
- Nueda, M. J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2011). ARSYN: A method for the identification and removal of systematic noise in multifactorial time course microarray experiments. *Biostatistics*, 13(3), 553–566. doi:10.1093/biostatistics/kxr042
- Olvera, R. L., Bearden, C. E., Velligan, D. I., Almasy, L., Carless, M. A., Curran, J. E., ... Glahn, D. C. (2011). Common genetic influences on depression, alcohol, and substance use disorders in Mexican-American families. *American Journal of Medical Genetics Part B*, 156(5), 561–568. doi:10.1002/ajmg.b.31196
- Pegtel, D. M., Peferoen, L., & Amor, S. (2014). Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652), 20130516. doi:10.1098/rstb.2013.0516
- R Core Team. (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Ramaker, R. C., Bowling, K. M., Lasseigne, B. N., Hagenauer, M. H., Hardigan, A. A., Davis, N. S., ... Myers, R. M. (2017). Post-mortem molecular profiling of three psychiatric disorders. *Genome Medicine*, 9(1), 72. doi:10.1186/s13073-017-0458-5
- Regier, D., Farmer, M.E., Rae, D.S., Locke, B.Z., Keith, S.J., Judd, L.L., Goodwin, F.K., (1990). Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA*, 264(19), 2511–2518. doi:10.1001/jama.264.19.2511
- Ringen, P. A., Melle, I., Birkenaes, A. B., Engh, J. A., Faerden, A., Vaskinn, A., ... Andreassen, O. A. (2008). The level of illicit drug use is related to symptoms and premorbid functioning in severe mental illness. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 118(4), 297–304. doi:10.1111/j.1600-0447.2008.01244.x
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). *limma* powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. doi:10.1093/nar/gkv007
- Romero-Pimentel, A. L., Mendoza-Morales, R. C., Fresan, A., Garcia-Dolores, F., Gonzalez-Saenz, E. E., Morales-Marin, M. E., ... Borges, G. (2018). Demographic and clinical characteristics of completed suicides in Mexico City 2014–2015. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 402. doi:10.3389/fpsy.2018.00402
- Schiffer, B., Müller, B., Scherbaum, N., Forsting, M., Wiltfang, J., Leygraf, N., ... Gizewski, E. (2010). Impulsivity-related brain volume deficits in schizophrenia-addiction comorbidity. *Brain*, 133(10), 3093–3103. doi:10.1093/brain/awq153
- Sequeira, A., Mamdani, F., Ernst, C., Vawter, M. P., Bunney, W. E., Lebel, V., ... Turecki, G. (2009). Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS ONE*, 4(8), e6585. doi:10.1371/journal.pone.0006585
- Silver, J. D., Ritchie, M. E., & Smyth, G. K. (2009). Microarray background correction: Maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*, 10(2), 352–363. doi:10.1093/biostatistics/kxn042
- Smyth, G. K., & Speed, T. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, 31(4), 265–273. doi:10.1016/S1046-2023(03)00155-5
- Toker, L., Mancarci, B. O., Tripathy, S., & Pavlidis, P. (2018). Transcriptomic evidence for alterations in astrocytes and parvalbumin interneurons in subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 84(11), 787–796. doi:10.1016/j.biopsych.2018.07.010
- Tsoucas, D., Dong, R., Chen, H., Zhu, Q., Guo, G., Yuan, G.-C. (2019). Accurate estimation of cell-type composition from gene expression data. *Nature Communications*, 10, 2975. doi:10.1038/s41467-019-10802-z
- van Spronsen, M., & Hoogenraad, C. C. (2010). Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(3), 207–214. doi:10.1007/s11910-010-0104-8
- Volkow, N. D. (2009). Substance use disorders in schizophrenia—clinical implications of comorbidity. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 469–472. doi:10.1093/schbul/sbp016
- Wang, J., Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M., & Zhang, B. (2017). WebGestalt 2017: A more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W130–W137. doi:10.1093/nar/gkx356
- Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W. H. A., Lumley, T., ... Venables, B. (2014). *Package 'gplots'*. Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/gplots.pdf>
- Weaver, T., Madden, P., Charles, V., Stimson, G., Renton, A., Tyrer, P., ... Ford, C. (2003). Comorbidity of substance misuse and mental illness in community mental health and substance misuse services. *British Journal of Psychiatry*, 183(4), 304–313. doi:10.1192/bjp.183.4.304
- Zhang, B., Kirov, S., & Snoddy, J. (2005). WebGestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W741–W748. doi:10.1093/nar/gki475

## Otros artículos publicados durante el doctorado

Nicolini, H., Salin-Pascual, R., **Cabrera, B.**, & Lanzagorta, N. (2018). Influence of culture in obsessive-compulsive disorder and its treatment. *Current Psychiatry Reviews*, 13(4), 285–292. <https://doi.org/10.2174/2211556007666180115105935>

Los factores culturales influyen en múltiples aspectos de nuestra vida, incluyendo la presentación clínica de los trastornos mentales. En este artículo realizamos una revisión de la literatura en un periodo de diez años con el objetivo de describir los aspectos culturales que pudieran influir en la presentación clínica del trastorno obsesivo compulsivo. En este trabajo discutimos aspectos que se han relacionado con algunas dimensiones de la sintomatología del trastorno obsesivo compulsivo. son la religión y la religiosidad, que afectan el contenido de las obsesiones y la gravedad de sus manifestaciones. Evaluar adecuadamente los antecedentes educativos, el acceso a los servicios de salud, la alimentación y la estructura genética de las poblaciones, utilizando instrumentos de investigación sensibles a estos elementos culturales podría mejorar nuestra comprensión de la importancia de la cultura en el trastorno obsesivo compulsivo y su tratamiento.

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.ae](mailto:reprints@benthamscience.ae)

285

*Current Psychiatry Reviews*, 2017, 13, 285–292

### REVIEW ARTICLE



## Influence of Culture in Obsessive-compulsive Disorder and Its Treatment



Humberto Nicolini<sup>1,2,\*</sup>, Rafael Salin-Pascual<sup>2,3</sup>, Brenda Cabrera<sup>1</sup> and Nuria Lanzagorta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Clinical Research, Carracci Medical Group, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>Departamento de Psiquiatría y Salud Mental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

### ARTICLE HISTORY

Received: August 10, 2016  
Revised: November 23, 2017  
Accepted: January 10, 2018

DOI:  
[10.2174/2211556007666180115105935](https://doi.org/10.2174/2211556007666180115105935)

**Abstract: Background:** The aspects of cultural identity and its impact on obsessive-compulsive disorder (OCD) have been understudied. There are different opinions, ranging from the idea that culture does not affect the symptoms of this condition to the idea that cultures with high religiosity may have more severity of OCD. Also, the concept of OCD has considerably varied across history and cultures, from being considered an issue related to lack of control of blasphemous ideas, and a part of anxious issues, to the description of complex neurobiological systems in its causation.

**Objective:** The aim of this review was to address OCD as a well-characterized disorder with a proposed neurobiological basis which may or may not have variations depending on cultural diversity. The question that was asked in this review is whether or not there are cultural differences in the manifestations of the OCD symptomatology and which factors of cultural diversity have a major influence on such manifestations along with the differences among some cultures regarding OCD issues, where the difference among countries has also been highlighted.

**Methods:** A review of the literature was conducted that includes the following words: obsessive-compulsive disorder, culture, cultural identity and religion in a period of 10 years.

**Conclusion:** Cultural variations do not seem to differ from symptomatic clusters of OCD, which may be indicating that a series of adaptive behaviors is evolutionarily evolving to be constantly altered, perhaps by well-determined pathophysiological mechanisms. Some aspects that have been related to some dimensions of OCD symptomatology are religion and religiosity, affecting the content of obsessions and the severity of manifestations. Properly evaluating the education background, access to health services, food, and the genetic structure of populations, using investigational instruments sensitive to these cultural elements, will increase our understanding of the importance of culture on OCD and its treatment.

**Keywords:** Culture, education, obsessive-compulsive disorder, treatment, psychosocial, compulsions, predominant, trajectory.

**Cabrera, B.,** Romero-Rebollar, C., Jiménez-Ángeles, L., Genis-Mendoza, A. D., Flores, J., Lanzagorta, N., ... Nicolini, H. (2019). Neuroanatomical features and its usefulness in classification of patients with PANDAS. *CNS Spectrums*, 24(5), 533–543. <https://doi.org/10.1017/S1092852918001268>

Los trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunes asociados a estreptococo (PANDAS) son un subtipo de trastorno obsesivo compulsivo. En este estudio evaluamos diferencias neuroanatómicas entre un grupo de catorce pacientes con PANDAS y catorce controles sanos por medio de resonancia magnética. El objetivo de este estudio fue identificar características neuroanatómicas que pudieran ser útiles como clasificadores entre pacientes con PANDAS y sujetos sanos. Como resultado, identificamos diferencias en el patrón de materia gris y blanca entre los pacientes con PANDAS y sujetos sanos, que permitieron clasificar a los pacientes con una precisión de 75% y 61%, respectivamente. Entre las estructuras que contribuyen a la correcta clasificación de los individuos se encuentran los ganglios basales, el cerebelo, la pars triangularis y la pars opercularis. Por lo que estas regiones cerebrales pudieran ser relevantes en la patología de PANDAS.

*CNS Spectrums* (2018), page 1 of 11. © Cambridge University Press 2018  
doi:10.1017/S1092852918001268

ORIGINAL RESEARCH

## Neuroanatomical features and its usefulness in classification of patients with PANDAS

Brenda Cabrera,<sup>1</sup> César Romero-Rebollar,<sup>2</sup> Luis Jiménez-Ángeles,<sup>3</sup>  
Alma D. Genis-Mendoza,<sup>1,5</sup> Julio Flores,<sup>1</sup> Nuria Lanzagorta,<sup>4</sup>  
María Arroyo,<sup>1</sup> Camilo de la Fuente-Sandoval,<sup>6</sup> Daniel Santana,<sup>4</sup>  
Verónica Medina-Bañuelos,<sup>2</sup> Emilio Sacristán,<sup>2</sup> and Humberto Nicolini<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Neuroimaging Laboratory, Department of Electrical Engineering, Autonomous Metropolitan University, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Department of Biomedical Systems, Engineering Faculty, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Genetic Medical Group, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup> Psychiatric Care Services, Child Psychiatric Hospital Dr Juan N. Navarro, Mexico City, Mexico

<sup>6</sup> National Institute of Neurology and Neurosurgery "Mansueti Velasco Suárez", Mexico City, Mexico

**Objective.** An obsessive-compulsive disorder (OCD) subtype has been associated with streptococcal infections and is called pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococci (PANDAS). The neuroanatomical characterization of subjects with this disorder is crucial for the better understanding of its pathophysiology; also, evaluation of these features as classifiers between patients and controls is relevant to determine potential biomarkers and useful in clinical diagnosis. This was the first multivariate pattern analysis (MVPA) study on an early-onset OCD subtype.

**Methods.** Fourteen pediatric patients with PANDAS were paired with 14 healthy subjects and were scanned to obtain structural magnetic resonance images (MRI). We identified neuroanatomical differences between subjects with PANDAS and healthy controls using voxel-based morphometry, diffusion tensor imaging (DTI), and surface analysis. We investigated the usefulness of these neuroanatomical differences to classify patients with PANDAS using MVPA.

**Results.** The pattern for the gray and white matter was significantly different between subjects with PANDAS and controls. Alterations emerged in the cortex, subcortex, and cerebellum. There were no significant group differences in DTI measures (fractional anisotropy, mean diffusivity, radial diffusivity, and axial diffusivity) or cortical features (thickness, sulci, volume, curvature, and gyrification). The overall accuracy of 75% was achieved using the gray matter features to classify patients with PANDAS and healthy controls.

**Conclusion.** The results of this integrative study allow a better understanding of the neural substrates in this OCD subtype, suggesting that the anatomical gray matter characteristics could have an immune origin that might be helpful in patient classification.

Received 11 March 2018; Accepted 7 August 2018

**Keywords:** PANDAS, early-onset OCD, gray matter, machine learning, MRI, multivariate pattern analysis, gaussian process classifier.

Rodríguez-López, M. L., Martínez-Magaña, J. J., **Cabrera-Mendoza, B.**, Genis-Mendoza, A. D., García-Dolores, F., López-Armenta, M., ... Nicolini, H. (2020). Exploratory analysis of genetic variants influencing molecular traits in cerebral cortex of suicide completers. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 183(1), 26–37. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32752>

Los factores genéticos han sido implicados en el comportamiento suicida. Se ha sugerido que los factores genéticos en el suicidio podrían actuar como reguladores de la expresión génica. Se ha demostrado la alteración en la expresión de genes que participan en múltiples sistemas biológicos en el cerebro suicida, por lo que es crucial identificar variantes genéticas que pudieran influir directamente en la expresión génica o en sus mecanismos reguladores, como la metilación del DNA. En este estudio identificamos variantes genéticas que pudieran regular la expresión génica o la metilación, eQTLs y mQTLs, respectivamente. Identificamos 6224 mQTLs y 2.239 eQTLs en la corteza prefrontal de individuos que murieron por suicidio. Nuestros hallazgos sugieren que las variantes genéticas pueden regular la expresión génica en la corteza prefrontal de suicidas a través de la modulación de la actividad de promotores, enhancers y la unión de factores de transcripción.

Received: 24 January 2019 | Revised: 13 May 2019 | Accepted: 9 July 2019  
DOI: 10.1002/ajmg.b.32752

ORIGINAL ARTICLE

american journal of  
medical genetics B  
Neuropsychiatric  
Genetics  
WILEY

## Exploratory analysis of genetic variants influencing molecular traits in cerebral cortex of suicide completers

Mariana L. Rodríguez-López<sup>1</sup> | José J. Martínez-Magaña<sup>1</sup> |  
Brenda Cabrera-Mendoza<sup>1</sup> | Alma D. Genis-Mendoza<sup>1,2</sup> | Fernando García-Dolores<sup>3</sup> |  
Mauro López-Armenta<sup>3</sup> | Gonzalo Flores<sup>4</sup> | Rubén A. Vázquez-Roque<sup>4</sup> |  
Humberto Nicolini<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Psychiatric Care Services, Child Psychiatric Hospital Dr. Juan N. Navarro, CDMX, Mexico

<sup>3</sup>Institute of Forensic Sciences (INCOF), CDMX, Mexico

<sup>4</sup>Neuropsychiatry Laboratory, Institute of Physiology, Metropolitan Autonomous University of Puebla, Puebla, Mexico

<sup>5</sup>Carad Medical Group, CDMX, Mexico

Correspondence  
Humberto Nicolini, National Institute of Genomic Medicine, Peñafiel Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610, Mexico City, CDMX, Mexico.  
Email: hnicolini@inmegen.gob.mx

### Abstract

Genetic factors have been implicated in suicidal behavior. It has been suggested that one of the roles of genetic factors in suicide could be represented by the effect of genetic variants on gene expression regulation. Alteration in the expression of genes participating in multiple biological systems in the suicidal brain has been demonstrated, so it is imperative to identify genetic variants that could influence gene expression or its regulatory mechanisms. In this study, we integrated DNA methylation, gene expression, and genotype data from the prefrontal cortex of suicides to identify genetic variants that could be factors in the regulation of gene expression, generally called quantitative trait locus (xQTLs). We identify 6,224 methylation quantitative trait loci and 2,239 expression quantitative trait loci (eQTLs) in the prefrontal cortex of suicide completers. The xQTLs identified influence the expression of genes involved in neurodevelopment and cell organization. Two of the eQTLs identified (rs8065311 and rs1019238) were previously associated with cannabis dependence, highlighting a candidate genetic variant for the increased suicide risk in subjects with substance use disorders. Our findings suggest that genetic variants may regulate gene expression in the prefrontal cortex of suicides through the modulation of promoter and enhancer activity, and to a lesser extent, binding transcription factors.

### KEYWORDS

cerebral cortex, expression quantitative locus, methylation quantitative locus, suicide

**Cabrera-Mendoza, B.**, Delia, A., & Nicolini, H. (2019). Diagnosis in PANDAS: An update. *Current Psychiatry Research and Reviews*, 15. <https://doi.org/10.2174/2666082215666190917161514>

En este artículo realizamos una revisión de la literatura sobre PANDAS de los últimos veinte años con el objetivo de identificar áreas haciendo hincapié en aquellas áreas cuyos avances podrían mejorar el diagnóstico de estos trastornos. Esta revisión ofrece una compilación de los estudios más importantes realizados hasta la fecha sobre la presentación clínica y los posibles marcadores biológicos de PANDAS. Además, sugerimos el refinamiento de algunos aspectos en los criterios de diagnóstico actuales, como la inclusión de síntomas específicos de PANDAS, así como biomarcadores periféricos y de neuroimagen. Futuros estudios determinarán si PANDAS requiere medidas diagnósticas y terapéuticas separadas o si debe incluirse en categorías recientemente propuestas como el Síndrome Neuropsiquiátrico Agudo Pediátrico (PANS) o el Síndrome Neuropsiquiátrico Agudo Infantil (CANS).

*Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)*

*Current Psychiatry Research and Reviews*, 2019, 15, 1-11

1

#### REVIEW ARTICLE

## Diagnosis in PANDAS: An Update

Brenda Cabrera-Mendoza<sup>a</sup>, Alma Delia Genis Mendoza<sup>a,b</sup> and Humberto Nicolini<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>*Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), CDMX, Mexico;* <sup>b</sup>*Psychiatric Care Services, Child Psychiatric Hospital Dr. Juan N Navarro, CDMX, Mexico;* <sup>c</sup>*Carracci Medical Group, CDMX, Mexico*

**Abstract: Background:** The last twenty years have seen major advancements in unraveling the etiology and the identification of biological markers of Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococci (PANDAS). However, this body of evidence has not yet been translated into a clinical setting.

**Objective:** We will review the most important studies to date on PANDAS, emphasizing those whose advances could improve the diagnosis of these disorders. We also suggest the need for updated diagnosis criteria integrating the recent findings from the hereby included studies.

**Methods:** Consulting the PubMed database, a literature review of the last twenty-one years (between 1998 and 2019) was carried out using the terms "PANDAS" and "pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders" in combination with "diagnosis" and "markers". The search resulted in 175 hits from which we selected clinical cases, original investigations, and clinical reviews.

**Results:** This review offers a compilation of the most important studies performed to date regarding the clinical presentation and potential biological markers of PANDAS. Moreover, we suggest the refinement of some aspects in the current diagnosis criteria, such as focusing on specific symptoms and the inclusion of neuroimaging and peripheral markers.

**Conclusion:** The identification of specific biological markers in PANDAS is crucial for its diagnosis and opportune treatment. Future research will determine whether PANDAS require separated diagnostic and therapeutic measures or if it should be included in recently proposed categories such as Pediatric Acute Neuropsychiatric Syndrome (PANS) or Childhood Acute Neuropsychiatric Syndrome (CANS).

**Keywords:** OCD, tics, streptococcal infection, autoimmune, early-onset OCD, diagnosis, biomarkers.

#### ARTICLE HISTORY

Received: July 28, 2019  
Revised: August 19, 2019  
Accepted: September 03, 2019

DOI:  
[10.2174/2666082215666190917161514](https://doi.org/10.2174/2666082215666190917161514)



**Cabrera-Mendoza B**, Martínez-Magaña JJ, Genis-Mendoza AD, Monroy-Jaramillo N, Walss-Bass C, Fries GR, García-Dolores F, López-Armenta M, Flores G, Vázquez-Roque RA, Nicolini H. (2020). Brain gene expression-DNA methylation correlation in suicide completers: preliminary results. *Rev Invest Clin*. Aceptado para publicación.

Se ha sugerido que las alteraciones en la expresión génica se encuentran implicadas en la patología del suicidio. Sin embargo, el estudio del efecto regulador de la metilación del DNA en la expresión génica en el cerebro de individuos que murieron por suicidio se ha restringido a unos pocos genes candidatos. El objetivo de este estudio fue identificar genes cuyos niveles de expresión están correlacionados con metilación del DNA en la corteza prefrontal de individuos que murieron por suicidio. Identificamos 22 sitios CpG cuyos niveles de metilación se correlacionaron con la expresión génica en la corteza prefrontal de suicidios. Los genes anotados en sitios CpG identificados están involucrados en el neurodesarrollo (*BBS4*, *NKX6-2*, *AXL*, *CTNND1*, *MBP*) y el metabolismo de poliaminas (*PAOX*). De esta forma, la integración de diferentes tecnologías ómicas proporcionó nuevos genes candidatos cuya expresión se encuentra alterada en el cerebro suicida y sus posibles mecanismos reguladores.

## BRAIN GENE EXPRESSION-DNA METHYLATION CORRELATION IN SUICIDE COMPLETERS: PRELIMINARY RESULTS

BRENDA CABRERA-MENDOZA<sup>1,2</sup>, JOSÉ J. MARTÍNEZ-MAGAÑA<sup>1</sup>, ALMA D. GENIS-MENDOZA<sup>1,3</sup>,  
NANCY MONROY-JARAMILLO<sup>4</sup>, CONSUELO WALSS-BASS<sup>5</sup>, GABRIEL R. FRIES<sup>5</sup>, FERNANDO GARCÍA-DOLORES<sup>6</sup>,  
MAURO LÓPEZ-ARMENTA<sup>6</sup>, GONZALO FLORES<sup>7</sup>, RUBÉN A. VÁZQUEZ-ROQUE<sup>7</sup>, HUMBERTO NICOLINI<sup>1,8\*</sup>

<sup>1</sup>Genomics of Psychiatric and Neurodegenerative Diseases Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Combined Studies Program in Medicine MD/PhD, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>Psychiatric Care Services, Hospital Psiquiátrico Infantil "Juan N. Navarro," Secretaría de Salud, Mexico City, Mexico; <sup>4</sup>Department of Genetics, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez," Mexico City, Mexico; <sup>5</sup>Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, Texas, USA; <sup>6</sup>Institute of Forensic Science, Mexico City, Mexico; <sup>7</sup>Neuropsychiatry Laboratory, Institute of Physiology, Benemérita Universidad de Puebla, Puebla, Mexico; <sup>8</sup>Grupo de Estudios Médicos y Familiares Carracci, Mexico City, Mexico

### ABSTRACT

**Background:** Gene expression alterations have been implicated in suicide pathology. However, the study of the regulatory effect of DNA methylation on gene expression in the suicidal brain has been restricted to candidate genes. **Objective:** The objective of the study was to identify genes whose expression levels are correlated with DNA methylation in the prefrontal cortex of suicides. **Methods:** Postmortem prefrontal cortex samples from 21 suicides to six non-suicides were collected. Transcriptomic and DNA methylation profiles were evaluated with microarrays; *cis* correlations between gene expression and CpG methylation were screened. We then analyzed the presence of transcription factor (TF) binding sites (TFBS) at CpG sites correlated with gene expression. Gene expression of TFs involved in neurodevelopmental binding to predicted TFBS was determined in the BrainSpan database. **Results:** We identified 22 CpG sites whose methylation levels correlated with gene expression in the prefrontal cortex of suicides. Genes annotated to identified CpG sites were involved in neurodevelopment (*BBS4*, *NKX6-2*, *AXL*, *CTNND1*, and *MBP*) and polyamine metabolism (polyamine oxidase [*PAOX*]). Such correlations were not detected in the non-suicide group. Nine TFs (*USF1*, *TBP*, *SFI*, *NRF1*, *RFX1*, *SP3*, *PKNOX1*, *MAZ*, and *POU3F2*) showed differential expression in pre- and post-natal developmental periods, according to BrainSpan database. **Conclusions:** The integration of different omic technologies provided novel candidates for the investigation of genes whose expression is altered in the suicidal brain and their potential regulatory mechanisms. (REV INVEST CLIN. 2019;72:00-00)

**Key words:** Suicide. DNA methylation. Gene expression. Cerebral cortex. Microarrays. Transcription factors. Neurodevelopment.

**Cabrera-Mendoza B**, Martínez-Magaña JJ, Genis-Mendoza AD, Sarmiento E, Ruíz-Ramos D, Tóvillo-Zarate, CA, González-Castro TB, Juárez-Rojop IE, García-de la Cruz DD, López-Armenta M, Real F, García-Dolores F, Flores G, Vazquez-Roque RA, Lanzagorta N, Escamilla M, Saucedo-Uribe E, Rodríguez-Mayoral O, Jiménez-Genchi J, Castañeda-González C, Roche-Bergua A, Nicolini H. (2020). High polygenic burden is associated with blood DNA methylation changes in individuals with suicidal behavior. *Journal of Psychiatric Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.01.008>.

En este estudio evaluamos las diferencias en la metilación del DNA de individuos con alto y bajo riesgo poligénico para conducta suicida. El estudio fue dividido en dos fases: 1) Se realizó genotipificación y cálculo del puntaje de riesgo poligénico en 568 individuos con distintas comorbilidades psiquiátricas (trastornos de la conducta alimentaria, esquizofrenia, trastorno bipolar entre otros) así como distintas categorías de conducta suicida (muerte por suicidio, intento e ideación suicida). 2) Se realizó la comparación de diferencias en la metilación del DNA de sangre periférica entre individuos con alto y bajo riesgo poligénico para conducta suicida. Identificamos 153 sitios CpG diferencialmente metilados entre individuos con alto y bajo riesgo poligénico para conducta suicida. Estos genes se encontraron relacionados predominantemente con el neurodesarrollo. Nuestros resultados sugieren que algunas variantes génicas pudieran incrementar la predisposición a variaciones en la metilación del DNA de genes que participan en el neurodesarrollo.

**Title** High polygenic burden is associated with blood DNA methylation changes in individuals with suicidal behavior

**Article type** Original article

**Abstract**

Suicidal behavior is result of the interaction of several contributors, including genetic and environmental factors. The integration of approaches considering the polygenic component of suicidal behavior, such as polygenic risk scores (PRS) and DNA methylation is promising for improving our understanding of the complex interplay between genetic and environmental factors in this behavior. The aim of this study was the evaluation of DNA methylation differences between individuals with high and low genetic burden for suicidality. The present study was divided into two phases. In the first phase, genotyping with the Psycharray chip was performed in a discovery sample of 568 Mexican individuals, of which 149 had suicidal behavior (64 individuals with suicidal ideation, 50 with suicide attempt and 35 with completed suicide). Then, a PRS analysis based on summary statistics from the Psychiatric Genomic Consortium was performed in the discovery sample. In a second phase, we evaluated DNA methylation differences between individuals with high and low genetic burden for suicidality in a sub-sample of the discovery sample (target sample) of 94 subjects. We identified 153 differentially methylated sites between individuals with low and high-PRS. Among genes mapped to differentially methylated sites, we found genes involved in neurodevelopment (CHD7, RFX4, KCNA1, PLCB1, PITX1, NUMBL) and ATP binding (KIF7, NUBP2, KIF6, ATP8B1, ATP11A, CLCN7, MYLK, MAP2K5). Our results suggest that genetic variants might increase the predisposition to epigenetic variations in genes involved in neurodevelopment. This study highlights the possible implication of polygenic burden in the alteration of epigenetic changes in suicidal behavior.

**Keywords** Suicide; DNA methylation; Genetics; Polygenic Risk Score (PRS); Multifactorial inheritance, Epigenomics

**Cabrera-Mendoza B**, Fresno C, Monroy-Jaramillo N, Fries GR, Walss-Bass C, Glahn DC, Ostrosky-Wegman P, Mendoza-Morales RC, Garcia-Dolores F, Carlos Díaz-Otañez C, González-Sáenz E, Genis-Mendoza AD, Martínez Magaña JJ, Romero-Pimentel A, Flores G, Vázquez-Roque RA, Nicolini H. (2020). Sex differences in brain gene expression among suicide completers. *Journal of Affective Disorders*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.01.167>

A pesar de que el número de hombres que mueren por suicidio es mayor que el de mujeres, las diferencias biológicas en el cerebro de hombres y mujeres suicidas han sido poco exploradas. En este estudio evaluamos las diferencias intra e intersexo en el perfil de expresión génica de la corteza prefrontal de hombres y mujeres suicidas. Al comparar el perfil de expresión génica de mujeres suicidas y no suicidas se identificaron 1729 genes diferencialmente expresados. Estos genes están relacionados con la organización de componentes celulares, la respuesta inmune y la respuesta a hormonas.

Al comparar el perfil de expresión génica de hombres suicidas y no suicidas se identificaron 1997 genes diferencialmente expresados, los cuales están relacionados principalmente con formación de vesículas. Al comparar el perfil de expresión génica entre hombres y mujeres suicidas identificamos 439 genes diferencialmente expresados, estos genes están implicados en la formación de proyecciones neuronales, así como con sinapsis GABA y glutamatérgica. Este estudio extendió hallazgos previos al evaluar patrones de expresión genética en cada sexo a nivel de transcriptoma, lo que permitió la identificación de diferencias previamente no exploradas en el cerebro de hombres y mujeres suicidas.

**Title** Sex differences in brain gene expression among suicide completers

**Article type** Research Paper

**Abstract**

Background: Suicide rates vary substantially by sex. Suicides committed by males significantly outnumber female suicides. Disparities in community and social factors provide a partial explanation for this phenomenon. Thus, the evaluation of sex differences at a biological level might contribute to the elucidation of the factors involved in this imbalance. The aim of the present study was to evaluate sex-specific gene expression patterns in the suicidal brain. Methods: Post-mortem samples from the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) of 75 Latino individuals were analyzed. We considered the following groups: i) male suicides (n=38), ii) female suicides (n=10), iii) male controls (n=20), and iv) female controls (n=7). Gene expression profiles were evaluated by microarrays. Differentially expressed genes among the groups were identified with a linear model. Similarities and differences in the gene sets between the sexes were identified. Results: Differentially expressed genes were identified between suicides and controls of each sex: 1,729 genes in females and 1,997 genes in males. Female-exclusive suicide genes were related to cell proliferation and immune response. Meanwhile, male-exclusive suicide genes were associated to DNA binding and ribonucleic protein complex. Sex-independent suicide genes showed enrichment in mitochondrial and vesicular functions. Limitations: Relatively small sample size. Our diagnosis approach was limited to information found on coroner's records. The analysis was limited to a single brain area (DLPFC) and we used microarrays. Conclusion: Previously unexplored sex differences in the brain gene expression of suicide completers were identified, providing valuable foundation for the evaluation of sex-specific factors in suicide.

**Keywords** Gender; Transcriptome; Prefrontal cortex; Microarrays; Postmortem; Suicidal.

## Referencias

- Abdalla, R. R., Miguel, A. C., Brietzke, E., Caetano, R., Laranjeira, R., & Madruga, C. S. (2019). Suicidal behavior among substance users: Data from the Second Brazilian National Alcohol and Drug Survey (Ii bnads). *Brazilian Journal of Psychiatry*, 41(5), 437–440. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2018-0054>
- Abroms, M., & Sher, L. (2016). Dual disorders and suicide. *Journal of Dual Diagnosis*, 12(2), 148-149. <https://doi.org/10.1080/15504263.2016.1172898>
- Agrawal, A., Lynskey, M. T., Bucholz, K. K., Kapoor, M., Almasry, L., Dick, D. M., ... Bierut, L. J. (2014). DSM-5 cannabis use disorder: a phenotypic and genomic perspective. *Drug and alcohol dependence*, 134, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.11.008>
- Ahearn, E. P., Jamison, K. R., Steffens, D. C., Cassidy, F., Provenzale, J. M., Lehman, A., ... Krishnan, K. R. R. (2001). MRI correlates of suicide attempt history in unipolar depression. *Biological Psychiatry*, 50(4), 266–270. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01098-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01098-8)
- Alarcón Parco, D., & Bárrig JÓ, P. S. (2015). Conductas internalizantes y externalizantes en adolescentes. *Liberabit*, 21(2), 253-259. Recuperado en 15 de enero de 2020, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-48272015000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-48272015000200008&lng=es&tlng=es).
- Almansa, R. (2013). Análisis del perfil de expresión génica en células de sangre periférica. Retrieved January 10, 2020, from EMEI website: <https://epidemiologiamolecular.com/analisis-perfil-expresion-genica-celulas-sangre-periferica/>
- Amat Rodrigo J. (2016). RPubs - Comparaciones múltiples: corrección de p-value y FDR [WWW Document], n.d. URL [https://rpubs.com/Joaquin\\_AR/236898](https://rpubs.com/Joaquin_AR/236898) (accessed 1.12.20).
- American Psychiatric Association. (2002). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-IV-TR*. Barcelona: Masson.
- American Psychiatric Association. (2013). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (5a ed.)*. Washington, DC. Arlington, VA.
- Austin, C. D., Lawrence, D. A., Peden, A. A., Varfolomeev, E. E., Totpal, K., De Maziere, A. M., ... Ashkenazi, A. (2006). Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10283–10288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604044103>

Bachmann, S. (2018). Epidemiology of suicide and the psychiatric perspective. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), 1425. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071425>

Baik, I., Cho, N. H., Kim, S. H., Han, B.-G., & Shin, C. (2011). Genome-wide association studies identify genetic loci related to alcohol consumption in Korean men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 809–816. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001776>

Balhara, Y. P. S., Kuppili, P. P., & Gupta, R. (2017). Neurobiology of comorbid substance use disorders and psychiatric disorders: Current state of evidence. *Journal of Addictions Nursing*, 28(1), 11–26. <https://doi.org/10.1097/JAN.000000000000155>

Bani-Fatemi, A., Graff, A., Zai, C., Strauss, J., & De Luca, V. (2016). GWAS analysis of suicide attempt in schizophrenia: Main genetic effect and interaction with early life trauma. *Neuroscience Letters*, 622, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.043>

Bani-Fatemi, A., Tasmim, S., Graff-Guerrero, A., Gerretsen, P., Strauss, J., Kolla, N., ... De Luca, V. (2018). Structural and functional alterations of the suicidal brain: An updated review of neuroimaging studies. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 278, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2018.05.008>

Bani-Fatemi, A., Tasmim, S., Graff-Guerrero, A., Gerretsen, P., Strauss, J., Kolla, N., ... De Luca, V. (2018). Structural and functional alterations of the suicidal brain: An updated review of neuroimaging studies. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 278, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2018.05.008>

Beautrais, A.L., Joyce, P.R., Mulder, R.T. (1996). Risk Factors for Serious Suicide Attempts among Youths Aged 13 through 24 Years. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 35(9), 1174–1182. <https://doi.org/10.1097/00004583-199609000-00015>

Beautrais, A.L., Joyce, P.R., Mulder, R.T. (1999). Personality traits and cognitive styles as risk factors for serious suicide attempts among young people. *Suicide Life Threat Behav*, 29(1), 37–47.

Beautrais, Annette L., Joyce, P. R., & Mulder, R. T. (1997). Precipitating factors and life events in serious suicide attempts among youths aged 13 through 24 years. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 36(11), 1543–1551. [https://doi.org/10.1016/S0890-8567\(09\)66563-1](https://doi.org/10.1016/S0890-8567(09)66563-1)

Beden, O., Senol, E., Atay, S., Ak, H., Altintoprak, A. E., Kiyan, G. S., ... Aydin, H. H. (2016). TPH1 A218 allele is associated with suicidal behavior in Turkish population. *Legal Medicine*, 21, 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.05.005>

Benedetti, F., Radaelli, D., Poletti, S., Locatelli, C., Falini, A., Colombo, C., et al., 2011. Opposite effects of suicidality and lithium on gray matter volumes in bipolar depression. *J. Affect. Disord.* 135(1-3), 139–147.

Ben-Efraim, Y. J., Wasserman, D., Wasserman, J., & Sokolowski, M. (2013). Family-based study of *avpr1b* association and interaction with stressful life events on depression and anxiety in suicide attempts. *Neuropsychopharmacology*, 38(8), 1504–1511. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.49>

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. Retrieved January 14, 2020, from [www.jstor.org/stable/2346101](http://www.jstor.org/stable/2346101)

Benjaminsen, S., Krarup, G., & Lauritsen, R. (1990). Personality, parental rearing behaviour and parental loss in attempted suicide: A comparative study. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 82(5), 389–397. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1990.tb01408.x>

Berchtold, N. C., Coleman, P. D., Cribbs, D. H., Rogers, J., Gillen, D. L., & Cotman, C. W. (2013). Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(6), 1653–1661. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.024>

Bertolote, J., & Fleischmann, A. (2002). A Global Perspective in the Epidemiology of Suicide. *Suicidologi*. 7. <https://doi.org/10.5617/suicidologi.2330>

Besteher, B., Wagner, G., Koch, K., Schachtzabel, C., Reichenbach, J.R., Schlösser, R., et al., 2016. Pronounced prefronto-temporal cortical thinning in schizophrenia: Neuroanatomical correlate of suicidal behavior? *Schizophr. Res.* 176(2-3), 151-157.

Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstine, J. R. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular cell*, 48(4), 491–507. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>

Blakely, T. A. (2003). Unemployment and suicide. Evidence for a causal association? *Journal of Epidemiology & Community Health*, 57(8), 594–600. <https://doi.org/10.1136/jech.57.8.594>

Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., Speed, T.P., (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19, 185–193. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.2.185>

Borges, G., & Loera, C. R. (2010). Alcohol and drug use in suicidal behaviour. *Current Opinion in Psychiatry*, 23(3), 195–204. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e3283386322>

Borges, G., Walters, E. E., & Kessler, R. C. (2000). Associations of substance use, abuse, and dependence with subsequent suicidal behavior. *American Journal of Epidemiology*, 151(8), 781–789. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010278>

Borges, G., Walters, E. E., & Kessler, R. C. (2000). Associations of substance use, abuse, and dependence with subsequent suicidal behavior. *American Journal of Epidemiology*, 151(8), 781–789. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010278>

Brahmachari, S., Fung, Y. K., & Pahan, K. (2006). Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(18), 4930–4939. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5480-05.2006>

Breault, K. (1986). Suicide in America: A Test of Durkheim's Theory of Religious and Family Integration, 1933-1980. *American Journal of Sociology*, 92(3), 628-656. Retrieved January 14, 2020, from [www.jstor.org/stable/2779918](http://www.jstor.org/stable/2779918)

Brent, D. A., & Mann, J. J. (2005). Family genetic studies, suicide, and suicidal behavior. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 133C(1), 13–24. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30042>

Brent, D. A., Melhem, N. M., Oquendo, M., Burke, A., Birmaher, B., Stanley, B., ... Mann, J. J. (2015). Familial pathways to early-onset suicide attempt: A 5.6-year prospective study. *JAMA Psychiatry*, 72(2), 160–168. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.2141>

Brent, D. A., Oquendo, M., Birmaher, B., Greenhill, L., Kolko, D., Stanley, B., ... Mann, J. J. (2003). Peripubertal suicide attempts in offspring of suicide attempters with siblings concordant for suicidal behavior. *The American Journal of Psychiatry*, 160(8), 1486–1493. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.8.1486>

Brezo, J., Bureau, A., Mérette, C., Jomphe, V., Barker, E. D., Vitaro, F., ... Turecki, G. (2010). Differences and similarities in the serotonergic diathesis for suicide attempts and mood disorders: A 22-year longitudinal gene-environment study. *Molecular Psychiatry*, 15(8), 831–843. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.19>

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(3), 180–206. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2005.00702.x>

Brezo, J., Paris, J., Vitaro, F., Hébert, M., Tremblay, R. E., & Turecki, G. (2008). Predicting suicide attempts in young adults with histories of childhood abuse. *British Journal of Psychiatry*, 193(02), 134–139. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.037994>

Brown, G. K., Beck, A. T., Steer, R. A., & Grisham, J. R. (2000). Risk factors for suicide in psychiatric outpatients: A 20-year prospective study. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 68(3), 371–377.

Budnik, V., Ruiz-Cañada, C., & Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, 17(3), 160–172. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.29>

Cao, J., Chen, X., Chen, J., Ai, M., Gan, Y., Wang, W., et al., 2016. Resting-state functional MRI of abnormal baseline brain activity in young depressed patients with and without suicidal behavior. *J. Affect. Disord.* 205, 252-263

Carrà, G., Johnson, S., Bebbington, P., Angermeyer, M. C., Heider, D., Brugha, T., ... Toumi, M. (2012). The lifetime and past-year prevalence of dual diagnosis in people with schizophrenia across Europe: findings from the European Schizophrenia Cohort (EuroSC). *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 262(7), 607–616. <https://doi.org/10.1007/s00406-012-0305-z>

Center for Substance Abuse Treatment. (2005). Substance abuse treatment for persons with co-occurring disorders. Treatment improvement protocol (TIP) series 42. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

Chambers R. A. (2013). Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug and alcohol dependence*, 130(1-3), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.12.005>

Chambers, R. A., McClintick, J. N., Sentir, A. M., Berg, S. A., Runyan, M., Choi, K. H., & Edenberg, H. J. (2013). Cortical-striatal gene expression in neonatal hippocampal lesion (NVHL)-amplified cocaine sensitization. *Genes, brain, and behavior*, 12(5), 564–575. <https://doi.org/10.1111/gbb.12051>

Chandler, L. J., Newsom, H., Sumners, C., & Crews, F. (1993). Chronic ethanol exposure potentiates nmda excitotoxicity in cerebral cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 60(4), 1578–1581. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03326.x>

Chang, Q., Yip, P. S. F., & Chen, Y.-Y. (2019). Gender inequality and suicide gender ratios in the world. *Journal of Affective Disorders*, 243, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.09.032>



Checa Rojas, A. (2017). Método: Gel de electroforesis Agarosa. 2020, Enero 11, Conogasi.org Sitio web: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>

Cheek, S. M., Goldston, D. B., Erkanli, A., Massing-Schaffer, M., & Liu, R. T. (2020). Social rejection and suicidal ideation and attempts among adolescents following hospitalization: A prospective study. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 48(1), 123–133. <https://doi.org/10.1007/s10802-019-00580-z>

Cheng, R., Juo, S. H., Loth, J. E., Nee, J., Iossifov, I., Blumenthal, R., ... Baron, M. (2006). Genome-wide linkage scan in a large bipolar disorder sample from the National Institute of Mental Health genetics initiative suggests putative loci for bipolar disorder, psychosis, suicide, and panic disorder. *Molecular Psychiatry*, 11(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001778>

Cheriyedath, S. (2017). Modificación de la histona. (2017, February 2). Retrieved January 18, 2020, from News-Medical.net website: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Histone-Modification-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Histone-Modification-(Spanish).aspx)

Chioqueta, A. P., & Stiles, T. C. (2007). The relationship between psychological buffers, hopelessness, and suicidal ideation: Identification of protective factors. *Crisis*, 28(2), 67–73. <https://doi.org/10.1027/0227-5910.28.2.67>

Cho, S.-E., Na, K.-S., Cho, S.-J., Im, J.-S., & Kang, S.-G. (2016). Geographical and temporal variations in the prevalence of mental disorders in suicide: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 190, 704–713. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.11.008>.

Choi, K., Le, T., Xing, G., Johnson, L. R., & Ursano, R. J. (2011). Analysis of kinase gene expression in the frontal cortex of suicide victims: implications of fear and stress. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 46. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00046>

Choudary, P. V., Molnar, M., Evans, S. J., Tomita, H., Li, J. Z., Vawter, M. P., ... 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), 15653–15658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507901102>

Choudary, P. V., Molnar, M., Evans, S. J., Tomita, H., Li, J. Z., Vawter, M. P., ... 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), 15653–15658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507901102>

Clarke, T. K., Adams, M. J., Davies, G., Howard, D. M., Hall, L. S., Padmanabhan, S., ... McIntosh, A. M. (2017). Genome-wide association study of alcohol consumption

and genetic overlap with other health-related traits in UK Biobank (N=112 117). *Molecular psychiatry*, 22(10), 1376–1384. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.153>

Cobb, S. (1976). Social support as a moderator of life stress. *Psychosomatic Medicine*, 38(5), 300–314. <https://doi.org/10.1097/00006842-197609000-00003>

Cold Spring Harbor Protoc.(2006). EDTA. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec8030>

Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2015). Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Seminars in cell & developmental biology*, 40, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.007>

Cook, C. C. H. (2014). Suicide and religion. *British Journal of Psychiatry*, 204(4), 254–255. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.113.136069>

Coon, H., Darlington, T. M., DiBlasi, E., Callor, W. B., Ferris, E., Fraser, A., ... Gray, D. (2018). Genome-wide significant regions in 43 Utah high-risk families implicate multiple genes involved in risk for completed suicide. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0282-3>

Cooper, J., Appleby, L., & Amos, T. (2002). Life events preceding suicide by young people. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology: The International Journal for Research in Social and Genetic Epidemiology and Mental Health Services*, 37(6), 271–275. <https://doi.org/10.1007/s001270200019>

Cornett, C.E. (1983). What you should know about teaching and learning styles. Bloomington : Phi Delta Kappa Educational Foundation

Costa, V., Esposito, R., Aprile, M., & Ciccodicola, A. (2012). Non-coding RNA and pseudogenes in neurodegenerative diseases: "The (un)Usual Suspects". *Frontiers in genetics*, 3, 231. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00231>

Crosby, A.E., Ortega, L., Melanson, C. (2011). Self-directed Violence Surveillance: Uniform Definitions and Recommended Data Elements, Version 1.0. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control

Cupina, D. (2009). Life events, gender and suicidal behaviours in the acute community setting. *Australasian Psychiatry*, 17(3), 233–236. <https://doi.org/10.1080/10398560802680746>

Dalton, E. J., Cate–Carter, T. D., Mundo, E., Parikh, S. V., & Kennedy, J. L. (2003). Suicide risk in bipolar patients: The role of comorbid substance use disorders. *Bipolar Disorders*, 5(1), 58–61. <https://doi.org/10.1034/j.1399-5618.2003.00017.x>

Database of cell signaling and virtual Journal | science signaling. (n.d.). Retrieved January 16, 2020, from <https://stke.sciencemag.org/about/help/cm>

Daube, D. (1972). The Linguistics of Suicide. *Philosophy & Public Affairs*, 1(4), 387-437. Retrieved January 15, 2020, from [www.jstor.org/stable/2265099](http://www.jstor.org/stable/2265099)

David Klonsky, E., Kotov, R., Bakst, S., Rabinowitz, J., & Bromet, E. J. (2012). Hopelessness as a predictor of attempted suicide among first admission patients with psychosis: a 10-year cohort study. *Suicide & life-threatening behavior*, 42(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1943-278X.2011.00066.x>

de la Torre, M.(2017). Introducción a la epigenética, nuevo paradigma en nefrología. *Nefrología*. 9(1), 1-10. <https://www.revistanefrologia.com/es-introduccion-epigenetica-nuevo-paradigma-nefrologia-articulo-X1888970017612260>

Degenhardt, L., Charlson, F., Ferrari, A., Santomauro, D., Erskine, H., Mantilla-Herrera, A., ... Vos, T. (2018). The global burden of disease attributable to alcohol and drug use in 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Psychiatry*. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(18\)30337-7](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(18)30337-7)

Devaraju, P., & Zakharenko, S. S. (2017). Mitochondria in complex psychiatric disorders: Lessons from mouse models of 22q11.2 deletion syndrome: Hemizygous deletion of several mitochondrial genes in the 22q11.2 genomic region can lead to symptoms associated with neuropsychiatric disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 39(2), 10.1002/bies.201600177. <https://doi.org/10.1002/bies.201600177>

Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., ... & Fiñana, I. T. (2000). Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Universidad de Córdoba.[En línea] España.[Fecha de acceso: 15 de mayo de 2014] Disponible en URL: [http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf).

DiazGranados, N., Ibrahim, L. A., Brutsche, N. E., Ameli, R., Henter, I. D., Luckenbaugh, D. A., ... Zarate, C. A., Jr (2010). Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *The Journal of clinical psychiatry*, 71(12), 1605–1611. <https://doi.org/10.4088/JCP.09m05327blu>

Ding, Y., Lawrence, N., Olié, E., Cyprien, F., le Bars, E., Bonafé, A., et al., 2015. Prefrontal cortex markers of suicidal vulnerability in mood disorders: a model-based structural neuroimaging study with a translational perspective. *Transl. Psychiatry* 5, e516

Docherty, A., Shabalin, A., DiBlasi, E., Bacanu, S., & Coon, H. (2019). 69 genome-wide analysis of suicide death and polygenic prediction of premorbid clinical

diagnoses. *European Neuropsychopharmacology*, 29, S98.  
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.07.210>

Docherty, L. E., Rezwan, F. I., Poole, R. L., Jagoe, H., Lake, H., Lockett, G. A., Arshad, H., Wilson, D. I., Holloway, J. W., Temple, I. K., & Mackay, D. J. (2014). Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes. *Journal of medical genetics*, 51(4), 229–238. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102116>

Dombrovski, A.Y., Siegle, G.J., Szanto, K., Clark, L., Reynolds, C.F., Aizenstein, H., 2012. The temptation of suicide: striatal gray matter, discounting delayed rewards, and suicide attempts in late-life depression. *Psychol. Med.* 42, 1203-1215

Dombrovski, A.Y., Szanto, K., Clark, L., Reynolds, C.F., Siegle, G.J., 2013. Reward signals, attempted suicide, and impulsivity in late-life depression. *J.A.M.A.Psychiatry*70(10), 1020–1030.  
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.75>

Dunn, R. & Dunn, K. (1978). *Teaching Students through their Learning Styles*. Englewood Cliffs: PrenticeHall.

Dunning, M., Lynch, A., Eldridge, M. (2015). *illuminaHumanv4.db: Illumina HumanHT12v4 annotation data (chip illuminaHumanv4)*. R package version 1.26.0

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457–463.  
<https://doi.org/10.1038/nature02625>

Ehrlich, S., Breeze, J. L., Hesdorffer, D. C., Noam, G. G., Hong, X., Alban, R. L., ... Renshaw, P. F. (2005). White matter hyperintensities and their association with suicidality in depressed young adults. *Journal of Affective Disorders*, 86(2–3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2005.01.007>

Ehrlich, S., Noam, G. G., Lyoo, I. K., Kwon, B. J., Clark, M. A., & Renshaw, P. F. (2004). White matter hyperintensities and their associations with suicidality in psychiatrically hospitalized children and adolescents. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 43(6), 770–776.  
<https://doi.org/10.1097/01.chi.0000120020.48166.93>

Epicentre (2013). TargetAmp™- Nano Labeling Kit for Illumina® Expression BeadChip®. <https://www2.le.ac.uk/colleges/medbiopsych/facilities-and-services/cbs/nucleus/files-for-download/targetamp-nano-labeling-kit-for-illumina-expression-beadchip.pdf>

Erlangsen, A., Appadurai, V., Wang, Y., Turecki, G., Mors, O., Werge, T., ... Agerbo, E. (2018). Genetics of suicide attempts in individuals with and without mental disorders: A population-based genome-wide association study. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0218-y>

Ernst, C., Deleva, V., Deng, X., Sequeira, A., Pomarenski, A., Klempan, T., ... Turecki, G. (2009). Alternative splicing, methylation state, and expression profile of tropomyosin-related kinase B in the frontal cortex of suicide completers. *Archives of General Psychiatry*, 66(1), 22–32. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.66.1.22>

Ernst, C., Lalovic, A., Lesage, A., Seguin, M., Tousignant, M., & Turecki, G. (2004). Suicide and no axis I psychopathology. *BMC Psychiatry*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-4-7>

Ernst, C., Nagy, C., Kim, S., Yang, J. P., Deng, X., Hellstrom, I. C., ... Turecki, G. (2011). Dysfunction of astrocyte connexins 30 and 43 in dorsal lateral prefrontal cortex of suicide completers. *Biological Psychiatry*, 70(4), 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.03.038>

Fan, T., Wu, X., Yao, L., Dong, J., 2013. Abnormal baseline brain activity in suicidal and non-suicidal patients with major depressive disorder. *Neurosci. Lett.* 534, 35–40

Fanous, A. H., Prescott, C. A., & Kendler, K. S. (2004). The prediction of thoughts of death or self-harm in a population-based sample of female twins. *Psychological Medicine*, 34(2), 301–312. <https://doi.org/10.1017/s0033291703008857>

Farmer, A., Redman, K., Harris, T., Webb, R., Mahmood, A., Sadler, S., & McGuffin, P. (2001). The Cardiff sib-pair study: Suicidal ideation in depressed and healthy subjects and their siblings. *Crisis*, 22(2), 71–73. <https://doi.org/10.1027//0227-5910.22.2.71>

Farrell, R. E. (2010). RNA Isolation Strategies. *RNA Methodologies*, 45–80. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374727-3.00002-4>

Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. México D.F.: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 27.

Fiori, L. M., & Turecki, G. (2009). Association of the SAT1 in/del polymorphism with suicide completion. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 9999B, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31040>

Fiori, L. M., & Turecki, G. (2010). Gene expression profiling of suicide completers. *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists*, 25(5), 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2009.12.013>

- Fiori, L. M., & Turecki, G. (2011). Epigenetic regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase (Sat1) in suicide. *Journal of Psychiatric Research*, 45(9), 1229–1235. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.03.015>
- Fiori, L. M., Bureau, A., Labbe, A., Croteau, J., Noël, S., Mérette, C., & Turecki, G. (2011). Global gene expression profiling of the polyamine system in suicide completers. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(5), 595–605. <https://doi.org/10.1017/S1461145710001574>
- 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. <https://doi.org/10.1037/0002-9432.75.4.676>
- Fries, G.R., Lima, C.N.C., Valvassori, S.S., Zunta-Soares, G., Soares, J.C., Quevedo, J., (2019). Preliminary investigation of peripheral extracellular vesicles' microRNAs in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 255:10-14. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.05.020>.
- Fries, G.R., Quevedo, J., (2018). Exosomal MicroRNAs as Potential Biomarkers in Neuropsychiatric Disorders. *Methods Mol Biol.* 1733, 79-85. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7601-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7601-0_6).
- Fudalej, S., Ilgen, M., Fudalej, M., Kostrzewa, G., Barry, K., Wojnar, M., ... Ploski, R. (2010). Association between tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphism and completed suicide. *Suicide and Life-Threatening Behavior*, 40(6), 553–560. <https://doi.org/10.1521/suli.2010.40.6.553>
- Fukutake, M., Hishimoto, A., Nishiguchi, N., Nushida, H., Ueno, Y., Shirakawa, O., & Maeda, K. (2008). Association of  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor gene polymorphism with susceptibility to suicide in Japanese females. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(6), 1428–1433. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.02.003>
- Furczyk, K., Schutová, B., Michel, T. M., Thome, J., & Büttner, A. (2013). The neurobiology of suicide - A Review of post-mortem studies. *Journal of molecular psychiatry*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-2>
- Galfalvy, H., Haghghi, F., Hodgkinson, C., Goldman, D., Oquendo, M. A., Burke, A., ... Mann, J. J. (2015). A genome-wide association study of suicidal behavior. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 168(7), 557–563. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32330>

Galfalvy, H., Huang, Y. Y., Oquendo, M. A., Currier, D., & Mann, J. J. (2009). Increased risk of suicide attempt in mood disorders and TPH1 genotype. *Journal of affective disorders*, 115(3), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.09.019>

Galfalvy, H., Zalsman, G., Huang, Y. Y., Murphy, L., Rosoklija, G., Dwork, A. J., ... Mann, J. J. (2013). A pilot genome wide association and gene expression array study of suicide with and without major depression. *The world Journal of biological psychiatry : the official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 14(8), 574–582. <https://doi.org/10.3109/15622975.2011.597875>

Galfalvy, H., Zalsman, G., Huang, Y. Y., Murphy, L., Rosoklija, G., Dwork, A. J., ... Mann, J. J. (2013). A pilot genome wide association and gene expression array study of suicide with and without major depression. *The world Journal of biological psychiatry : the official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 14(8), 574–582. <https://doi.org/10.3109/15622975.2011.597875>

García R, Ayala PA, Perdomo SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud* 2012; 10 (1):59-71

Genis-Mendoza, A. D., López-Narvaez, M. L., Tovilla-Zárate, C. A., Sarmiento, E., Chavez, A., Martínez-Magaña, J. J., ... Nicolini, H. (2017). Association between polymorphisms of the drd2 and ankk1 genes and suicide attempt: A preliminary case-control study in a mexican population. *Neuropsychobiology*, 76(4), 193–198. <https://doi.org/10.1159/000490071>

Giakoumatos, C.I., Tandon, N., Shah, J., Mathew, I.T., Brady, R.O., Clementz, B.A., et al., 2013. Are structural brain abnormalities associated with suicidal behaviour in patients with psychotic disorders. *J. Psychiatr. Res.* 47, 1389-1395.

Giegling, I., Hartmann, A. M., Möller, H.-J., & Rujescu, D. (2006). Anger- and aggression-related traits are associated with polymorphisms in the 5-HT-2A gene. *Journal of Affective Disorders*, 96(1–2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.05.016>

Goh, W. W. B., Wang, W., & Wong, L. (2017). Why batch effects matter in omics data, and how to avoid them. *Trends in Biotechnology*, 35(6), 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.02.012>

Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(11), 652–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3119>

Goldston, D. B., Daniel, S., Reboussin, D. M., Kelley, A., levers, C., & Brunstetter, R. (1996). First-time suicide attempters, repeat attempters, and previous attempters on

an adolescent inpatient psychiatry unit. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 35(5), 631–639. <https://doi.org/10.1097/00004583-199605000-00018>

González-Castro, T. B., Martínez-Magaña, J. J., Tovilla-Zárate, C. A., Juárez-Rojop, I. E., Sarmiento, E., Genis-Mendoza, A. D., & Nicolini, H. (2019). Gene-level genome-wide association analysis of suicide attempt, a preliminary study in a psychiatric Mexican population. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(12). <https://doi.org/10.1002/mgg3.983>

González-Castro, T. B., Tovilla-Zárate, C. A., Juárez-Rojop, I., Pool García, S., Genis, A., Nicolini, H., & López Narváez, L. (2013a). Association of 5HTR1A gene variants with suicidal behavior: Case-control study and updated meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research*, 47(11), 1665–1672. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.04.011>

González-Castro, T. B., Tovilla-Zárate, C., Juárez-Rojop, I., Pool García, S., Velázquez-Sánchez, M. P., Genis, A., ... López Narváez, L. (2013b). Association of the 5HTR2A gene with suicidal behavior: case-control study and updated meta-analysis. *BMC psychiatry*, 13, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-13-25>

Goodwani, S., Saternos, H., Alasmari, F., & Sari, Y. (2017). Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 77, 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.02.024>

Gotttries, C. G., Orelund, L., Wiberg, Å., & Winblad, B. (1975). LOWERED MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN BRAINS FROM ALCOHOLIC SUICIDES. *Journal of Neurochemistry*, 25(5), 667–673. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb04386.x>

Gross, J. A., Bureau, A., Croteau, J., Galfalvy, H., Oquendo, M. A., Haghghi, F., ... Turecki, G. (2015). A genome-wide copy number variant study of suicidal behavior. *PLOS ONE*, 10(5), e0128369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128369>

Gross, J. A., Fiori, L. M., Labonté, B., Lopez, J. P., & Turecki, G. (2013). Effects of promoter methylation on increased expression of polyamine biosynthetic genes in suicide. *Journal of psychiatric research*, 47(4), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.11.016>

Guerri, C., Bazinet, A., & Riley, E. P. (2009). Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 44(2), 108–114. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn105>



Guintivano, J., Brown, T., Newcomer, A., Jones, M., Cox, O., Maher, B. S., ... Kaminsky, Z. A. (2014). Identification and replication of a combined epigenetic and genetic biomarker predicting suicide and suicidal behaviors. *American Journal of Psychiatry*, 171(12), 1287–1296. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.14010008>

Gwadry, F. G., Sequeira, A., Hoke, G., Ffrench-Mullen, J. M. H., & Turecki, G. (2005). Molecular characterization of suicide by microarray analysis. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 133C(1), 48–56. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30046>

Haghighi, F., Xin, Y., Chanrion, B., O'Donnell, A. H., Ge, Y., Dwork, A. J., ... Mann, J. J. (2014). Increased DNA methylation in the suicide brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), 430–438.

Hancock, D. B., Guo, Y., Reginsson, G. W., Gaddis, N. C., Lutz, S. M., Sherva, R., ... Johnson, E. O. (2018). Genome-wide association study across European and African American ancestries identifies a SNP in DNMT3B contributing to nicotine dependence. *Molecular Psychiatry*, 23(9), 1911–1919. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.193>

Hancock, D. B., Markunas, C. A., Bierut, L. J., & Johnson, E. O. (2018). Human Genetics of Addiction: New Insights and Future Directions. *Current psychiatry reports*, 20(2), 8. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0873-3>

Hancock, D. B., Reginsson, G. W., Gaddis, N. C., Chen, X., Saccone, N. L., Lutz, S. M., ... Stefansson, K. (2015). Genome-wide meta-analysis reveals common splice site acceptor variant in CHRNA4 associated with nicotine dependence. *Translational psychiatry*, 5(10), e651. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.149>

Harper, C., Dixon, G., Sheedy, D., & Garrick, T. (2003). Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the new south wales tissue resource centre. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27(6), 951–961. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00155-6)

Hart, A. B., Engelhardt, B. E., Wardle, M. C., Sokoloff, G., Stephens, M., de Wit, H., & Palmer, A. A. (2012). Genome-wide association study of d-amphetamine response in healthy volunteers identifies putative associations, including cadherin 13 (CDH13). *PloS one*, 7(8), e42646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042646>

Hasin, D. S., O'Brien, C. P., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Budney, A., ... Grant, B. F. (2013). DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *The American journal of psychiatry*, 170(8), 834–851. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.12060782>

Have, M. ten, de Graaf, R., van Dorsselaer, S., Verdurmen, J., van't Land, H., Vollebergh, W., & Beekman, A. (2009). Incidence and course of suicidal ideation and

suicide attempts in the general population. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 54(12), 824–833. <https://doi.org/10.1177/070674370905401205>

Hawton, K., & van Heeringen, K. (2009). Suicide. *Lancet* (London, England), 373(9672), 1372–1381. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60372-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60372-X)

Hawton, K., Agerbo, E., Simkin, S., Platt, B., & Mellanby, R. J. (2011). Risk of suicide in medical and related occupational groups: A national study based on Danish case population-based registers. *Journal of Affective Disorders*, 134(1–3), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.05.044>

Heeringen, K. van. (2002). *Understanding suicidal behaviour: The suicidal process approach to research, treatment and prevention*. Chichester: Wiley.

Heinze, G., Wallisch, C., & Dunkler, D. (2018). Variable selection - A review and recommendations for the practicing statistician. *Biometrical journal. Biometrische Zeitschrift*, 60(3), 431–449. <https://doi.org/10.1002/bimj.201700067>

Hercher, C., Parent, M., Flores, C., Canetti, L., Turecki, G., & Mechawar, N. (2009). Alcohol dependence-related increase of glial cell density in the anterior cingulate cortex of suicide completers. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 34(4), 281–288.

Hesselbrock, V., Dick, D., Hesselbrock, M., Foroud, T., Schuckit, M., Edenberg, H., ... Nurnberger, J. I. (2004). The search for genetic risk factors associated with suicidal behavior. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 28(5 Suppl), 70S-76S. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000127416.92128.b0>

Hoel, E. P., Albantakis, L., Cirelli, C., & Tononi, G. (2016). Synaptic refinement during development and its effect on slow-wave activity: a computational study. *Journal of neurophysiology*, 115(4), 2199–2213. <https://doi.org/10.1152/jn.00812.2015>

Hong, G., Zhang, W., Li, H., Shen, X., & Guo, Z. (2013). Separate enrichment analysis of pathways for up- and downregulated genes. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(92), 20130950. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0950>

Hosack, D. A., Dennis, G., Jr, Sherman, B. T., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003). Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome biology*, 4(10), R70. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-10-r70>

Hu, J., He, X. (2007). Enhanced Quantile Normalization of Microarray Data to Reduce Loss of Information in Gene Expression Profiles. *Biometrics*, 63, 50–59. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2006.00670.x>

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, 37(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

Huang, D., Sherman, B. T., Tan, Q., Collins, J. R., Alvord, W. G., Roayaei, J., ... Lempicki, R. A. (2007). The DAVID Gene Functional Classification Tool: A novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biology*, 8(9), R183. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r183>

Huang, T.-L., & Lee, C.-T. (2007). Associations between brain-derived neurotrophic factor G196A gene polymorphism and clinical phenotypes in schizophrenia patients. *Chang Gung Medical Journal*, 30(5), 408–413.

Hung, C.-F., Lung, F.-W., Chen, C.-H., O’Nions, E., Hung, T.-H., Chong, M.-Y., ... Lin, P.-Y. (2011). Association between suicide attempt and a tri-allelic functional polymorphism in serotonin transporter gene promoter in Chinese patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 504(3), 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.09.036>

Hwang, J.P., Lee, T.W., Tsai, S.J., Chen, T.J., Yang, C.H., Lirng, J.F., et al., 2010. Cortical and subcortical abnormalities in late-onset depression with history of suicide attempts investigated with MRI and voxel-based morphometry. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23, 171-184

Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(4), e324–e324. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>

Iga, J.-I., Ueno, S.-I., Yamauchi, K., Numata, S., Tayoshi-Shibuya, S., Kinouchi, S., ... Ohmori, T. (2007). The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with psychotic feature and suicidal behavior in Japanese major depressive patients. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 144B(8), 1003–1006. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30520>

Ikeda, M., Okahisa, Y., Aleksic, B., Won, M., Kondo, N., Naruse, N., ... Iwata, N. (2013). Evidence for shared genetic risk between methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(10), 1864–1870. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.94>

Ilgin, C., & Topuzoğlu, A. (2018). Extracellular Vesicles in Psychiatry Research in the Context of RDoC Criteria. *Psychiatry investigation*, 15(11), 1011–1018. <https://doi.org/10.30773/pi.2018.09.17>

INEGI. (2019). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL PARA LA PREVENCIÓN DEL SUICIDIO (10 DE SEPTIEMBRE).

Johann, M., Putzhammer, A., Eichhammer, P., & Wodarz, N. (2005). Association of the -141C Del variant of the dopamine D2 receptor (Drd2) with positive family history and suicidality in German alcoholics. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 132B(1), 46–49. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30085>

Johansson, S., Ekström, T. J., Marinova, Z., Okvist, A., Sheedy, D., Garrick, T., ... Bakalkin, G. (2009). Dysregulation of cell death machinery in the prefrontal cortex of human alcoholics. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(1), 109–115. <https://doi.org/10.1017/S1461145708009589>

Jollant, F., Lawrence, N. L., Olié, E., Guillaume, S., & Courtet, P. (2011). The suicidal mind and brain: A review of neuropsychological and neuroimaging studies. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 12(5), 319–339. <https://doi.org/10.3109/15622975.2011.556200>

Jollant, F., Lawrence, N.S., Giampietro, V., Brammer, M.J., Fullana, M.A., Drapier, D., et al., 2008. Orbitofrontal cortex response to angry faces in men with histories of suicide attempts. *Am. J. Psychiatry* 165, 740-748.

Jollant, F., Lawrence, N.S., Olie, E., O'Daly, O., Malafosse, A., Courtet, P., et al., 2010. Decreased activation of lateral orbitofrontal cortex during risky choices under uncertainty is associated with disadvantageous decision-making and suicidal behaviour. *Neuroimage* 51, 1275-1281.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 3, 415–428. <https://doi.org/10.1038/nrg816>

Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13, 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>

Jorgenson, E., Thai, K. K., Hoffmann, T. J., Sakoda, L. C., Kvale, M. N., Banda, Y., ... Choquet, H. (2017). Genetic contributors to variation in alcohol consumption vary by race/ethnicity in a large multi-ethnic genome-wide association study. *Molecular psychiatry*, 22(9), 1359–1367. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.101>

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

Karnoub, A.E. & Der, C.J. (2013). Rho Family GTPases and Cellular Transformation. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6594/>

Karunakaran, I., & van Echten-Deckert, G. (2017). Sphingosine 1-phosphate—A double edged sword in the brain. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1859(9 Pt B), 1573–1582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.008>

Kashem, M. A., Sultana, N., Pow, D. V., & Balcar, V. J. (2019). GLAST (GLutamate and ASpartate Transporter) in human prefrontal cortex; interactome in healthy brains and the expression of GLAST in brains of chronic alcoholics. *Neurochemistry Internacional*, 125, 111–116. <https://doi.org/10.1016>

Ke, L., Qi, Z. Y., Ping, Y., & Ren, C. Y. (2006). Effect of SNP at position 40237 in exon 7 of the TPH2 gene on susceptibility to suicide. *Brain Research*, 1122(1), 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.007>

Keller, S., Sarchiapone, M., Zarrilli, F., Tomaiuolo, R., Carli, V., Angrisano, T., ... Chiariotti, L. (2011). TrkB gene expression and DNA methylation state in Wernicke area does not associate with suicidal behavior. *Journal of Affective Disorders*, 135(1–3), 400–404. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.07.003>

Kelly, T. M., & Daley, D. C. (2013). Integrated treatment of substance use and psychiatric disorders. *Social work in public health*, 28(3-4), 388–406. <https://doi.org/10.1080/19371918.2013.774673>

Kessler, R. C., Nelson, C. B., McGonagle, K. A., Edlund, M. J., Frank, R. G., & Leaf, P. J. (1996). The epidemiology of co-occurring addictive and mental disorders: Implications for prevention and service utilization. *American Journal of Orthopsychiatry*, 66(1), 17–31. <https://doi.org/10.1037/h0080151>

Khan Academy. (2018). Gel Electrophoresis [online] available at <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-DNA-technology/DNA-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>

Kim, B., Kim, C. Y., Hong, J. P., Kim, S. Y., Lee, C., & Joo, Y. H. (2008). Brain-derived neurotrophic factor val/met polymorphism and bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 58(2), 97–103. <https://doi.org/10.1159/000162356>

Kim, S., Choi, K. H., Baykiz, A. F., & Gershenfeld, H. K. (2007). Suicide candidate genes associated with bipolar disorder and schizophrenia: an exploratory gene expression profiling analysis of post-mortem prefrontal cortex. *BMC genomics*, 8, 413. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-413>

Kimelberg, H. K., & Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics : the Journal of the American Society for*

Kleiman, E. M., & Liu, R. T. (2013). Social support as a protective factor in suicide: Findings from two nationally representative samples. *Journal of Affective Disorders*, 150(2), 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.01.033>

Kleiman, E. M., Riskind, J. H., Schaefer, K. E., & Weingarden, H. (2012). The Moderating Role of Social Support on the Relationship Between Impulsivity and Suicide Risk. *Crisis*, 33(5), 273–279. <https://doi.org/10.1027/0227-5910/a000136>

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(2), 175–189. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002110>

Koenig, H. G., McCullough, M. E., & Larson, D. B. (2001). *Handbook of religion and health*. Oxford ; New York: Oxford University Press.

Kohli, M. A., Salyakina, D., Pfennig, A., Lucae, S., Horstmann, S., Menke, A., ... Binder, E. B. (2010). Association of genetic variants in the neurotrophic receptor–encoding gene *ntrk2* and a lifetime history of suicide attempts in depressed patients. *Archives of General Psychiatry*, 67(4), 348. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.201>

Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278(5335), 52-58

Koob, G. F., & Le Moal, M. (2006). *Neurobiology of addiction*. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press.

Kposowa A. J. (2000). Marital status and suicide in the National Longitudinal Mortality Study. *Journal of epidemiology and community health*, 54(4), 254–261. <https://doi.org/10.1136/jech.54.4.254>

Kposowa, A., Breault, K., & Singh, G. (1995). White Male Suicide in the United States: A Multivariate Individual-Level Analysis. *Social Forces*, 74(1), 315-325. <https://doi.org/10.2307/2580634>

Krämer, A., Green, J., Pollard, J., Jr, & Tugendreich, S. (2014). Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(4), 523–530. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt703>

Kumada, T., Jiang, Y., Cameron, D. B., & Komuro, H. (2007). How does alcohol impair neuronal migration?. *Journal of neuroscience research*, 85(3), 465–470. <https://doi.org/10.1002/jnr.21149>

Kumar, U., Pradhan, R.K. (2003). Correlates of suicide ideation: a factor analytic study. *Soc Sci Int*, 19:36–43

Kuo, W.-H., Gallo, Joseph J., & Eaton, William W. (2004). Hopelessness, depression, substance disorder, and suicidality: A 13-year community-based study. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 39(6). <https://doi.org/10.1007/s00127-004-0775-z>

Labonté, B., & Turecki, G. (2010). The epigenetics of suicide: Explaining the biological effects of early life environmental adversity. *Archives of Suicide Research: Official Journal of the International Academy for Suicide Research*, 14(4), 291–310. <https://doi.org/10.1080/13811118.2010.524025>

Labonté, B., Suderman, M., Maussion, G., Navaro, L., Yerko, V., Mahar, I., ... Turecki, G. (2012). Genome-wide epigenetic regulation by early-life trauma. *Archives of general psychiatry*, 69(7), 722–731. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.2287>

Laje, G., Allen, A. S., Akula, N., Manji, H., John Rush, A., & McMahon, F. J. (2009). Genome-wide association study of suicidal ideation emerging during citalopram treatment of depressed outpatients. *Pharmacogenetics and genomics*, 19(9), 666–674. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32832e4bcd>

Lalovic, A., Klempan, T., Sequeira, A., Luheshi, G., & Turecki, G. (2010). Altered expression of lipid metabolism and immune response genes in the frontal cortex of suicide completers. *Journal of Affective Disorders*, 120(1–3), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2009.04.007>

Lawrence, R. E., Brent, D., Mann, J. J., Burke, A. K., Grunebaum, M. F., Galfalvy, H. C., & Oquendo, M. A. (2016). Religion as a Risk Factor for Suicide Attempt and Suicide Ideation Among Depressed Patients. *The Journal of nervous and mental disease*, 204(11), 845–850. <https://doi.org/10.1097/NMD.0000000000000484>

Lawrence, R. E., Oquendo, M. A., & Stanley, B. (2016). Religion and suicide risk: A systematic review. *Archives of Suicide Research*, 20(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/13811118.2015.1004494>

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (62), 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>

Lester, D. (1987). Suicidal preoccupation and dysthymia in college students. *Psychological Reports*, 61(3), 762–762. <https://doi.org/10.2466/pr0.1987.61.3.762>

Levey, D. F., Polimanti, R., Cheng, Z., Zhou, H., Nuñez, Y. Z., Jain, S., ... Gelernter, J. (2019). Genetic associations with suicide attempt severity and genetic overlap with major depression. *Translational Psychiatry*, 9(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0340-2>

Lewis, C. M., & Knight, J. (2012). Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(3), pdb.top068163-pdb.top068163. <https://doi.org/10.1101/pdb.top068163>

Li, D., & He, L. (2007). Meta-analysis supports association between serotonin transporter (5-htt) and suicidal behavior. *Molecular Psychiatry*, 12(1), 47–54. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001890>

Li, Y. X., Yu, Z. W., Jiang, T., Shao, L. W., Liu, Y., Li, N., ... Chang, Q. (2018). SNCA, a novel biomarker for Group 4 medulloblastomas, can inhibit tumor invasion and induce apoptosis. *Cancer science*, 109(4), 1263–1275. <https://doi.org/10.1111/cas.13515>

Lijffijt, M., Rourke, E.D., Swann, A.C., Zunta-Soares, G.B., Soares, J.C., 2014. Illness-course modulates suicidality-related prefrontal gray matter reduction in women with bipolar disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 130(5), 374-387

Lin-Hendel, E.G. (2017). Differential Requirements For Mitochondria During Neuronal Migration. *Publicly Accessible Penn Dissertations*. 2424. <https://repository.upenn.edu/edissertations/2424>

Liu, X. (2005). Association of TPH1 with suicidal behaviour and psychiatric disorders in the Chinese population. *Journal of Medical Genetics*, 43(2), e04–e04. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029397>

Lolas, F., Gomez, A., & Suarez, L. (1991). Epq-r and suicide attempt: The relevance of psychoticism. *Personality and Individual Differences*, 12(9), 899–902. [https://doi.org/10.1016/0191-8869\(91\)90178-E](https://doi.org/10.1016/0191-8869(91)90178-E)

López-Narváez, M. L., Tovilla-Zárate, C. A., González-Castro, T. B., Juárez-Rojop, I., Pool-García, S., Genis, A., ... Fresán, A. (2015). Association analysis of TPH-1 and TPH-2 genes with suicidal behavior in patients with attempted suicide in Mexican population. *Comprehensive Psychiatry*, 61, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2015.05.002>

Lurie D. I. (2018). An Integrative Approach to Neuroinflammation in Psychiatric disorders and Neuropathic Pain. *Journal of experimental neuroscience*, 12, 1179069518793639. <https://doi.org/10.1177/1179069518793639>



Lutz, P.-E., Mechawar, N., & Turecki, G. (2017). Neuropathology of suicide: recent findings and future directions. *Molecular Psychiatry*, 22(10), 1395–1412. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.141>

Magno, L. A. V., Miranda, D. M., Neves, F. S., Pimenta, G. J., Mello, M. P., De Marco, L. A., ... Romano-Silva, M. A. (2010). Association between AKT1 but not AKTIP genetic variants and increased risk for suicidal behavior in bipolar patients. *Genes, Brain and Behavior*, 9(4), 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00571.x>

Mahon, K., Burdick, K.E., Wu, J., Ardekani, B.A., Szeszko, P.R., 2012. Relationship between suicidality and impulsivity in bipolar I disorder: a diffusion tensor imaging study. *Bipolar Disord.* 14, 80-89.

Mahon, M. J., Tobin, J. P., Cusack, D. A., Kelleher, C., & Malone, K. M. (2005). Suicide among regular-duty military personnel: A retrospective case-control study of occupation-specific risk factors for workplace suicide. *The American Journal of Psychiatry*, 162(9), 1688–1696. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.9.1688>

Malkesman, O., Pine, D. S., Tragon, T., Austin, D. R., Henter, I. D., Chen, G., & Manji, H. K. (2009). Animal models of suicide-trait-related behaviors. *Trends in pharmacological sciences*, 30(4), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.01.004>

Malone, K. M., Haas, G. L., Sweeney, J. A., & Mann, J. J. (1995). Major depression and the risk of attempted suicide. *Journal of Affective Disorders*, 34(3), 173–185. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(95\)00015-f](https://doi.org/10.1016/0165-0327(95)00015-f).

Malvey, L. (2007). *compbio / Differential Gene Expression and Hypothesis Testing [WWWDocument]*, URL <http://compbio.pbworks.com/w/page/16252887/Differential%20Gene%20Expression%20and%20Hypothesis%20Testing> (accessed 1.12.20)

Mancarci, B. O., Toker, L., Tripathy, S. J., Li, B., Rocco, B., Sibille, E., & Pavlidis, P. (2017). Cross-Laboratory Analysis of Brain Cell Type Transcriptomes with Applications to Interpretation of Bulk Tissue Data. *eNeuro*, 4(6), ENEURO.0212-17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0212-17.2017>

Mann JJ, Apter A, Bertolote J, Beautrais A, Currier D, Haas A, Hegerl U, Lonnqvist J, Malone K, Marusic A, Mehlum L, Patton G, Phillips M, Rutz W, Rihmer Z, Schmidtke A, Shaffer D, Silverman M, Takahashi Y, Varnik A, Wasserman D, Yip P, Hendin H (2005). Suicide prevention strategies: a systematic review. *Journal of the American Medical Association* 294, 2064–2074

Mann, J. J., Waternaux, C., Haas, G. L., & Malone, K. M. (1999). Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients. *The American Journal of Psychiatry*, 156(2), 181–189. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.2.181>

- Marchand, W. R., Lee, J. N., Johnson, S., Thatcher, J., & Gale, P. (2013). Striatal circuit function is associated with prior self-harm in remitted major depression. *Neuroscience Letters*, 557, 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.053>.
- Marín-Navarrete, R., & Szerman, N. (2015). Repensando el concepto de adicciones: pasos hacia la patología dual. *Salud mental*, 38(6), 395-396. <https://dx.doi.org/10.17711/sm.0185-3325.2015.060>
- Matsuo, K., Nielsen, N., Nicoletti, M.A., Hatch, J.P., Monkul, E.S., Watanabe, Y., et al., 2010. Anterior genu corpus callosum and impulsivity in suicidal patients with bipolar disorder. *Neurosci. Lett.* 469, 75-80.
- Maussion, G., Yang, J., Suderman, M., Diallo, A., Nagy, C., Arnovitz, M., ... Turecki, G. (2014). Functional DNA methylation in a transcript specific 3'UTR region of TrkB associates with suicide. *Epigenetics*, 9(8), 1061–1070. <https://doi.org/10.4161/epi.29068>.
- Mccarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*, 25(6), 765-771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp053>
- McClintick, J. N., McBride, W. J., Bell, R. L., Ding, Z. M., Liu, Y., Xuei, X., & Edenberg, H. J. (2015). Gene expression changes in serotonin, GABA-A receptors, neuropeptides and ion channels in the dorsal raphe nucleus of adolescent alcohol-preferring (P) rats following binge-like alcohol drinking. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 129, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.12.007>
- McCrae, R. R., & Costa, P. T. (1997). Personality trait structure as a human universal. *American Psychologist*, 52(5), 509–516. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.52.5.509>
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., ... Meaney, M. J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*, 12(3), 342–348. <https://doi.org/10.1038/nn.2270>.
- McGuffin, P., Perroud, N., Uher, R., Butler, A., Aitchison, K. J., Craig, I., ... Farmer, A. (2010). The genetics of affective disorder and suicide. *European Psychiatry*, 25(5), 275–277. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2009.12.012>
- McKenzie, A. T., Wang, M., Hauberg, M. E., Fullard, J. F., Kozlenkov, A., Keenan, A., ... Zhang, B. (2018). Brain Cell Type Specific Gene Expression and Co-expression Network Architectures. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27293-5>

McKenzie, M., Henders, A. K., Caracella, A., Wray, N. R., & Powell, J. E. (2014). Overlap of expression Quantitative Trait Loci (eQTL) in human brain and blood. *BMC Medical Genomics*, 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-31>.

Menke, A., Domschke, K., Czamara, D., Klengel, T., Hennings, J., Lucae, S., ... Binder, E. B. (2012). Genome-wide association study of antidepressant treatment-emergent suicidal ideation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(3), 797–807. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.257>

Merikangas, K.R. & Merikangas, A.K. (2016). Contribution of Genetic Epidemiology to Our Understanding of Psychiatric Disorders. In *Genomics, circuits, and pathways in clinical neuropsychiatry*. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13583-0>

Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Andrew, M., Overholser, J. C., Jurjus, G., Stockmeier, C. A., & Rajkowska, G. (2002). Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biological psychiatry*, 52(12), 1121–1133. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01439-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01439-7)

Miguel-Hidalgo, J. J., Wilson, B. A., Hussain, S., Meshram, A., Rajkowska, G., & Stockmeier, C. A. (2014). Reduced connexin 43 immunolabeling in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and depression. *Journal of psychiatric research*, 55, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.04.007>

Miller, M., Borges, G., Orozco, R., Mukamal, K., Rimm, E. B., Benjet, C., & Medina-Mora, M. E. (2011). Exposure to alcohol, drugs and tobacco and the risk of subsequent suicidality: Findings from the Mexican Adolescent Mental Health Survey. *Drug and Alcohol Dependence*, 113(2–3), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.07.016>

Milner, A., Spittal, M., Pirkis, J., & LaMontagne, A. (2013). Suicide by occupation: Systematic review and meta-analysis. *British Journal of Psychiatry*, 203(6), 409-416. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.113.128405>

Min, K.-B., Park, S.-G., Hwang, S. H., & Min, J.-Y. (2015). Precarious employment and the risk of suicidal ideation and suicide attempts. *Preventive Medicine*, 71, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2014.12.017>

Minică, C. C., Dolan, C. V., Hottenga, J. J., Pool, R., Genome of the Netherlands Consortium, Fedko, I. O., ... Vink, J. M. (2015). Heritability, SNP- and Gene-Based Analyses of Cannabis Use Initiation and Age at Onset. *Behavior genetics*, 45(5), 503–513. <https://doi.org/10.1007/s10519-015-9723-9>

Miranda-Mendizabal, A., Castellví, P., Parés-Badell, O., Alayo, I., Almenara, J., Alonso, I., Blasco, M.J., Cebrià, A., Gabilondo, A., Gili, M., Lagares, C., Piqueras, J.A., Rodríguez-Jiménez, T., Rodríguez-Marín, J., Roca, M., Soto-Sanz, V., Vilagut, G.,

Alonso, J., (2019). Gender differences in suicidal behavior in adolescents and young adults: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Int J Public Health*, 64, 265-283. <https://doi.org/10.1007/s00038-018-1196-1>

Mirkovic, B., Laurent, C., Podlipski, M.-A., Frebourg, T., Cohen, D., & Gerardin, P. (2016). Genetic Association Studies of Suicidal Behavior: A Review of the Past 10 Years, Progress, Limitations, and Future Directions. *Frontiers in Psychiatry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00158>

Molina Arias, M. (2014). El problema de las comparaciones múltiples. *Pediatría Atención Primaria*, 16(64), 367-370. <https://dx.doi.org/10.4321/S1139-76322014000500019>

Molina-Guzman, G., González-Castro, T. B., Hernández Díaz, Y., Tovilla-Zárate, C. A., Juárez-Rojop, I. E., Guzmán-Priego, C. G., ... Rodríguez-Perez, J. M. (2017). Gender differences in the association between HTR2C gene variants and suicidal behavior in a Mexican population: a case-control study. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 13, 559–566. <https://doi.org/10.2147/NDT.S122024>

Monkul, E.S., Hatch, J.P., Nicoletti, M.A., Spence, S., Brambilla P., Lacerda, A.L., et al., (2007). Fronto-limbic brain structures in suicidal and non-suicidal female patients with major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 12,360-366

Morin, A. (2008). Sin palabras. Notas sobre la inexistencia del término 'suicida' en el latín clásico y medieval. *Circe de clásicos y modernos*, 12, 159-166.

Mueller, O., Lightfoot, S, Schroeder, A. (2004). RNA Integrity Number (RIN)—Standardization of RNA Quality Control. Agilent Technologies, Technical Report 5989-1165EN

Mullins, N., Bigdeli, T. B., Børglum, A. D., Coleman, J. R. I., Demontis, D., Mehta, D., ... Lewis, C. M. (2019). Gwas of suicide attempt in psychiatric disorders and association with major depression polygenic risk scores. *American Journal of Psychiatry*, 176(8), 651–660. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2019.18080957>

Mullins, N., Perroud, N., Uher, R., Butler, A. W., Cohen-Woods, S., Rivera, M., ... Lewis, C. M. (2014). Genetic relationships between suicide attempts, suicidal ideation and major psychiatric disorders: A genome-wide association and polygenic scoring study. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 165(5), 428–437. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32247>

Murphy, T. M., Ryan, M., Foster, T., Kelly, C., McClelland, R., O'Grady, J., ... Malone, K. M. (2011). Risk and protective genetic variants in suicidal behaviour: Association with SLC1A2, SLC1A3, 5-HTR1B & NTRK2 polymorphisms. *Behavioral and Brain Functions*, 7(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-7-22>

Murray, A. (2000). *Suicide in the Middle Ages: The curse on self-murder* (Vol. 2). Oxford University Press on Demand. USA

Nagy, C., Suderman, M., Yang, J., Szyf, M., Mechawar, N., Ernst, C., & Turecki, G. (2015). Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. *Molecular psychiatry*, 20(3), 320–328. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.21>

NCBI Resource Coordinators (2017). Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, 45(D1), D12–D17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1071>

Neidhart, M. (2016). DNA methylation – introduction. In Neidhart, M. (Ed.) *DNA Methylation and Complex Human Disease*. Academic Press. 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420194-1.00001-4>

Niciu, M. J., Henter, I. D., Sanacora, G., & Zarate, C. A., Jr (2014). Glial abnormalities in substance use disorders and depression: does shared glutamatergic dysfunction contribute to comorbidity?. *The world Journal of biological psychiatry : the official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 15(1), 2–16. <https://doi.org/10.3109/15622975.2013.829585>.

Nishimura, M., Terao, T., Soeda, S., Nakamura, J., Iwata, N., & Sakamoto, K. (2004). Suicide and occupation: Further supportive evidence for their relevance. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28(1), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.09.023>

Nishizawa, D., Fukuda, K., Kasai, S., Hasegawa, J., Aoki, Y., Nishi, A., ... Ikeda, K. (2014). Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. *Molecular psychiatry*, 19(1), 55–62. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.164>

Nixon, K., Morris, S. A., Liput, D. J., & Kelso, M. L. (2010). Roles of neural stem cells and adult neurogenesis in adolescent alcohol use disorders. *Alcohol* (Fayetteville, N.Y.), 44(1), 39–56. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.11.001>

Noble, W. S. (2009). How does multiple testing correction work? *Nature Biotechnology*, 27(12), 1135–1137. <https://doi.org/10.1038/nbt1209-1135>

Nock, M. K. (Ed.). (2014). *The oxford handbook of suicide and self-injury*. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780195388565.001.0001>

Nock, M. K., Borges, G., Bromet, E. J., Alonso, J., Angermeyer, M., Beautrais, A., Bruffaerts, R., Chiu, W.T., de Girolamo, G., Gluzman, S., de Graaf, R., Gureje, O., Haro, J.M., Huang, Y., Karam, E., Kessler, R.C., Lepine, J.P., Levinson, D., Medina-Mora, M.E., Ono, Y., Posada-Villa, J., Williams, D. (2008). Cross-national prevalence

and risk factors for suicidal ideation, plans and attempts. *British Journal of Psychiatry*, 192(2), 98–105. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.040113>

Nordström, P., Schalling, D., & Asberg, M. (1995). Temperamental vulnerability in attempted suicide. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 92(2), 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1995.tb09560.x>

Nubukpo, P., Girard, M., Sengelen, J. M., Bonnefond, S., Varnoux, A., Marin, B., & Malauzat, D. (2016). A prospective hospital study of alcohol use disorders, comorbid psychiatric conditions and withdrawal prognosis. *Annals of general psychiatry*, 15(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12991-016-0111-5>

Nueda, M. J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2011). ARSyN: A method for the identification and removal of systematic noise in multifactorial time course microarray experiments. *Biostatistics*, 13(3), 553-566. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxr042>

Ohira K. (2018). Regulation of Adult Neurogenesis in the Cerebral Cortex. *J Neurol Neuromed*, 3(4), 59-64

Olie, E., Jollant, F., Deverdun, J., de Champfleury, N.M., Cyprien, F., Le Bars, E., et al. 2017. The experience of social exclusion in women with a history of suicidal acts: a neuroimaging study. *Sci. Rep.* 7(1), 89.

Organización Mundial de la Salud. (1969). *Manual of the International Statistical Classification of Diseases, Injuries, and Causes of Death, eighth revision*. Geneva, World Health Organization.

Organización Mundial de la Salud. (2015) Preventing suicide: a global imperative. [http://www.who.int/mental\\_health/suicide-prevention/world\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/world_report_2014/en/). Consultado el 21 de diciembre de 2019

Organización Mundial de la Salud. (2017). WHO Global Health Estimates. <http://apps.who.int/gho/data/node.main.MENTALHEALTH?lang=en/> (accessed March 20, 2019).

Organización Mundial de la Salud.(2019). Suicide in the world: global health estimates. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326948/WHO-MSD-MER-19.3-eng.pdf>.

Oswald, N. (2016). The Basics: How Phenol Extraction of DNA Works, Bitesize Bio. URL <https://bitesizebio.com/384/the-basics-how-phenol-extraction-works/> (accessed 1.10.20).

Otsuka, I., Akiyama, M., Shirakawa, O., Okazaki, S., Momozawa, Y., Kamatani, Y., ... Hishimoto, A. (2019). Genome-wide association studies identify polygenic effects for completed suicide in the Japanese population. *Neuropsychopharmacology* : official

publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 44(12), 2119–2124. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0506-5>

PAHO. (2015). Suicide Mortality in the Americas: Regional Report. ISBN 978-92-75-11843-6, 2014. Global Health Estimates <http://apps.who.int/gho/data/view.main.MHSUICIDEASDRREGv>

Pan LA, Ramos L, Segreti AM, et al. Right superior temporal gyrus volume in adolescents with a history of suicide attempt. *Br J Psychiatry*. 2015;206:339–340. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.151316>

Pan, L.A., Batezati-Alves, S.C., Almeida, J.R., Segreti, A., Akkal, D., Hassel, S., et al., 2011. Dissociable patterns of neural activity during response inhibition in depressed adolescents with and without suicidal behaviour. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 50,602-611.

Pantazatos, S. P., Andrews, S. J., Dunning-Broadbent, J., Pang, J., Huang, Y. Y., Arango, V., ... John Mann, J. (2015). Isoform-level brain expression profiling of the spermidine/spermine N1-Acetyltransferase1 (SAT1) gene in major depression and suicide. *Neurobiology of disease*, 79, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.014>

Pantazatos, S. P., Huang, Y.-Y., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., Arango, V., & Mann, J. J. (2017). Whole-transcriptome brain expression and exon-usage profiling in major depression and suicide: Evidence for altered glial, endothelial and ATPase activity. *Molecular Psychiatry*, 22(5), 760–773. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.130>

Patel, Y. M., Stram, D. O., Wilkens, L. R., Park, S. S., Henderson, B. E., Le Marchand, L., ... Murphy, S. E. (2015). The contribution of common genetic variation to nicotine and cotinine glucuronidation in multiple ethnic/racial populations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(1), 119–127. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0815>

Pegtel, D. M., Peferoen, L., & Amor, S. (2014). Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1652), 20130516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0516>

Perlis, R. H., Huang, J., Purcell, S., Fava, M., Rush, A. J., Sullivan, P. F., ... Smoller, J. W. (2010). Genome-wide association study of suicide attempts in mood disorder patients. *The American Journal of Psychiatry*, 167(12), 1499–1507. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10040541>

Perroud, N., Courtet, P., Vincze, I., Jausse, I., Jollant, F., Bellivier, F., ... Malafosse, A. (2008). Interaction between BDNF Val66Met and childhood trauma on adult's violent suicide attempt. *Genes, Brain, and Behavior*, 7(3), 314–322. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00354.x>

Perroud, N., Uher, R., Ng, M. Y. M., Guipponi, M., Hauser, J., Henigsberg, N., ... McGuffin, P. (2012). Genome-wide association study of increasing suicidal ideation during antidepressant treatment in the GENDEP project. *The Pharmacogenomics Journal*, 12(1), 68–77. <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.70>

Pfeffer, C. R., Normandin, L., & Kakuma, T. (1994). Suicidal children grow up: Suicidal behavior and psychiatric disorders among relatives. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 33(8), 1087–1097. <https://doi.org/10.1097/00004583-199410000-00004>

Phipson, B., Lee, S., Majewski, I. J., Alexander, W. S., & Smyth, G. K. (2016). Robust hyperparameter estimation protects against hypervariable genes and improves power to detect differential expression. *The annals of applied statistics*, 10(2), 946–963. <https://doi.org/10.1214/16-AOAS920>

Pine, P. S., Munro, S. A., Parsons, J. R., McDaniel, J., Lucas, A. B., Lozach, J., ... Salit, M. (2016). Evaluation of the ExeRNAI RNA Controls Consortium (Ercc) reference material using a modified Latin square design. *BMC Biotechnology*, 16(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0281-x>

Pink, R. C., Wicks, K., Caley, D. P., Punch, E. K., Jacobs, L., & Carter, D. R. (2011). Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease?. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(5), 792–798. <https://doi.org/10.1261/RNA.2658311>

Pompili, M., Ehrlich, S., De Pisa, E., Mann, J. J., Innamorati, M., Cittadini, A., ... Girardi, P. (2007). White matter hyperintensities and their associations with suicidality in patients with major affective disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 257(8), 494–499. <https://doi.org/10.1007/s00406-007-0755-x>

Posner, K., Oquendo, M. A., Gould, M., Stanley, B., & Davies, M. (2007). Columbia Classification Algorithm of Suicide Assessment (C-CASA): classification of suicidal events in the FDA's pediatric suicidal risk analysis of antidepressants. *The American Journal of psychiatry*, 164(7), 1035–1043. <https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.7.1035>

Poulter, M. O., Du, L., Weaver, I. C. G., Palkóvits, M., Faludi, G., Merali, Z., ... Anisman, H. (2008). GABAA Receptor Promoter Hypermethylation in Suicide Brain: Implications for the Involvement of Epigenetic Processes. *Biological Psychiatry*, 64(8), 645–652. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.05.028>



Pregelj, P., Nedic, G., Paska, A. V., Zupanc, T., Nikolac, M., Balažic, J., ... Pivac, N. (2011). The association between brain-derived neurotrophic factor polymorphism (Bdnf val66met) and suicide. *Journal of Affective Disorders*, 128(3), 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.07.001>

Preti, A. (2003). Unemployment and suicide. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 57(8), 557–558. <https://doi.org/10.1136/jech.57.8.557>

Price, R. B., Nock, M. K., Charney, D. S., & Mathew, S. J. (2009). Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. *Biological psychiatry*, 66(5), 522–526. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.04.029>

Pulay, A. J., & Réthelyi, J. M. (2016). Multimarker analysis suggests the involvement of BDNF signaling and microRNA biosynthesis in suicidal behavior. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 171(6), 763–776. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32433>

Qiagen. RNeasy Lipid Tissue Mini Kit - QIAGEN [WWW Document], n.d. URL <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=7f13ac1a-841d-4e9b-b39d-42fe71b3d585&lang=en> (accessed 1.10.20).

Qiu T, Klonsky ED, Klein DN (2017) Hopelessness predicts suicide ideation but not attempts: A 10-year longitudinal study. *Suicide Life Threat Behav.* <https://doi.org/10.1111/sltb.12328>. [Epub ahead of print].

Qiu, X., Wu, H., Hu, R., (2013). The impact of quantile and rank normalization procedures on the testing power of gene differential expression analysis. *BMC Bioinformatics*, 14, 124. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-124>

R Core Team. (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.r-project.org/>

Ramaker, R. C., Bowling, K. M., Lasseigne, B. N., Hagenauer, M. H., Hardigan, A. A., Davis, N. S., ... Myers, R. M. (2017). Post-mortem molecular profiling of three psychiatric disorders. *Genome Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0458-5>

Raust, A., Slama, F., Mathieu, F., Roy, I., Chenu, A., Koncke, D., ... Bellivier, F. (2007). Prefrontal cortex dysfunction in patients with suicidal behavior. *Psychological Medicine*, 37(03), 411. <https://doi.org/10.1017/S0033291706009111>

Reese, S. E., Archer, K. J., Therneau, T. M., Atkinson, E. J., Vachon, C. M., de Andrade, M., ... Eckel-Passow, J. E. (2013). A new statistic for identifying batch effects in high-throughput genomic data that uses guided principal component analysis.

Bioinformatics (Oxford, England), 29(22), 2877–2883.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt480>

Regier, D., Farmer, M.E., Rae, D.S., Locke, B.Z., Keith, S.J., Judd, L.L., Goodwin, F.K., (1990). Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 264(19), 2511-2518.

Rentería, M. E., Schmaal, L., Hibar, D. P., Couvy-Duchesne, B., Strike, L. T., Mills, N. T., ... Hickie, I. B. (2017). Subcortical brain structure and suicidal behaviour in major depressive disorder: a meta-analysis from the ENIGMA-MDD working group. *Translational psychiatry*, 7(5), e1116. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.84>

Restrepo, D., Gutierrez-Ochoa, N., Rodriguez-Echeverri, C., & Sierra-Hincapie, G. (2018). Suicide Risk Associated With Dual Diagnosis in General Population. *Addictive Disorders & Their Treatment*, 1. <https://doi.org/10.1097/adt.0000000000000154>

Rice, J. P., Hartz, S. M., Agrawal, A., Almasy, L., Bennett, S., Breslau, N., ... GENEVA Consortium (2012). CHRN3 is more strongly associated with Fagerström test for cigarette dependence-based nicotine dependence than cigarettes per day: phenotype definition changes genome-wide association studies results. *Addiction (Abingdon, England)*, 107(11), 2019–2028. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2012.03922.x>

Richard-Devantoy, S., Berlim, M. T., & Jollant, F. (2014). A meta-analysis of neuropsychological markers of vulnerability to suicidal behavior in mood disorders. *Psychological Medicine*, 44(8), 1663–1673. <https://doi.org/10.1017/S0033291713002304>

Ringen, P. A., Melle, I., Birkenaes, A. B., Engh, J. A., Faerden, A., Vaskinn, A., ... Andreassen, O. A. (2008). The level of illicit drug use is related to symptoms and premorbid functioning in severe mental illness. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 118(4), 297–304. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2008.01244.x>

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Ethanol Precipitation of RNA and the Use of Carriers. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(b), pdb.prot5440–pdb.prot5440. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5440>

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(a), pdb.prot5439–pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>

Ritchie, H., & Roser, M. (2019). Drug Use. Retrieved from <https://ourworldindata.org/drug-use>

Ritchie, H., Roser, M. & Ortiz-Ospina, E. (2019). Suicide. Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/suicide' [Online Resource]

Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47–e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>

Roberts, S. E., Jaremin, B., & Lloyd, K. (2013). High-risk occupations for suicide. *Psychological medicine*, 43(6), 1231–1240. <https://doi.org/10.1017/S0033291712002024>

Robertson, K. D. (2002). DNA methylation and chromatin: Unraveling the tangled web. *Oncogene* 21, 5361–5379. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205609>

Robison, A. J., & Nestler, E. J. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(11), 623–637. <https://doi.org/10.1038/nrn3111>

Rosen, G. (1971). History in the study of suicide. *Psychological Medicine*, 1(04), 267. <https://doi.org/10.1017/s0033291700042239>

Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098–1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>

Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., ... & Abdollahpour, I. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1736-1788

Roy, B., & Dwivedi, Y. (2017). Understanding epigenetic architecture of suicide neurobiology: A critical perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 72, 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.031>

Rueda, L. (2014). *Microarray image and data analysis: Theory and practice..*

Sahu, M., & Prasuna, J. G. (2016). Twin Studies: A Unique Epidemiological Tool. *Indian Journal of community medicine : official publication of Indian Association of Preventive & Social Medicine*, 41(3), 177–182. <https://doi.org/10.4103/0970-0218.183593>

Saiz, P. A., García-Portilla, P., Paredes, B., Corcoran, P., Arango, C., Morales, B., ... Bobes, J. (2011). Role of serotonergic-related systems in suicidal behavior: Data from a case–control association study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), 1518–1524. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.04.011>

Salman-Rocha, D. G. (2011). Futuro imperfecto: dimensión hermenéutico-simbólica del suicidio en la obra de Jorge Semprún. Universidad iberoamericana <http://www.bib.uia.mx/tesis/pdf/015423/015423.pdf>

Samadi Rad, B., Ghasemi, A., Seifi, M., Samadikuchaksaraei, A., Baybordi, F., & Danaei, N. (2012). Serotonin 1A receptor genetic variations, suicide, and life events in the Iranian population: 5-HTR1A, suicide, and stress. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 66(4), 337–343. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2012.02333.x>

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santa Mina, E. E., & Gallop, R. M. (1998). Childhood sexual and physical abuse and adult self-harm and suicidal behaviour: A literature review. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne De Psychiatrie*, 43(8), 793–800. <https://doi.org/10.1177/070674379804300803>.

Sarchiapone, M., Carli, V., Roy, A., Iacoviello, L., Cuomo, C., Latella, M. C., ... Janal, M. N. (2008). Association of polymorphism (Val66met) of brain-derived neurotrophic factor with suicide attempts in depressed patients. *Neuropsychobiology*, 57(3), 139–145. <https://doi.org/10.1159/000142361>

Schneider, B., Grebner, K., Schnabel, A., Hampel, H., Georgi, K., & Seidler, A. (2011). Impact of employment status and work-related factors on risk of completed suicide. *Psychiatry Research*, 190(2-3), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.07.037>

Schosser, A., Butler, A. W., Ising, M., Perroud, N., Uher, R., Ng, M. Y., ... Lewis, C. M. (2011). Genomewide association scan of suicidal thoughts and behaviour in major depression. *PLoS ONE*, 6(7), e20690. <https://doi.org/10.1371/Journal.pone.0020690>

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>.

Schulsinger, F., Kety S. S, Rosenthal, D., Wender, P. H. (1979). A family study of suicide. In: Schou M, Stromgren S, editors. *Origin, Presentation and Treatment of Affective Disorders*. London U.K.: Academic Press. pp. 277–287.

Schumann, G., Liu, C., O'Reilly, P., Gao, H., Song, P., Xu, B., ... Elliott, P. (2016). KLB is associated with alcohol drinking, and its gene product  $\beta$ -Klotho is necessary for FGF21 regulation of alcohol preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(50), 14372–14377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611243113>

Sears, C., Wilson, J., & Fitches, A. (2013). Investigating the role of BDNF and CCK system genes in suicidality in a familial bipolar cohort. *Journal of Affective Disorders*, 151(2), 611–617. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.07.006>

Selim, M., & Bradberry, C. W. (1996). Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: Comparison between the Lewis and Fischer 344 rat strains. *Brain Research*, 716(1–2), 157–164. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01385-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01385-7)

Sequeira, A., Gwadry, F. G., Ffrench-Mullen, J. M. H., Canetti, L., Gingras, Y., Casero, R. A., ... Turecki, G. (2006). Implication of SSAT by gene expression and genetic variation in suicide and major depression. *Archives of General Psychiatry*, 63(1), 35–48. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.1.35>

Sequeira, A., Klempan, T., Canetti, L., Ffrench-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(7), 640–655. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001969>

Sequeira, A., Mamdani, F., Ernst, C., Vawter, M. P., Bunney, W. E., Lebel, V., ... Turecki, G. (2009). Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PloS one*, 4(8), e6585. <https://doi.org/10.1371/Journal.pone.0006585>

Sequeira, A., Mamdani, F., Lalovic, A., Anguelova, M., Lesage, A., Seguin, M., ... Turecki, G. (2004). Alpha 2A adrenergic receptor gene and suicide. *Psychiatry Research*, 125(2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2003.12.002>

Sequeira, A., Morgan, L., Walsh, D. M., Cartagena, P. M., Choudary, P., Li, J., ... Vawter, M. P. (2012). Gene expression changes in the prefrontal cortex, anterior cingulate cortex and nucleus accumbens of mood disorders subjects that committed suicide. *PloS one*, 7(4), e35367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035367>

Sheehy, N., & O'Connor, R. C. (2002). Cognitive style and suicidal behaviour: Implications for therapeutic intervention, research lacunae and priorities. *British Journal of Guidance & Counselling*, 30(4), 353–362. <https://doi.org/10.1080/0306988021000025574>

Sherva, R., Wang, Q., Kranzler, H., Zhao, H., Koesterer, R., Herman, A., ... Gelernter, J. (2016). Genome-wide Association Study of Cannabis Dependence Severity, Novel Risk Variants, and Shared Genetic Risks. *JAMA psychiatry*, 73(5), 472–480. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.0036>

Shi, M., Sheng, L., Stewart, T., Zabetian, C. P., & Zhang, J. (2019). New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.01.005>

Shieh, J. C., Schaar, B. T., Srinivasan, K., Brodsky, F. M., & McConnell, S. K. (2011). Endocytosis regulates cell soma translocation and the distribution of adhesion proteins in migrating neurons. *PloS one*, 6(3), e17802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017802>

Sibille, E., Arango, V., Galfalvy, H. C., Pavlidis, P., Erraji-Benchekroun, L., Ellis, S. P., & John Mann, J. (2004). Gene expression profiling of depression and suicide in human prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(2), 351–361. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300335>

Silver, J. D., Ritchie, M. E., & Smyth, G. K. (2009). Microarray background correction: Maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*, 10(2), 352–363. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxn042>

Simmons, D. (2008) Epigenetic influence and disease. *Nature Education* 1(1):6

Singh, B. D., & Singh, A. K. (2015). *Marker-assisted plant breeding: Principles and practices*. New Delhi: Springer.

Smith, A. H., Jensen, K. P., Li, J., Nunez, Y., Farrer, L. A., Hakonarson, H., ... Gelernter, J. (2017). Genome-wide association study of therapeutic opioid dosing identifies a novel locus upstream of OPRM1. *Molecular psychiatry*, 22(3), 346–352. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.257>

Smith, J. C., Mercy, J. A., & Conn, J. M. (1988). Marital status and the risk of suicide. *American Journal of Public Health*, 78(1), 78–80. <https://doi.org/10.2105/AJPH.78.1.78>

Smith, M. L., Baggerly, K. A., Bengtsson, H., Ritchie, M. E., & Hansen, K. D. (2013). illuminaio: An open source IDAT parsing tool for Illumina microarrays. *F1000Research*, 2, 264. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-264.v1>

Smyth, G. K., & Speed, T. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, 31(4), 265–273. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00155-5](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00155-5)

Sokolowski, M., Wasserman, J., & Wasserman, D. (2016). Polygenic associations of neurodevelopmental genes in suicide attempt. *Molecular Psychiatry*, 21(10), 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.187>

Sokolowski, M., Wasserman, J., & Wasserman, D. (2018). Gene-level associations in suicide attempter families show overrepresentation of synaptic genes and genes differentially expressed in brain development. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 177(8), 774–784. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32694>

Soloff, P., White, R., Diwadkar, V.A., 2014. Impulsivity, aggression and brain structure in high and low lethality suicide attempters with borderline personality disorder. *Psychiatry Res.* 222, 131-139.

Soloff, P.H., Pruitt, P., Sharma, M., Radwan, J., White, R., Diwadkar, V.A., 2012. Structural brain abnormalities and suicidal behavior in borderline personality disorder. *J. Psychiatr. Res.* 46(4), 516–525.

Spoletini, I., Piras, F., Fagioli, S., Rubino, I.A., Martinotti, G., Siracusano, A., et al., 2011. Suicidal attempts and increased right amygdala volume in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 125, 30-40.

Stack, S., (2001). Occupation and suicide. *Soc. Sci. Q.* 82, 384–396.

Stålenheim, E. G. (2001). Relationships between attempted suicide, temperamental vulnerability, and violent criminality in a Swedish forensic psychiatric population. *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists*, 16(7), 386–394. [https://doi.org/10.1016/s0924-9338\(01\)00595-8](https://doi.org/10.1016/s0924-9338(01)00595-8)

Statham, D. J., Heath, A. C., Madden, P. A., Bucholz, K. K., Bierut, L., Dinwiddie, S. H., ... Martin, N. G. (1998). Suicidal behaviour: An epidemiological and genetic study. *Psychological Medicine*, 28(4), 839–855. <https://doi.org/10.1017/s0033291798006916>

Stefulj, J., Kubat, M., Bališa, M., Skavic, J., & Jernej, B. (2005). Variability of the tryptophan hydroxylase gene: Study in victims of violent suicide. *Psychiatry Research*, 134(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2004.04.011>

Stein, M. B., Ware, E. B., Mitchell, C., Chen, C.-Y., Borja, S., Cai, T., ... Smoller, J. W. (2017). Genomewide association studies of suicide attempts in US soldiers. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 174(8), 786–797. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32594>

Strauss, J., McGregor, S., Freeman, N., Tiwari, A., George, C. J., Kovacs, M., & Kennedy, J. L. (2012). Association study of early-onset genes in childhood-onset mood disorders and suicide attempt. *Psychiatry Research*, 197(1–2), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.11.022>

Strawbridge, R. J., Ward, J., Ferguson, A., Graham, N., Shaw, R. J., Cullen, B., ... Smith, D. J. (2019). Identification of novel genome-wide associations for suicidality in UK Biobank, genetic correlation with psychiatric disorders and polygenic association with completed suicide. *EBioMedicine*, 41, 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.005>

Stringer, S., Minică, C. C., Verweij, K. J., Mbarek, H., Bernard, M., Derringer, J., ... Vink, J. M. (2016). Genome-wide association study of lifetime cannabis use based on

a large meta-analytic sample of 32 330 subjects from the Internacional Cannabis Consortium. *Translational psychiatry*, 6(3), e769. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.36>

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) and Center for Substance Abuse Treatment (CSAT).(2005).*Substance Abuse Treatment for Persons with Co-Occurring Disorders: A treatment Improvement Protocol Vol. 42*. Rockville:U.S. Department of Health and Human Services

Substance Abuse and Mental Health Services Administration. (2008). *Substance Abuse and Suicide Prevention: Evidence and Implications—A White Paper*. (DHHS Publication No. SMA-08-4352). Rockville, MD: SAMHSA

Suda, A., Kawanishi, C., Kishida, I., Sato, R., Yamada, T., Nakagawa, M., ... Hirayasu, Y. (2009). Dopamine d2 receptor gene polymorphisms are associated with suicide attempt in the Japanese population. *Neuropsychobiology*, 59(2), 130–134. <https://doi.org/10.1159/000213566>

Sun, Y., Deng, Y., Xiao, M., Hu, L., Li, Z., & Chen, C. (2017). Chondroitin sulfate proteoglycans inhibit the migration and differentiation of oligodendrocyte precursor cells and its counteractive interaction with laminin. *Internacional Journal of molecular medicine*, 40(6), 1657–1668. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3153>

Supriyanto, I., Sasada, T., Fukutake, M., Asano, M., Ueno, Y., Nagasaki, Y., ... Hishimoto, A. (2011). Association of FKBP5 gene haplotypes with completed suicide in the Japanese population. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(1), 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.019>

Swendsen, J., & Le Moal, M. (2011). Individual vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216(1), 73–85. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05894.x>

Tagliafierro, L., Bonawitz, K., Glenn, O. C., & Chiba-Falek, O. (2016). Gene Expression Analysis of Neurons and Astrocytes Isolated by Laser Capture Microdissection from Frozen Human Brain Tissues. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00072>

Thompson, A. G., Gray, E., Heman-Ackah, S. M., Mäger, I., Talbot, K., Andaloussi, S. E., Wood, M. J., & Turner, M. R. (2016). Extracellular vesicles in neurodegenerative disease - pathogenesis to biomarkers. *Nature reviews. Neurology*, 12(6), 346–357. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.68>

Thompson, P. M., Cruz, D. A., Olukotun, D. Y., & Delgado, P. L. (2012). Serotonin receptor, SERT mRNA and correlations with symptoms in males with alcohol dependence and suicide: 5HT receptor mRNA in alcohol dependence with suicide.



Acta Psychiatrica Scandinavica, 126(3), 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2011.01816.x>

Thorgeirsson, T. E., Gudbjartsson, D. F., Surakka, I., Vink, J. M., Amin, N., Geller, F., ... Stefansson, K. (2010). Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nature genetics*, 42(5), 448–453. <https://doi.org/10.1038/ng.573>

Tobacco and Genetics Consortium (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nature genetics*, 42(5), 441–447. <https://doi.org/10.1038/ng.571>

Tochigi, M., Iwamoto, K., Bundo, M., Sasaki, T., Kato, N., & Kato, T. (2008). Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neuroscience Research*, 60(2), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.10.010>

Toker, L., Mancarci, B. O., Tripathy, S., & Pavlidis, P. (2018). Transcriptomic evidence for alterations in astrocytes and parvalbumin interneurons in bipolar disorder and schizophrenia subjects. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.07.010>

Tolliver, B. K., & Anton, R. F. (2015). Assessment and treatment of mood disorders in the context of substance abuse. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(2), 181

Tsoucas, D., Dong, R., Chen, H., Zhu, Q., Guo, G., Yuan, G.-C. (2019). Accurate estimation of cell-type composition from gene expression data. *Nature Communications*. 10, 2975. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10802-z>

Tsuang, M. T. (1983). Risk of suicide in the relatives of schizophrenics, manics, depressives, and controls. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 44(11), 396–397, 398–400.

Turecki G. (2014b). Epigenetics and suicidal behavior research pathways. *American Journal of preventive medicine*, 47(3 Suppl 2), S144–S151. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2014.06.011>

Turecki, G. (2014a). The molecular bases of the suicidal brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12), 802–816. <https://doi.org/10.1038/nrn3839>

Turecki, G. (2017). Early-Life Adversity and Suicide Risk: The Role of Epigenetics. *Phenomenology of Suicide*, 39–49. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47976-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47976-7_4)

Turecki, G., Brent, D. A. (2016). Suicide and suicidal behaviour. *The Lancet*, 387, 1227–1239. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00234-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00234-2)

Turecki, G., Ernst, C., Jollant, F., Labonté, B., & Mechawar, N. (2012). The neurodevelopmental origins of suicidal behavior. *Trends in Neurosciences*, 35(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.008>

Tutar, Y. (2012). Pseudogenes. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2012/424526>

U.S. Department of Health and Human Services (HHS) Office of the Surgeon General. (2016). *Facing Addiction in America: The Surgeon General's Report on Alcohol, Drugs, and Health*. Washington, DC: HHS,

Uhl, G. R., Drgon, T., Liu, Q.-R., Johnson, C., Walther, D., Komiyama, T., ... Lin, S.-K. (2008). Genome-Wide Association for Methamphetamine Dependence. *Archives of General Psychiatry*, 65(3), 345. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.65.3.345>

Uhl, G. R., Koob, G. F., & Cable, J. (2019). The neurobiology of addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1451(1), 5–28. <https://doi.org/10.1111/nyas.13989>

Underwood, M. D., Kassir, S. A., Bakalian, M. J., Galfalvy, H., Mann, J. J., & Arango, V. (2012). Neuron density and serotonin receptor binding in prefrontal cortex in suicide. *The International Journal of neuropsychopharmacology*, 15(4), 435–447. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000691>.

Underwood, M. D., Mann, J. J., & Arango, V. (2004). Serotonergic and Noradrenergic Neurobiology of Alcoholic Suicide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28, 57S–69S. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000127415.15000.ca>

Uribe, E., & Wix, R. (2012). Neuronal migration, apoptosis and bipolar disorder. *Revista De Psiquiatria Y Salud Mental*, 5(2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.rpsm.2011.11.005>

van der Vegt, E. J. M., van der Ende, J., Ferdinand, R. F., Verhulst, F. C., & Tiemeier, H. (2009). Early childhood adversities and trajectories of psychiatric problems in adoptees: Evidence for long lasting effects. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 37(2), 239–249. <https://doi.org/10.1007/s10802-008-9272-2>

Van Gelder, R. N. et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*87 (5), 1663.

Van Heeringen, K., & Mann, J. J. (2014). The neurobiology of suicide. *The Lancet Psychiatry*, 1(1), 63–72. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(14\)70220-2](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(14)70220-2)

Verkes, R. J., Pijl, H., Meinders, A. E., & Van Kempen, G. M. (1996). Borderline personality, impulsiveness, and platelet monoamine measures in bulimia nervosa and recurrent suicidal behavior. *Biological Psychiatry*, 40(3), 173–180. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(95\)00384-3](https://doi.org/10.1016/0006-3223(95)00384-3)

- Verweij, K. J., Vinkhuyzen, A. A., Benyamin, B., Lynskey, M. T., Quaye, L., Agrawal, A., ... Medland, S. E. (2013). The genetic aetiology of cannabis use initiation: a meta-analysis of genome-wide association studies and a SNP-based heritability estimation. *Addiction biology*, 18(5), 846–850. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00478.x>
- Vinod, K. Y., Arango, V., Xie, S., Kassir, S. A., Mann, J. J., Cooper, T. B., & Hungund, B. L. (2005). Elevated levels of endocannabinoids and CB1 receptor-mediated G-protein signaling in the prefrontal cortex of alcoholic suicide victims. *Biological Psychiatry*, 57(5), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.033>
- Visscher, P. M., & Montgomery, G. W. (2009). Genome-wide Association Studies and Human Disease. *JAMA*, 302(18), 2028. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1643>
- Volkow, N. D. (2009). Substance use disorders in schizophrenia--clinical implications of comorbidity. *Schizophrenia bulletin*, 35(3), 469–472. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp016>
- Volkow, N. D., & Muenke, M. (2012). The genetics of addiction. *Human genetics*, 131(6), 773–777. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1173-3>
- Vonhoff, F., & Keshishian, H. (2017). Activity-Dependent Synaptic Refinement: New Insights from Drosophila. *Frontiers in systems neuroscience*, 11, 23. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00023>
- Voracek, M., & Loibl, L. M. (2007). Genetics of suicide: a systematic review of twin studies. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 119(15-16), 463–475. <https://doi.org/10.1007/s00508-007-0823-2>
- Voss, M., Nylen, L., Floderus, B., Diderichsen, F., Terry, P.D. (2004). Unemployment and early cause-specific mortality: a study based on the Swedish twin registry. *Am. J. Public Health* 94, 2155–2161.
- Wain, L. V., Shrine, N., Miller, S., Jackson, V. E., Ntalla, I., Soler Artigas, M., ... Hall, I. P. (2015). Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): a genetic association study in UK Biobank. *The Lancet. Respiratory medicine*, 3(10), 769–781. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00283-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00283-0)
- Wang, J., Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M., & Zhang, B. (2017). WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W130–W137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx356>
- Ware, J. J., Chen, X., Vink, J., Loukola, A., Minica, C., Pool, R., ... Munafò, M. R. (2016). Genome-Wide Meta-Analysis of Cotinine Levels in Cigarette Smokers Identifies Locus at 4q13.2. *Scientific reports*, 6, 20092. <https://doi.org/10.1038/srep20092>

Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman R., Liaw, W. H. A., Lumley, T., ...Venables, B. (2014). Package 'gplots'. <https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/gplots.pdf>

Wasserman, D., Geijer, T., Sokolowski, M., Frisch, A., Michaelovsky, E., Weizman, A., ... Wasserman, J. (2007). Association of the serotonin transporter promotor polymorphism with suicide attempters with a high medical damage. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 17(3), 230–233. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.08.006>

Wasserman, D., Geijer, T., Sokolowski, M., Rozanov, V., & Wasserman, J. (2006). [No title found]. *Behavioral and Brain Functions*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-2-14>

Wasserman, D., Sokolowski, M., Rozanov, V., & Wasserman, J. (2007). The CRHR1 gene: A marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. *Genes, Brain and Behavior*, 0(0), 070321054409004-??? <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00310.x>

Weaver, T., Madden, P., Charles, V., Stimson, G., Renton, A., Tyrer, P., . . . Ford, C. (2003). Comorbidity of substance misuse and mental illness in community mental health and substance misuse services. *British Journal of Psychiatry*, 183(4), 304-313. <https://doi.org/10.1192/bjp.183.4.304>

Wender, P. H. (1986). Psychiatric Disorders in the Biological and Adoptive Families of Adopted Individuals With Affective Disorders. *Archives of General Psychiatry*, 43(10), 923. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1986.01800100013003>

Wilcox, H. C., Conner, K. R., & Caine, E. D. (2004). Association of alcohol and drug use disorders and completed suicide: An empirical review of cohort studies. *Drug and Alcohol Dependence*, 76 Suppl, S11-19. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2004.08.003>

Willour, V. L., Seifuddin, F., Mahon, P. B., Jancic, D., Pirooznia, M., Steele, J., ... Potash, J. B. (2012). A genome-wide association study of attempted suicide. *Molecular psychiatry*, 17(4), 433–444. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.4>

Wrzosek, M., Łukaszkiwicz, J., Wrzosek, M., Serafin, P., Jakubczyk, A., Klimkiewicz, A., ... Wojnar, M. (2011). Association of polymorphisms in HTR2A, HTR1A and TPH2 genes with suicide attempts in alcohol dependence: A preliminary report. *Psychiatry Research*, 190(1), 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.04.027>

Yanagi, M., Shirakawa, O., Kitamura, N., Okamura, K., Sakurai, K., Nishiguchi, N., ... Maeda, K. (2005). Association of 14-3-3 epsilon gene haplotype with completed

suicide in Japanese. *Journal of Human Genetics*, 50(4), 210–216. <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0241-0>

Yang, H., Harrington, C. A., Vartanian, K., Coldren, C. D., Hall, R., & Churchill, G. A. (2008). Randomization in laboratory procedure is key to obtaining reproducible microarray results. *PloS one*, 3(11), e3724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003724>

Yen, S., Pagano, M. E., Shea, M. T., Grilo, C. M., Gunderson, J. G., Skodol, A. E., ... Zanarini, M. C. (2005). Recent life events preceding suicide attempts in a personality disorder sample: findings from the collaborative longitudinal personality disorders study. *Journal of consulting and clinical psychology*, 73(1), 99–105. <https://doi.org/10.1037/0022-006X.73.1.99>

Yin, H., Galfalvy, H., Pantazatos, S. P., Huang, Y. Y., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., ... Mann, J. J. (2016a). GLUCOCORTICOID RECEPTOR-RELATED GENES: GENOTYPE AND BRAIN GENE EXPRESSION RELATIONSHIPS TO SUICIDE AND MAJOR DEPRESSIVE DISORDER. *Depression and anxiety*, 33(6), 531–540. <https://doi.org/10.1002/da.22499>

Yin, H., Pantazatos, S. P., Galfalvy, H., Huang, Y. Y., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., ... Mann, J. J. (2016b). A pilot integrative genomics study of GABA and glutamate neurotransmitter systems in suicide, suicidal behavior, and major depressive disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the Internacional Society of Psychiatric Genetics*, 171B(3), 414–426. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32423>

Yuodelis-Flores, C. and Ries, R.K. (2015). Addiction and suicide: A review. *Am J Addict*, 24: 98-104. <https://doi.org/10.1111/ajad.12185>

Zai C.C., de Luca, V., Strauss, J., et al. (2012). Genetic Factors and Suicidal Behavior. In: Dwivedi Y, editor. *The Neurobiological Basis of Suicide*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK107191/>

Zai, C. C., Gonçalves, V. F., Tiwari, A. K., Gagliano, S. A., Hosang, G., de Luca, V., ... Kennedy, J. L. (2015). A genome-wide association study of suicide severity scores in bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 65, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.11.002>

Zai, C. C., Zai, G. C., Tiwari, A. K., Manchia, M., de Luca, V., Shaikh, S. A., ... Kennedy, J. L. (2014). Association study of gabrg2 polymorphisms with suicidal behaviour in schizophrenia patients with alcohol use disorder. *Neuropsychobiology*, 69(3), 154–158. <https://doi.org/10.1159/000358839>

- Zalsman, G., Patya, M., Frisch, A., Ofek, H., Schapir, L., Blum, I., ... Tyano, S. (2011). Association of polymorphisms of the serotonergic pathways with clinical traits of impulsive-aggression and suicidality in adolescents: A multi-center study. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 12(1), 33–41. <https://doi.org/10.3109/15622975.2010.518628>
- Zhang, B., Kirov, S., & Snoddy, J. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic acids research*, 33(Web Server issue), W741–W748. <https://doi.org/10.1093/nar/gki475>
- Zhang, L., Su, T.-P., Choi, K., Maree, W., Li, C.-T., Chung, M.-Y., ... Ursano, R. (2011). P11 (S100a10) as a potential biomarker of psychiatric patients at risk of suicide. *Journal of Psychiatric Research*, 45(4), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.08.012>
- Zhang, Y., Zhang, C., Yuan, G., Yao, J., Cheng, Z., Liu, C., ... Li, K. (2010). Effect of Tryptophan Hydroxylase-2 rs7305115 SNP on suicide attempts risk in major depression. *Behavioral and Brain Functions*, 6(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-49>
- Zhao, S., Guo, Y., Sheng, Q., & Shyr, Y. (2014). Advanced heat map and clustering analysis using heatmap3. *BioMed Research Internacional*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/986048>
- Zhou, Z., Roy, A., Lipsky, R., Kuchipudi, K., Zhu, G., Taubman, J., ... Goldman, D. (2005). Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. *Archives of General Psychiatry*, 62(10), 1109. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.10.1109>
- Zhurov, V., Stead, J. D. H., Merali, Z., Palkovits, M., Faludi, G., Schild-Poulter, C., ... Poulter, M. O. (2012). Molecular pathway reconstruction and analysis of disturbed gene expression in depressed individuals who died by suicide. *PLoS ONE*, 7(10), e47581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047581>
- Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H.-J., Bondy, B., & Ackenheil, M. (2004). Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase Isoform (Tph2) gene in suicide victims. *Biological Psychiatry*, 56(8), 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.07.015>
- Zink, M., Schmitt, A., Vengeliene, V., Henn, F. A., & Spanagel, R. (2004). Ethanol Induces Expression of the Glutamate Transporters EAAT1 and EAAT2 in Organotypic Cortical Slice Cultures. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 28(11), 1752–1757. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000145810.12545.b3>

Zouk, H., McGirr, A., Lebel, V., Benkelfat, C., Rouleau, G., & Turecki, G. (2007). The effect of genetic variation of the serotonin 1B receptor gene on impulsive aggressive behavior and suicide. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 144B(8), 996–1002. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30521>

## ANEXO A: Dictámenes de Comité de Ética



Ciudad de México, a 15 de noviembre de 2016.

### Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica

No. de registro: 29/2016/I

El Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), con fundamento en lo dispuesto por los artículos 99, 100, 102 y 111 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud; 41, fracciones I y III de la Ley de los Institutos Nacionales de Salud y en el Reglamento Interior del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica y consensuando la opinión de los Comités de Ética en Investigación y de Bioseguridad, emite el presente:

#### DICTAMEN APROBATORIO

Al proyecto titulado:

**“Estudio del epigenoma en pacientes adolescentes y adultos con intento de suicidio y suicidio consumado.”**

De esto se notifica al Dr. José Humberto Nicolini Sánchez, investigador responsable del mismo.

El Comité de Investigación, el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Bioseguridad, se reservan el derecho de hacer revisiones periódicas cuando así lo estimen pertinente. Sin perjuicio de lo anterior, se deberá entregar a través de la Intranet, un informe semestral con los avances y al término de la investigación, se deberá enviar una copia del o los artículos o tesis generados.

Atentamente

**Dr. Juan Enrique Morett Sánchez**  
Presidente del Comité de Investigación





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

OFICIO NO. FMED/CI/RGG/048/2018

ASUNTO: Registro Proyecto 009/PECEM/2018

**Brenda Cabrera Mendoza**  
Plan de Estudios Combinados en Medicina

Presente.

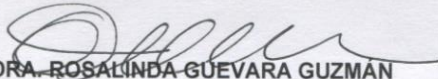
Me complace informarle que su proyecto **009/PECEM/2018** de título **“Estudio post-mortem de la expresión de ARN mensajero en la corteza prefrontal dorsolateral de sujetos con suicidio consumado y abuso de sustancias”** cuyo tutor es el Dr. José Humberto Nicolini Sánchez ha sido **REGISTRADO** por las Comisiones de Investigación y de Ética en sesión ordinaria de fecha **06 de marzo de 2018** con una vigencia hasta el 31 de enero de 2019.

Para conocer el resultado de esta investigación, le solicitamos atentamente entregue una copia del informe final elaborado con relación a su proyecto, en la División de Investigación de la Facultad de Medicina.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de marzo de 2018.

LA SECRETARIA TÉCNICA

  
DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

\*RGG/ETF.

Comité de Investigación de la Facultad de Medicina-UNAM, con fecha 01 de Junio de 2015, se expide Registro COFEPRIS  
Número: 15 CI 09 003 021

## **ANEXO B: Soluciones**

### **Amortiguador RPE**

Adicionar 44 ml de etanol al concentrado de buffer RPE incluido en el kit *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* de Qiagen™ para obtener un volumen final de 55 ml.

### **TAE 50X**

Se pesaron 242 g de Tris base, a los que se añadieron 57.1 ml de ácido acético glacial, y 100 ml de EDTA 0.5M a pH 8. La solución fue aforada a 1 litro con agua destilada (Fierro, 2014).

### **TAE 1X**

Aforar 20 ml de la solución de TAE 50X a 1 litro con agua destilada (Fierro, 2014).

### **EDTA [0.5 M, pH 8]**

Se pesaron 186.1 g de EDTA disódico y se aforaron a 800 ml con agua destilada. Después se agitó la solución en un agitador magnético. Se ajustó el pH a 8.0 con NaOH. Aforar a un litro con agua destilada. La solución se dividió en alícuotas y se esterilizó en autoclave (*Cold Spring Harbor*, 2006).

### **Gel de agarosa 1%**

Se pesaron 200 mg de agarosa marca Promega (PROMEGA®, EUA) y fueron disueltos en 20 ml de amortiguador TAE 1X.

## ANEXO C: Sondas de control del microarreglo Human H12-v4 de Illumina

Genes constitutivos (7 sondas)						
ILMN_2038774 (EEF1A1)	ILMN_2038773 (UBC)	ILMN_2038777 (CTB)	ILMN_2038772 (PS9)	ILMN_1343295 (APDH)	ILMN_2038775 (TUBB2A)	ILMN_2038776 (TXN)
Marcaje (2 sondas)						
ILMN_2038781	ILMN_1343059					
Biotina (2 sondas)						
ILMN_1343049	ILMN_1343048					
cy3_hyb (6 sondas)						
ILMN_2038769 (alta intensidad)	ILMN_1343050 (baja intensidad)	ILMN_2038768 (intensidad media)	ILMN_2038771 (intensidad media)	ILMN_1343052 (baja intensidad)	ILMN_2038770 (alta intensidad)	
Baja astringencia (8 sondas)						
ILMN_1343061 (MM)	ILMN_2038769 (PM)	ILMN_2038768 (PM)	ILMN_1343063 (MM)			
ILMN_2038771 (PM)	ILMN_1343062 (MM)	ILMN_2038770 (PM)	ILMN_1343064 (MM)			
Consorcio de Control Externo de RNA (ERCC) (169 sondas)						
ILMN_3164734 (ERCC-00002)	ILMN_3164750 (ERCC-00003)	ILMN_3164765 (ERCC-00004)	ILMN_3164808 (ERCC-00009)	ILMN_3164838 (ERCC-00012)		
ILMN_3164979 (ERCC-00022)	ILMN_3165007 (ERCC-000249)	ILMN_3165027 (ERCC-00025)	ILMN_3165033 (ERCC-00028)	ILMN_3165086 (ERCC-00031)		
ILMN_3165201 (ERCC-00041)	ILMN_3165218 (ERCC-00042)	ILMN_3165229 (ERCC-00043)	ILMN_3165245 (ERCC-00044)	ILMN_3165277 (ERCC-00046)		
ILMN_3165426 (ERCC-00058)	ILMN_3165438 (ERCC-00059)	ILMN_3165457 (ERCC-00060)	ILMN_3165474 (ERCC-00061)	ILMN_3165484 (ERCC-00062)		
ILMN_3165619 (ERCC-00075)	ILMN_3165638 (ERCC-00076)	ILMN_3165650 (ERCC-00077)	ILMN_3165668 (ERCC-00078)	ILMN_3165687 (ERCC-00079)		
ILMN_3165829 (ERCC-00092)	ILMN_3165877 (ERCC-00095)	ILMN_3165896 (ERCC-00096)	ILMN_3165903 (ERCC-00097)	ILMN_3165920 (ERCC-00098)		
ILMN_3166114 (ERCC-00112)	ILMN_3166132 (ERCC-001139)	ILMN_3166177 (ERCC-00116)	ILMN_3166194 (ERCC-00117)	ILMN_3166223 (ERCC-00120)		
ILMN_3166404 (ERCC-00136)	ILMN_3166414 (ERCC-00137)	ILMN_3166430 (ERCC-00138)	ILMN_3166475 (ERCC-00142)	ILMN_3166491 (ERCC-00143)		
ILMN_3166596 (ERCC-00154)	ILMN_3166630 (ERCC-00156)	ILMN_3166640 (ERCC-00157)	ILMN_3166655 (ERCC-00158)	ILMN_3166673 (ERCC-00160)		
ILMN_3164858 (ERCC-00013)	ILMN_3164875 (ERCC-00014)	ILMN_3164905 (ERCC-00016)	ILMN_3164915 (ERCC-00017)	ILMN_3164950 (ERCC-00019)		
ILMN_3165100 (ERCC-00033)	ILMN_3165113 (ERCC-00034)	ILMN_3165130 (ERCC-00035)	ILMN_3165170 (ERCC-00039)	ILMN_3165190 (ERCC-00040)		
ILMN_3165303 (ERCC-00048)	ILMN_3165334 (ERCC-00051)	ILMN_3165363 (ERCC-00053)	ILMN_3165378 (ERCC-00054)	ILMN_3165415 (ERCC-00057)		
ILMN_3165533 (ERCC-00067)	ILMN_3165547 (ERCC-00069)	ILMN_3165565 (ERCC-00071)	ILMN_3165590 (ERCC-00073)	ILMN_3165604 (ERCC-00074)		
ILMN_3165699 (ERCC-00081)	ILMN_3165727 (ERCC-00083)	ILMN_3165745 (ERCC-00084)	ILMN_3165757 (ERCC-00085)	ILMN_3165768 (ERCC-00086)		
ILMN_3165933 (ERCC-00099)	ILMN_3165993 (ERCC-00104)	ILMN_3166057 (ERCC-00108)	ILMN_3166075 (ERCC-00109)	ILMN_3166098 (ERCC-00111)		
ILMN_3166238 (ERCC-00123)	ILMN_3166255 (ERCC-00126)	ILMN_3166311 (ERCC-00130)	ILMN_3166325 (ERCC-00131)	ILMN_3166368 (ERCC-00134)		
ILMN_3166504 (ERCC-00144)	ILMN_3166519 (ERCC-00145)	ILMN_3166551 (ERCC-00147)	ILMN_3166569 (ERCC-00148)	ILMN_3166578 (ERCC-00150)		
ILMN_3166687 (ERCC-00162)	ILMN_3166703 (ERCC-00163)	ILMN_3166721 (ERCC-00164)	ILMN_3166728 (ERCC-00165)	ILMN_3166775 (ERCC-00168)		
ILMN_3166789 (ERCC-00170)	ILMN_3166804 (ERCC-00171)					
Controles negativos (770 sondas)						
ILMN_1343914	ILMN_1343321	ILMN_1344038	ILMN_1343841	ILMN_1343835	ILMN_1344055	ILMN_1343339
ILMN_1343567	ILMN_1344056	ILMN_1343876	ILMN_1343727	ILMN_1343397	ILMN_1344066	ILMN_1343503
ILMN_1343554	ILMN_1343439	ILMN_1343740	ILMN_1343585	ILMN_1343592	ILMN_1344058	ILMN_1343717
ILMN_1343615	ILMN_1343489	ILMN_1343866	ILMN_1343803	ILMN_1343859	ILMN_1343709	ILMN_1343421
ILMN_1343422	ILMN_1343324	ILMN_1343636	ILMN_1343545	ILMN_1343347	ILMN_1344035	ILMN_1343762
ILMN_1343631	ILMN_1344057	ILMN_1343943	ILMN_1343528	ILMN_1343304	ILMN_1343924	ILMN_1343525

ILMN_1343699	ILMN_1343693	ILMN_1343580	ILMN_1343805	ILMN_1343483	ILMN_1343823	ILMN_1343544
ILMN_1344006	ILMN_1343534	ILMN_1343698	ILMN_1343830	ILMN_1343931	ILMN_1343735	ILMN_1343885
ILMN_1344019	ILMN_1343994	ILMN_1344040	ILMN_1343686	ILMN_1343753	ILMN_1343900	ILMN_1343446
ILMN_1343706	ILMN_1343476	ILMN_1343386	ILMN_1343798	ILMN_1344063	ILMN_1343371	ILMN_1343330
ILMN_1343942	ILMN_1343599	ILMN_1343308	ILMN_1343944	ILMN_1343804	ILMN_1343899	ILMN_1344052
ILMN_1343342	ILMN_1343442	ILMN_1343746	ILMN_1343523	ILMN_1343721	ILMN_1343447	ILMN_1343655
ILMN_1343674	ILMN_1343673	ILMN_1343521	ILMN_1343950	ILMN_1344051	ILMN_1343395	ILMN_1343305
ILMN_1343992	ILMN_1343884	ILMN_1343620	ILMN_1343869	ILMN_1343469	ILMN_1343790	ILMN_1343485
ILMN_1343969	ILMN_1343902	ILMN_1343604	ILMN_1343856	ILMN_1343780	ILMN_1343988	ILMN_1344037
ILMN_1343332	ILMN_1343918	ILMN_1343890	ILMN_1343857	ILMN_1344015	ILMN_1343311	ILMN_1343543
ILMN_1343912	ILMN_1343923	ILMN_1343908	ILMN_1343516	ILMN_1343341	ILMN_1343570	ILMN_1343513
ILMN_1343905	ILMN_1343755	ILMN_1343354	ILMN_1343838	ILMN_1343610	ILMN_1343360	ILMN_1344007
ILMN_1343922	ILMN_1343769	ILMN_1343399	ILMN_1343816	ILMN_1344053	ILMN_1343309	ILMN_1343692
ILMN_1343595	ILMN_1344012	ILMN_1343628	ILMN_1343682	ILMN_1343879	ILMN_1343562	ILMN_1343406
ILMN_1343542	ILMN_1343349	ILMN_1343952	ILMN_1343651	ILMN_1343302	ILMN_1343495	ILMN_1343410
ILMN_1343867	ILMN_1343719	ILMN_1343509	ILMN_1343650	ILMN_1343796	ILMN_1343765	ILMN_1343299
ILMN_1343454	ILMN_1343836	ILMN_1344011	ILMN_1343941	ILMN_1343345	ILMN_1343904	ILMN_1343584
ILMN_1343552	ILMN_1343849	ILMN_1343499	ILMN_1343609	ILMN_1343426	ILMN_1343860	ILMN_1343310
ILMN_1343484	ILMN_1343800	ILMN_1343417	ILMN_1344067	ILMN_1343946	ILMN_1343732	ILMN_1343647
ILMN_1343671	ILMN_1343578	ILMN_1343680	ILMN_1343396	ILMN_1343382	ILMN_1343974	ILMN_1343624
ILMN_1343423	ILMN_1343617	ILMN_1343725	ILMN_1343716	ILMN_1343828	ILMN_1343964	ILMN_1343444
ILMN_1343688	ILMN_1343886	ILMN_1343840	ILMN_1343453	ILMN_1378483	ILMN_1343438	ILMN_1344005
ILMN_1343536	ILMN_1343701	ILMN_1343877	ILMN_1344003	ILMN_1343612	ILMN_1343987	ILMN_1344024
ILMN_1343606	ILMN_1343691	ILMN_1343621	ILMN_1343600	ILMN_1343479	ILMN_1343487	ILMN_1343504
ILMN_1344060	ILMN_1343979	ILMN_1343888	ILMN_1343368	ILMN_1343452	ILMN_1343957	ILMN_1343468
ILMN_1343498	ILMN_1343512	ILMN_1343827	ILMN_1343814	ILMN_1343415	ILMN_1343551	ILMN_1343356
ILMN_1343795	ILMN_1343470	ILMN_1343460	ILMN_1343928	ILMN_1344050	ILMN_1343437	ILMN_1343335
ILMN_1343616	ILMN_1343777	ILMN_1343871	ILMN_1343702	ILMN_1343696	ILMN_1343300	ILMN_1343391
ILMN_1344004	ILMN_1343733	ILMN_1343737	ILMN_1343393	ILMN_1343373	ILMN_1343848	ILMN_1343603
ILMN_1343793	ILMN_1343933	ILMN_1343788	ILMN_1343329	ILMN_1343934	ILMN_1343739	ILMN_1343870
ILMN_1343963	ILMN_1343730	ILMN_1343569	ILMN_1343571	ILMN_1343348	ILMN_1343601	ILMN_1343684
ILMN_1343689	ILMN_1343490	ILMN_1343738	ILMN_1343587	ILMN_1343593	ILMN_1343351	ILMN_1344029
ILMN_1344069	ILMN_1343414	ILMN_1343480	ILMN_1343981	ILMN_1343945	ILMN_1343930	ILMN_1343507
ILMN_1343377	ILMN_1343306	ILMN_1343968	ILMN_1344047	ILMN_1343775	ILMN_1344010	ILMN_1343846
ILMN_1343520	ILMN_1343575	ILMN_1343510	ILMN_1343975	ILMN_1344002	ILMN_1343947	ILMN_1343416
ILMN_1343607	ILMN_1343723	ILMN_1343661	ILMN_1343611	ILMN_1343491	ILMN_1344001	ILMN_1343380
ILMN_1343646	ILMN_1343493	ILMN_1343789	ILMN_1343379	ILMN_1343389	ILMN_1343875	ILMN_1343325
ILMN_1343568	ILMN_1343537	ILMN_1343561	ILMN_1343901	ILMN_1343343	ILMN_1343726	ILMN_1343556
ILMN_1343824	ILMN_1343424	ILMN_1343370	ILMN_1343574	ILMN_1343344	ILMN_1343296	ILMN_1343797
ILMN_1343712	ILMN_1343854	ILMN_1343407	ILMN_1343916	ILMN_1343764	ILMN_1343970	ILMN_1343403
ILMN_1343965	ILMN_1343608	ILMN_1343745	ILMN_1344034	ILMN_1343927	ILMN_1343750	ILMN_1343618
ILMN_1343598	ILMN_1343818	ILMN_1343907	ILMN_1343911	ILMN_1344036	ILMN_1343758	ILMN_1343434
ILMN_1343747	ILMN_1378485	ILMN_1343887	ILMN_1343514	ILMN_1343441	ILMN_1344061	ILMN_1343387
ILMN_1344070	ILMN_1343792	ILMN_1343478	ILMN_1343418	ILMN_1343973	ILMN_1343328	ILMN_1343363
ILMN_1343896	ILMN_1344045	ILMN_1343378	ILMN_1343822	ILMN_1343937	ILMN_1343954	ILMN_1343704
ILMN_1343694	ILMN_1343411	ILMN_1343602	ILMN_1343508	ILMN_1343810	ILMN_1343920	ILMN_1343413

---

ILMN_1343962	ILMN_1343881	ILMN_1343532	ILMN_1344068	ILMN_1343743	ILMN_1343862	ILMN_1343984
ILMN_1343591	ILMN_1343408	ILMN_1344028	ILMN_1343806	ILMN_1343826	ILMN_1344065	ILMN_1343431
ILMN_1343986	ILMN_1343938	ILMN_1344049	ILMN_1343654	ILMN_1343749	ILMN_1343776	ILMN_1343456
ILMN_1343541	ILMN_1343445	ILMN_1343850	ILMN_1343672	ILMN_1343897	ILMN_1343966	ILMN_1343895
ILMN_1344046	ILMN_1343687	ILMN_1344009	ILMN_1343622	ILMN_1343910	ILMN_1343667	ILMN_1343708
ILMN_1343392	ILMN_1343991	ILMN_1343808	ILMN_1343998	ILMN_1343724	ILMN_1343997	ILMN_1343560
ILMN_1344017	ILMN_1343322	ILMN_1343951	ILMN_1343665	ILMN_1343891	ILMN_1343432	ILMN_1343659
ILMN_1343402	ILMN_1343362	ILMN_1343713	ILMN_1343642	ILMN_1343630	ILMN_1343623	ILMN_1343458
ILMN_1343638	ILMN_1343872	ILMN_1343977	ILMN_1343668	ILMN_1343553	ILMN_1343782	ILMN_1343501
ILMN_1343400	ILMN_1343535	ILMN_1343880	ILMN_1343925	ILMN_1343679	ILMN_1343626	ILMN_1343430
ILMN_1344014	ILMN_1343967	ILMN_1343482	ILMN_1343645	ILMN_1343565	ILMN_1343613	ILMN_1343683
ILMN_1343467	ILMN_1343297	ILMN_1343653	ILMN_1343481	ILMN_1343670	ILMN_1343939	ILMN_1343334
ILMN_1343921	ILMN_1343333	ILMN_1343980	ILMN_1343461	ILMN_1343451	ILMN_1343327	ILMN_1343464
ILMN_1344033	ILMN_1343303	ILMN_1343517	ILMN_1343685	ILMN_1343858	ILMN_1343972	ILMN_1343953
ILMN_1343533	ILMN_1343703	ILMN_1343660	ILMN_1344020	ILMN_1343936	ILMN_1343549	ILMN_1343486
ILMN_1343913	ILMN_1343550	ILMN_1343961	ILMN_1343731	ILMN_1343346	ILMN_1343323	ILMN_1343825
ILMN_1343883	ILMN_1343361	ILMN_1343314	ILMN_1343614	ILMN_1343829	ILMN_1343572	ILMN_1343436
ILMN_1343714	ILMN_1343420	ILMN_1343770	ILMN_1343518	ILMN_1343409	ILMN_1343785	ILMN_1343419
ILMN_1343678	ILMN_1343773	ILMN_1343506	ILMN_1343906	ILMN_1343563	ILMN_1343663	ILMN_1343459
ILMN_1343851	ILMN_1343527	ILMN_1343919	ILMN_1343539	ILMN_1343812	ILMN_1343336	ILMN_1343627
ILMN_1343894	ILMN_1343748	ILMN_1343989	ILMN_1343932	ILMN_1343833	ILMN_1343374	ILMN_1343754
ILMN_1343367	ILMN_1343845	ILMN_1343861	ILMN_1343766	ILMN_1343734	ILMN_1344030	ILMN_1344013
ILMN_1343505	ILMN_1344018	ILMN_1344027	ILMN_1343643	ILMN_1343579	ILMN_1343772	ILMN_1344048
ILMN_1343404	ILMN_1343677	ILMN_1343666	ILMN_1343649	ILMN_1343637	ILMN_1343718	ILMN_1343681
ILMN_1343385	ILMN_1343455	ILMN_1343715	ILMN_1343449	ILMN_1343433	ILMN_1343519	ILMN_1378484
ILMN_1343375	ILMN_1343909	ILMN_1343640	ILMN_1343759	ILMN_1343531	ILMN_1343794	ILMN_1343559
ILMN_1343440	ILMN_1343767	ILMN_1343959	ILMN_1343898	ILMN_1343751	ILMN_1343473	ILMN_1344062
ILMN_1343852	ILMN_1343443	ILMN_1343450	ILMN_1343742	ILMN_1343477	ILMN_1344022	ILMN_1343471
ILMN_1343605	ILMN_1344032	ILMN_1343639	ILMN_1344023	ILMN_1343744	ILMN_1344000	ILMN_1343644
ILMN_1343652	ILMN_1343589	ILMN_1343853	ILMN_1343917	ILMN_1343429	ILMN_1343634	ILMN_1343629
ILMN_1343893	ILMN_1343787	ILMN_1343722	ILMN_1343596	ILMN_1343555	ILMN_1343935	ILMN_1343847
ILMN_1343312	ILMN_1343711	ILMN_1343664	ILMN_1343326	ILMN_1344042	ILMN_1343791	ILMN_1343474
ILMN_1343778	ILMN_1343488	ILMN_1343548	ILMN_1343736	ILMN_1343529	ILMN_1343425	ILMN_1343819
ILMN_1343641	ILMN_1343307	ILMN_1343999	ILMN_1343547	ILMN_1343868	ILMN_1343831	ILMN_1343383
ILMN_1343889	ILMN_1343384	ILMN_1343475	ILMN_1343760	ILMN_1343741	ILMN_1343313	ILMN_1343388
ILMN_1343492	ILMN_1343597	ILMN_1343956	ILMN_1343331	ILMN_1343993	ILMN_1343940	ILMN_1343697
ILMN_1343700	ILMN_1343695	ILMN_1343427	ILMN_1343799	ILMN_1343662	ILMN_1343315	ILMN_1343955
ILMN_1343576	ILMN_1343540	ILMN_1343502	ILMN_1344026	ILMN_1343515	ILMN_1343948	ILMN_1343412
ILMN_1343582	ILMN_1343319	ILMN_1343448	ILMN_1343463	ILMN_1343357	ILMN_1343809	ILMN_1343366
ILMN_1343756	ILMN_1343522	ILMN_1343465	ILMN_1343530	ILMN_1343320	ILMN_1343784	ILMN_1343675
ILMN_1343657	ILMN_1343958	ILMN_1343511	ILMN_1343398	ILMN_1343619	ILMN_1343538	ILMN_1343583
ILMN_1344016	ILMN_1343676	ILMN_1343316	ILMN_1343990	ILMN_1343340	ILMN_1343625	ILMN_1343577
ILMN_1343949	ILMN_1343353	ILMN_1343811	ILMN_1343729	ILMN_1343632	ILMN_1343779	ILMN_1343855
ILMN_1343903	ILMN_1343338	ILMN_1343842	ILMN_1343656	ILMN_1343832	ILMN_1343820	ILMN_1343337
ILMN_1343783	ILMN_1343752	ILMN_1343774	ILMN_1343985	ILMN_1343298	ILMN_1344043	ILMN_1343526
ILMN_1343401	ILMN_1343817	ILMN_1343843	ILMN_1343500	ILMN_1343494	ILMN_1343771	ILMN_1343757

---

---

ILMN_1343996	ILMN_1343359	ILMN_1344059	ILMN_1343878	ILMN_1343457	ILMN_1343837	ILMN_1344031
ILMN_1343317	ILMN_1343995	ILMN_1344054	ILMN_1343960	ILMN_1343915	ILMN_1343497	ILMN_1343813
ILMN_1343892	ILMN_1343707	ILMN_1343839	ILMN_1343763	ILMN_1343815	ILMN_1343720	ILMN_1343381
ILMN_1343369	ILMN_1343633	ILMN_1343710	ILMN_1344064	ILMN_1343874	ILMN_1344041	ILMN_1343669
ILMN_1343834	ILMN_1343971	ILMN_1343435	ILMN_1343982	ILMN_1343586	ILMN_1343573	ILMN_1343581
ILMN_1343648	ILMN_1343821	ILMN_1343728	ILMN_1343978	ILMN_1343566	ILMN_1343364	ILMN_1343768
ILMN_1343524	ILMN_1343863	ILMN_1343781	ILMN_1343705	ILMN_1343564	ILMN_1343390	ILMN_1343802
ILMN_1343358	ILMN_1343590	ILMN_1343372	ILMN_1343635	ILMN_1343428	ILMN_1343786	ILMN_1343690
ILMN_1343472	ILMN_1343301	ILMN_1344008	ILMN_1343864	ILMN_1343350	ILMN_1343365	ILMN_1343352
ILMN_1343355	ILMN_1343557	ILMN_1343844	ILMN_1344044	ILMN_1344021	ILMN_1343546	ILMN_1343318
ILMN_1343929	ILMN_1343394	ILMN_1343466	ILMN_1343462	ILMN_1343882	ILMN_1343376	ILMN_1343496
ILMN_1343983	ILMN_1343865	ILMN_1343873	ILMN_1343594	ILMN_1344039	ILMN_1343558	

---

Abreviaturas: *Perfect match* (PM); *Mismatch* (MM)