



UNIVERSITÀ  
DI FOGGIA



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Dipartimento di Studi Umanistici. Lettere, Beni Culturali,  
Scienze della Formazione

Dottorato di ricerca in

*“Neuroscience and education”*

XXXVI Ciclo

---

*Il suicidio.  
Analisi epistemologica del fenomeno e studio  
sperimentale dell’espressione dei fattori neurotrofici  
BDNF e GDNF nell’encefalo di soggetti  
deceduti in seguito ad atto suicidario.*

**Coordinatrice:**

Chiar.ma Prof.ssa Annamaria PETITO

**Tutor:**

Chiar.mo Prof. Luigi CIPOLLONI

**Dottoranda:**

Dott.ssa Stefania De Simone

# **INDICE**

## **1. BACKGROUND**

1.1 Il suicidio	p. 3
1.2 Le neurotrofine	p. 7
1.2.1 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	p. 10
1.2.2 Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)	p. 14
1.3 Lo stato dell'arte	p. 17

## **2. OBIETTIVI**

p. 19

## **3. MATERIALI E METODI**

3.1 La casistica	p. 20
3.2 Il campionamento	p. 23
3.3 Le indagini immunohistochimiche	p. 23
3.4 L'analisi statistica	p. 25

## **4. RISULTATI**

p. 26

## **5. CONCLUSIONI**

p. 42

## **6. BIBLIOGRAFIA**

p. 47

# 1. BACKGROUND

## 1.1 Il suicidio

Il termine suicidio si riferisce all'atto, avente finalità estremamente anticonservativa, con cui un individuo mette fine volontariamente e consapevolmente alla propria vita. Esso è un fenomeno riguardante l'intera popolazione globale, e può essere ritenuto un vero e proprio problema di sanità pubblica. Per "*ideazione suicidaria*" si intende altresì il desiderio di porre fine alla propria vita, esitando a volte in un vero e proprio tentativo di suicidio, assimilabile quindi ad un atto di autolesionismo<sup>1</sup>.

Ogni anno, secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), circa 700.000 persone decidono di commettere suicidio. Il tasso di mortalità globale annuo stimato è di circa 9.2 per 100.000 individui, con variazioni per gruppi di età di provenienza geografica<sup>2</sup>. Secondo le stime dell'OMS, il suicidio è la quarta causa di morte nei giovani. Si stima inoltre che, per ogni suicidio realizzato, vi siano tra i 10 ed i 40 tentativi di suicidio<sup>3</sup>. Questo deve destare particolare preoccupazione per il fenomeno, non potendo lasciare indifferente l'opinione pubblica.

Secondo i dati raccolti dall'Istituto Nazionale di Statistica (Istat) nell'ambito dell'"*Indagine sulle cause di morte*" nel 2016, nel nostro Paese, 3.780 persone hanno posto fine alla propria vita mediante suicidio e, di questi, il 78,8% era di sesso maschile. Il tasso di mortalità per suicidio è pari a 11,8 per 100.000 abitanti per gli uomini e 3,0 per 100.000 abitanti per le donne. I tassi di mortalità per suicidio sono più alti per gli uomini nel nord Italia, soprattutto nel nord-est. I tassi di suicidio più bassi, sia per gli uomini che per le donne, si registrano nelle regioni meridionali dell'Italia<sup>4</sup>. Per ciò che riguarda le modalità di suicidio, la maggior parte dei suicidi secondo l'Istat avviene mediante impiccamento, seguito dalla precipitazione. Tra gli uomini inoltre è frequente l'utilizzo di arma da fuoco e

materiali esplosivi, mentre nelle donne sono più frequenti i suicidi tramite mezzo venefico ed annegamento.

Il verificarsi di un suicidio presenta numerosi fattori di rischio di molteplici nature<sup>5</sup>, ossia:

- Individuali: pregressi tentativi di suicidio, anamnesi positiva per patologie psichiatriche o pregressi tentativi di suicidio, patologie croniche, tendenze impulsive od aggressive, tossicodipendenza, etc;
- Relazionali: storia di suicidio familiare, perdita di relazioni interpersonali, isolamento sociale, bullismo, etc;
- Comunitari: mancanza di accesso alle cure, cluster suicidario comunitario, violenza, discriminazione, etc;
- Social-linked: stigma associato alle malattie mentali, facilità di accesso ai mezzi per commettere suicidio, spettacolarizzazione dei media.

Uno dei fattori di rischio più importanti è la presenza di patologia psichiatrica, in primis la depressione maggiore, seguita dal disturbo di ansia, dal disturbo bipolare e dalla tossicodipendenza<sup>6</sup>.

Una recente revisione sistematica<sup>6</sup> ha evidenziato che i fattori di rischio più frequentemente associati ai tentativi di suicidio in età avanzata sono costituiti da disturbi depressivi, pratiche di autolesionismo (soprattutto avvelenamento), uso di psicofarmaci, fattori psicologici individuali e disabilità; i fattori di rischio maggiormente associati ai suicidi realizzati, invece, sono rappresentati da: sesso maschile, pregressi atti di autolesionismo realizzati con metodi violenti, disturbi psichiatrici di qualsiasi tipologia (ansia, depressione, disturbo bipolare), stato di salute compromesso, patologie invalidanti, fattori stressanti (ad esempio eventi luttuosi), solitudine. Si ipotizza che anche la genetica possa influenzare il rischio di commettere l'atto autosoppressivo<sup>7</sup>.

Tra le patologie psichiatriche, dall'analisi della letteratura risulta evidente che i pazienti affetti da depressione maggiore sono maggiormente a rischio di suicidio o di tentativo di suicidio<sup>8,9</sup>.

Tuttavia, solo una parte dei soggetti deceduti a seguito di atto suicidario presentano patologia psichiatrica (quantomeno diagnosticata), ma la presenza di tali fattori può circoscrivere una parte della popolazione ad alto rischio di commettere l'estremo atto<sup>10</sup>.

La neurobiologia alla base dei fenomeni suicidari risulta estremamente complessa e, per questo motivo, i meccanismi eziologici e patologici associati al comportamento suicidario non sono ancora pienamente compresi e quindi tuttora oggetto di studio. Alla luce delle conoscenze ad oggi disponibili, si ritiene che il suicidio non sia il risultato di un'unica entità fisiopatologica, ma di una molteplicità di fattori causali di tipo comportamentale, socio-ambientale e psicologico, che agiscono di concerto, combinandosi nei modi più vari e concorrendo simultaneamente alla concretizzazione del fenomeno stesso.

In letteratura, ad oggi, si ritiene che lo spettro del fenomeno suicidario possa essere considerato come entità psicopatologica a sé stante ed indipendente dalla comorbidità psichiatrica. Attualmente si ritiene che il suicidio presenti una neurobiologia complessa ad eziologia multifattoriale che segue il cosiddetto modello “*diatesi-stress*”, secondo il quale un disturbo del comportamento deriva da una predisposizione genetica che rende più vulnerabili allo stress, normalmente causato dagli eventi della vita<sup>11, 12</sup>. In particolare, eventi di vita stressanti fungono da triggers per comportamenti suicidi<sup>13</sup>.

Quindi, secondo il modello “*diatesi-stress*” del suicidio<sup>14</sup>, vi sono dei “*fattori remoti*” di un individuo (profilo genetico, esperienze perinatali e, durante le prime fasi di vita, disturbi neurobiologici e caratteristiche di personalità) che costituiscono la “*diatesi*” per il suicidio. I “*fattori prossimali*” (forti difficoltà, disturbi psichiatrici, fattori ambientali e sociali) costituiscono la componente definita “*stress*”. In sostanza, i fattori remoti possono rendere l'individuo più vulnerabile qualora venga a trovarsi in condizioni di stress. In altre parole, l'insorgenza di eventi particolarmente avversi della vita o traumi infantili

producono effetti sulla diatesi attraverso meccanismi epigenetici, determinando l'incremento del rischio di manifestazione di comportamenti autosoppressivi.

Come espresso poc'anzi, il suicidio presenta una neurobiologia complessa, che va ad interessare numerosi sistemi biologici (sistema noradrenergico, serotoninergico, dopaminergico, GABAergico)<sup>15</sup>.

Un'interessante ipotesi vede il coinvolgimento del sistema neurotrofico nel verificarsi del comportamento suicidario. Ciò perché la patogenesi della depressione e del comportamento suicidario comportano modificazioni della plasticità neuronale<sup>16</sup>. Tali cambiamenti potrebbero contribuire a ridurre la capacità del cervello di adattarsi adeguatamente agli stimoli ambientali. Siffatta ipotesi deriva da studi che mostrano la presenza di differenze nella struttura del cervello e nelle sue connessioni nei pazienti depressi con tendenze suicide o in condizioni di stress. Tali modificazioni comprenderebbero la riduzione del numero di cellule, della loro densità, della dimensione del corpo cellulare e della loro densità neuronale e gliale nelle aree cerebrali corticali frontali o ippocampali.

Le neurotrofine sono fattori di crescita che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della plasticità strutturale e sinaptica, mantenendo le funzioni neuronali e modulando la neurotrasmissione<sup>17</sup>. Il loro ruolo biologico è evidente lungo tutto il corso della vita. Un'alterazione patologica correlata ai fattori neurotrofici potrebbe pertanto determinare non solo difetti nel mantenimento e nella rigenerazione neurale, e quindi eventuali anomalie strutturali nel cervello, ma anche riduzione nella plasticità neurale, pregiudicando in questo modo la capacità di adattamento dell'individuo nel contesto di situazioni critiche.

L'interesse del mondo scientifico si è focalizzato sullo studio di una neurotrofina in particolare, implicata nella fisiopatologia del comportamento suicidario, ossia il fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF)<sup>18</sup>.

Dwivedi et al.<sup>13</sup> hanno esaminato l'espressione del BDNF nelle vittime di suicidio e di controlli sani, riscontrando livelli significativamente più bassi del mRNA per il BDNF nella corteccia prefrontale e nell'ippocampo dei suicidi,

nonché la diminuzione della proteina del BDNF nella corteccia prefrontale e nell'ippocampo del gruppo suicida, evidenziando quindi complessivamente una riduzione della trascrizione del BDNF nell'encefalo dei deceduti a seguito di suicidio.

Tali osservazioni sono state confermate in un ulteriore studio, ove è stata dimostrata una specifica diminuzione del fattore BDNF nella corteccia prefrontale e nell'ippocampo dei suicidi, nonché a livello della corteccia entorinale, sede di regolazione delle emozioni<sup>19</sup>.

Quindi, i livelli di BDNF potrebbero rappresentare un *marker* biologico di comportamento suicidario.

Vi è inoltre un'ulteriore neurotrofina che ha destato l'interesse dei ricercatori in relazione al disturbo depressivo, ossia il fattore neurotrofico derivato dalla linea delle cellule gliali (GDNF).

Secondo alcuni studi, entrambe le neurotrofine presentano un ruolo protettivo nei confronti dei fenomeni neurodegenerativi, quali lo sviluppo dei disturbi dell'umore e delle malattie neurodegenerative<sup>20, 21</sup>.

## **1.2 Le neurotrofine**

Negli ultimi anni, i fattori neurotrofici, o neurotrofine (NT), sono diventati sempre più interessanti da un punto di vista scientifico.

Le neurotrofine sono essenziali per la sopravvivenza, la crescita e la rigenerazione di differenti popolazioni neuronali, sia appartenenti al sistema nervoso centrale che periferico, nell'encefalo fetale e dell'adulto<sup>22</sup>.

Per questo motivo le neurotrofine sono al centro di numerosi studi nell'ambito delle neuroscienze, finalizzati non solo alla comprensione del loro ruolo fisiologico ma soprattutto del loro probabile coinvolgimento nella patogenesi di alcune malattie del sistema nervoso, caratterizzate dalla morte di specifiche popolazioni neuronali. Tra queste le più studiate sono malattie neurodegenerative

quali il morbo di Alzheimer ed il morbo di Parkinson, ed anche numerose patologie del disturbo dell'umore, come ad esempio la depressione.

La scoperta della prima neurotrofina, ossia del Nerve Growth Factor (NGF) risale agli anni '50<sup>23</sup>. L'NGF presentava due importanti azioni sui neuroni, che lo distinguevano da altri tipi di fattori cellulari: regolava le funzioni dei neuroni differenziati ed era sintetizzato lontano dal corpo cellulare da tessuto periferico o da altri neuroni connessi agli assoni dei neuroni NGF-sensibili. L'NGF (ed anche le altre neurotrofine) nel sistema nervoso periferico è sintetizzato da cellule non neuronali, mentre nel sistema nervoso centrale è sintetizzato dai neuroni<sup>17</sup>.

Durante lo sviluppo, la neurotrofina è trasportata dal luogo di produzione alla terminazione nervosa attraverso un flusso retrogrado assonale. I neuroni che presentano questo flusso retrogrado sopravvivono, viceversa degenerano (*"ipotesi neurotrofica"*)<sup>24, 25</sup>.

Attualmente, i fattori neurotrofici comprendono diverse proteine che vengono raggruppate in famiglie in base alla loro sequenza e alle loro proprietà farmacologiche, e ciascuna di esse promuove la sopravvivenza di specifici tipi neuronali durante determinati stadi del loro sviluppo. Nei mammiferi sono espressi cinque fattori neurotrofici: il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), le Neurotrofine 3 e 4 (NT-3 e NT-4), il Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) e il Ciliar Neurotrophic Factor (CNTF).

Il BDNF in particolare è stata la seconda molecola scoperta, dando così corpo all'ipotesi neurotrofica<sup>26</sup>.

Le neurotrofine vengono sintetizzate inizialmente come pro-neurotrofine, ovvero precursori ad alto peso molecolare, poi tramite processi proteolitici vengono convertite in neurotrofine mature.

Le neurotrofine interagiscono con due principali classi distinte di recettori. La prima classe è quella del recettore p75NTR, ossia un membro della famiglia dei fattori di necrosi tumorale<sup>27</sup>.

La seconda classe di recettori è costituita da quelli ad attività tirosinchinasica (Trk)<sup>28</sup>. I tre membri principali di questa famiglia di recettori mostrano un'alta affinità specifica per le neurotrofine, mentre presentano bassa affinità per le rispettive pro- neurotrofine; l'NGF attiva preferenzialmente i TrkA, il BDNF e l'NT-4 attivano il TrkB, l'NT-3 attiva il TrkC.

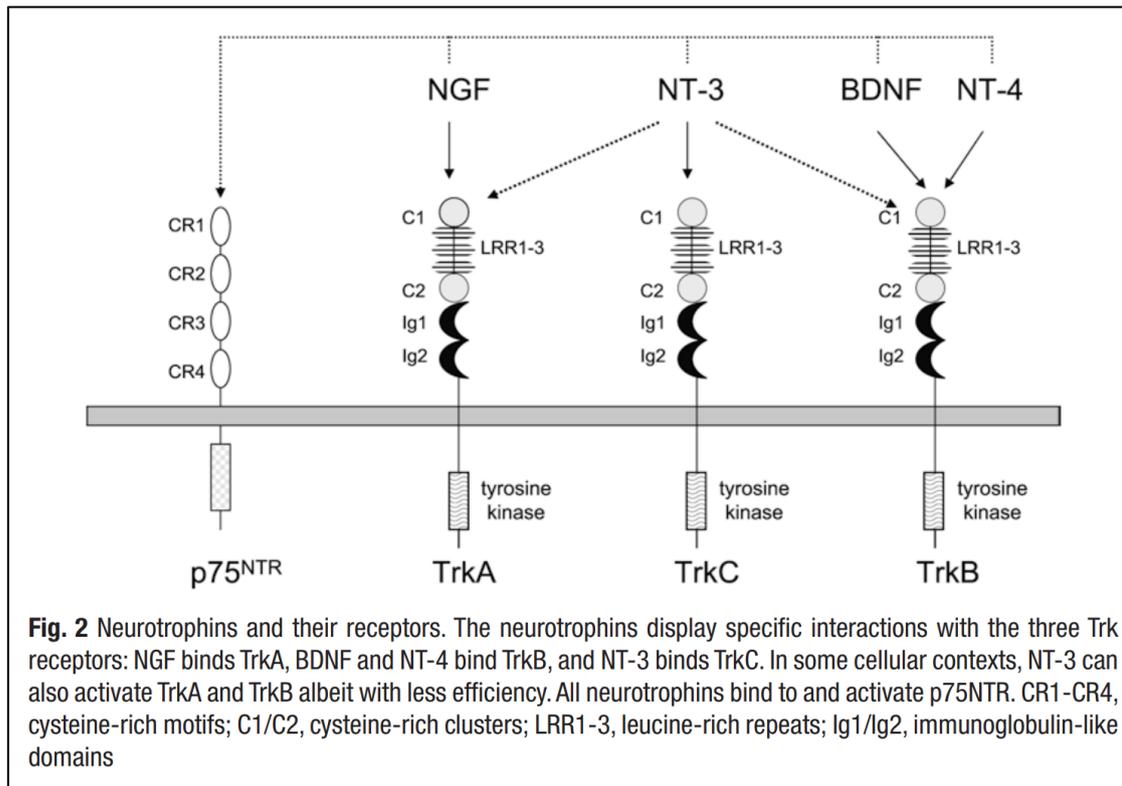


Figura 1<sup>28</sup>. Le neurotrofine ed i loro recettori. NGF lega TrkA, BDNF e NT-4 legano TrkB, infine NT-3 lega TrkC. In alcune situazioni, NT-3 può attivare anche TrkA e TrkB con minor efficienza. Tutte le neurotrofine legano ed attivano p75NTR.

Le neurotrofine presentano anche numerose azioni al di fuori del sistema nervoso. Per esempio, l'NGF stimola la proliferazione dei linfociti T e B<sup>29, 30</sup>, promuove la crescita e la proliferazione delle cellule emopoietiche<sup>31</sup>, produce cambiamenti di forma nelle piastrine<sup>32</sup>, influenza il rilascio di mediatori cellulari dalle mastcellule<sup>33</sup>, controlla inoltre alcune funzioni neuroendocrine (è coinvolto ad esempio nello sviluppo dell'ipotalamo del ratto di sesso femminile)<sup>34</sup> ed è coinvolto nella trasmissione del dolore<sup>35</sup>. Altri studi rivelano un coinvolgimento

importante nello sviluppo cardiaco, nella neovascolarizzazione e nelle funzioni del sistema immunitario<sup>36</sup>.

Quindi, in definitiva, così come si evince da numerosi studi effettuati su modello animale, i fattori neurotrofici regolano la sopravvivenza neuronale nello sviluppo del sistema nervoso, promuovono la loro sopravvivenza a seguito di danni e proteggono i neuroni da eventuali insulti tossici. Per cui, è nata l'idea che questi potrebbero essere impiegati per il trattamento di malattie neurodegenerative. Per esempio, essendo tali molecole capaci di aumentare la funzione colinergica e proteggendo dalla neurodegenerazione, si è ipotizzato un loro utilizzo nel morbo di Alzheimer<sup>37</sup>. Similmente, nel morbo di Parkinson si è supposto un utilizzo del GDNF, in quanto esso agisce sui neuroni dopaminergici<sup>38</sup>.

### **1.2.1 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)**

Il BDNF (*“Brain Derived Neurotrophic Factor”*) è tra le neurotrofine la molecola maggiormente diffusa nel cervello dei mammiferi, sia adulti che in fase di sviluppo. Esso è coinvolto nella neurogenesi, nello sviluppo dei neuroni, nell'omeostasi neuronale, nella sintesi proteica, nell'integrità strutturale e mantenimento della plasticità neuronale nel cervello adulto<sup>39,40</sup>, nella connessione sinaptica, nei meccanismi che regolano l'apprendimento e la memoria<sup>41</sup>, nella tossicodipendenza e nei meccanismi di adattamento allo stress. Pertanto, risulta condivisibile reputare che alterazioni nell'espressione del BDNF possano portare a riduzione della plasticità neuronale, con alterazione della capacità di reazione a stimoli ambientali ed eventi critici, nonché ad una maggiore probabilità di neurodegenerazione.

Il gene BDNF è composto da un esone 3' comune, che codifica la regione pro-BDNF della proteina, e da diverse regioni 5' non codificanti e dipendenti dalla

specie, regolate dal promotore, che terminano in un esone 5' codificante che include l'espressione genica<sup>42, 43</sup>.

L'espressione di BDNF è regolata da numerosi stimoli esogeni ed endogeni (come ad esempio, stress, attività fisica, dieta, lesioni cerebrali).

Il BDNF è prodotto inizialmente come pro-BDNF e successivamente viene convertito nella sua forma matura nel citoplasma da una endoproteasi, oppure nella matrice extracellulare da una plasmina o da una metalloproteasi (MMP). Entrambe le forme del BDNF possono essere secrete e legare con bassa affinità il recettore p75NTR, il quale è responsabile dell'attivazione della cascata apoptotica<sup>44</sup>. Dall'altra parte, il BDNF maturo si lega con alta affinità al recettore Tropomiosino-chinasi B (TrkB), attivando numerose cascate di segnalazione.

Il BDNF è coinvolto nei meccanismi di plasticità sinaptica, nella sopravvivenza dei neuroni, nella formazione di nuove sinapsi, nella ramificazione dendritica e nella modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori<sup>45, 46</sup>.

Il BDNF è presente anche negli organi periferici, come il cuore, l'intestino, il timo e la milza<sup>47, 48</sup>. Circa il 90% di tale neurotrofina nel sangue è contenuto nelle piastrine. Diverse neuropatologie causano una riduzione dei livelli della proteina del BDNF sia nell'encefalo che nel siero dei pazienti<sup>49, 50</sup>. Purtroppo, non è del tutto chiaro se i livelli di BDNF sierici riflettono i livelli encefalici, in quanto gli studi sono contraddittori tra loro<sup>51, 52</sup>, sebbene per lo più si pensa che i livelli sierici del BDNF siano più alti rispetto a quelli del plasma e del fluido cerebrospinale<sup>53, 54</sup>.

Secondo alcuni studi clinici che hanno esaminato i livelli ematici del BDNF *in vivo*, si è scoperto che tale neurotrofina può attraversare la barriera emato-encefalica in entrambe le direzioni, mediante un sistema di trasporto saturabile ad alta capacità, che ne determina un afflusso precoce e rapido nell'encefalo<sup>55</sup>. Le concentrazioni di BDNF possono essere misurate nel siero, nel plasma o nel sangue intero e appaiono altamente correlate a quelle presenti nel liquido cefalorachidiano. Alcuni studi hanno riscontrato una ridotta concentrazione

sierica di BDNF in pazienti depressi non sottoposti a terapia farmacologica e la sussistenza di correlazione inversa tra la severità della depressione e i livelli sierici di BDNF<sup>56</sup>. I livelli di BDNF nel sangue, quindi, potrebbero essere correlati alla concentrazione della stessa neurotrofina a livello della corteccia cerebrale<sup>51</sup>, quindi, la quantificazione ematica del BDNF *in vivo* potrebbe fungere da marcatore della plasticità neuronale.

Inoltre, il BDNF gioca un ruolo importante anche nella neuroinfiammazione e nell'invecchiamento. Uno dei maggiori fattori della cascata infiammatoria è il fattore nucleare-kappa B (NF- $\kappa$ B), ossia un fattore di trascrizione che induce l'espressione di diversi geni sia pro- che anti-apoptotici, tra cui il gene del BDNF. Curiosamente, il legame tra BDNF e TrkB può indurre a sua volta l'espressione di NF- $\kappa$ B. Quest'ultimo è inoltre coinvolto nella risposta immunitaria innata ed adattativa in numerose patologie psichiatriche e neurodegenerative. Tuttavia, non è ancora ben chiaro l'esatto meccanismo di regolazione. Questo consente di individuare un ruolo del BDNF anche nelle patologie degenerative come morbo di Parkinson e morbo di Alzheimer<sup>57</sup>.

Negli umani, il BDNF viene reputato un interessante biomarker per diverse patologie psichiatriche<sup>58</sup>.

In alcuni modelli animali, topi eterozigoti per il gene BDNF mostravano un aumento dell'aggressività e dell'ansia, maggiore aumento di peso e compromissione della memoria, suggerendo che la sua deplezione potrebbe essere associata allo sviluppo di alcuni sintomi psichiatrici<sup>59</sup>. Questa ipotesi sembra supportata inoltre dal fatto che il trattamento delle patologie psichiatriche porta ad un aumento dei livelli del BDNF<sup>60, 61</sup>.

Uno dei disturbi psichiatrici più frequenti è il disturbo depressivo maggiore, caratterizzato da diminuzione della segnalazione dei neurotrasmettitori, disfunzioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, aumento della risposta infiammatoria e riduzione del volume ippocampale. Ebbene, i pazienti con depressione maggiore mostrano un'apprezzabile riduzione dei livelli sierici del

BDNF<sup>56</sup>, probabilmente a causa di una minor riduzione della proteina nell'encefalo<sup>19</sup>. Vi è inoltre un polimorfismo di un singolo nucleotide del gene del BDNF (Val66Met) che è associato ad una maggiore gravità dei sintomi depressivi e dei deficit di memoria<sup>62, 63</sup>, nonché ad un maggior rischio di tentativi di suicidio<sup>64</sup>. In genere, il trattamento mediante farmaci antidepressivi porta ad un aumento dei livelli di BDNF nel siero e nel plasma<sup>65</sup>.

Alcuni studi post-mortem hanno dimostrato che i pazienti resistenti ai trattamenti presentavano livelli di BDNF significativamente bassi, in specie in aree come l'ippocampo, che al contrario ne è in genere ricco<sup>66, 67</sup>.

Alcuni studi hanno dimostrato la riduzione dei livelli dell'mRNA del BDNF e della sua proteina su prelievi post-mortem dell'encefalo di pazienti depressi, in particolare nell'ippocampo e nell'amigdala<sup>68, 69</sup>. Un dato interessante riguarda la presenza del BDNF nelle piastrine: anche la serotonina è concentrata all'interno delle piastrine e viene rilasciata attraverso il proprio trasportatore, che è il target di alcuni farmaci antidepressivi (ossia degli inibitori selettivi del reuptake della serotonina). Nei pazienti depressi anche il livello della serotonina è ridotto, così come quello del BDNF, suggerendo quindi un nesso tra BDNF ed il rilascio di serotonina<sup>70, 71</sup>.

Tuttavia, la riduzione dei livelli sierici del BDNF è dimostrata anche in altre patologie psichiatriche, come la schizofrenia<sup>72</sup> e l'autismo<sup>73</sup>. Anche nel disturbo bipolare alcuni studi hanno rinvenuto una riduzione dei livelli plasmatici e sierici del BDNF durante gli episodi depressivi e maniaci, senza tuttavia riscontrare una diminuzione nei pazienti in stato eutimico<sup>74</sup>; inoltre, in modelli animali è stato riscontrato un aumento dei livelli del BDNF nella corteccia prefrontale e nell'ippocampo dopo trattamento farmacologico con stabilizzatori dell'umore<sup>75, 76</sup>.

Alcuni studi, esaminando campioni di tessuto encefalico di soggetti suicidi affetti da disturbo depressivo, hanno osservato una riduzione statisticamente

significativa dei livelli della proteina del BDNF e del suo recettore TrkB nell'ippocampo<sup>77</sup>, rispetto ai controlli deceduti per cause non suicide; anche il lavoro di Misztak et al.<sup>78</sup> ha evidenziato ridotti livelli di BDNF a livello dei tessuti encefalici di soggetti suicidi rispetto a controlli non suicidi, in particolare a livello di corteccia frontale e ippocampo, in accordo con i dati riportati da Zheng et al.<sup>79</sup>.

In definitiva, il BDNF è coinvolto in numerosi processi essenziali per l'individuo. Nonostante molti studi dimostrano un'alterazione dei livelli della neurotrofina in pazienti con diverse neuropatologie, non si è ancora a conoscenza dei meccanismi fisiopatologici che sottendono tali cambiamenti. Inoltre, non si è ancora certi se la variazione del livello del BDNF è causa o conseguenza della patologia stessa. Vari studi suggeriscono, tuttavia, che abbia un ruolo causativo, in quanto la popolazione avente un polimorfismo genetico del BDNF appare maggiormente suscettibile allo sviluppo di patologie psichiatriche. Il BDNF è inoltre fortemente modulato dai cambiamenti ambientali (stress, ansia, stile di vita, etc), per cui è evidente come l'attuale conoscenza su tale neurotrofina è tutt'oggi parziale e rappresenta un campo da investigare.

### **1.2.2 Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)**

Il fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale (GDNF) è una neurotrofina espressa principalmente durante lo sviluppo e la differenziazione neuronale. Nell'adulto, la sua espressione diminuisce e rimane limitata ad alcune regioni, come la corteccia, l'ippocampo, la substantia nigra, il nucleo striato<sup>80</sup>.

Il GDNF viene secreto dalle cellule gliali, inclusa la microglia, gli astrociti ed i neuroni. Il GDNF promuove la differenziazione dei neuroni dopaminergici<sup>81</sup> e serotoninergici<sup>82</sup>. Uno dei suoi ruoli più importanti, inoltre, è la protezione di alcuni neuroni (tra cui i neuroni serotoninergici del nucleo del raphe dorsale<sup>83</sup> e i neuroni dopaminergici mesencefalici<sup>84</sup>, nonché le cellule gliali<sup>85</sup>) dallo stress ossidativo e dall'infiammazione, per cui si è postulato un suo ruolo anche nella

patogenesi delle patologie neuropsichiatriche<sup>86</sup>, sebbene non vi sia un'abbondanza di studi.

Numerosi sono gli studi riguardo il GDNF e le malattie neurodegenerative, in particolar modo riguardanti il morbo di Alzheimer ed il morbo di Parkinson<sup>87</sup>.

I livelli di GDNF risultano essere ridotti nei pazienti affetti dal morbo di Alzheimer, andando ad ipotizzare un suo utilizzo come biomarker per la patologia<sup>88, 89</sup>, inoltre alcuni autori ipotizzando un'alterazione della barriera emato-encefalica, tale da poter interferire con la fisiologica azione della neurotrofina<sup>90</sup>.

Sebbene in letteratura non siano presenti molti studi relativi al coinvolgimento del GDNF nel fenomeno suicidario, vi sono evidenze che legano tale neurotrofina all'insorgenza dei disturbi dell'umore. Infatti, secondo alcuni studi i livelli di GDNF sierici risultano diminuiti nei pazienti affetti da depressione, con susseguente aumento dopo trattamento farmacologico<sup>91, 92</sup>. In uno studio post-mortem, è stato osservato un aumento del GDNF nella corteccia parietale dei pazienti con disturbo depressivo<sup>93</sup>, mentre in altri studi è stata misurata una riduzione dell'espressione del suo mRNA<sup>94</sup>.

Uno studio condotto da Miller et al.<sup>95</sup> su modelli murini ha evidenziato lo sviluppo di comportamenti riconducibili al disturbo depressivo in uno dei due gruppi; in tale gruppo, sia il livello della proteina che di trascritto del GDNF sono ridotti a livello del nucleus accumbens; le alterazioni comportamentali correlano con i livelli di espressione del GDNF e sono corrette dall'iperespressione dello stesso; inoltre, nel gruppo di topi con fenotipo depressivo, è stata riscontrata una ridotta acetilazione dell'istone H3 della regione promotrice del GDNF. Queste risultanze suggeriscono che l'espressione di GDNF possa essere predittivo dell'abilità individuale di coping, verosimilmente mediata da meccanismi epigenetici.

Nonostante le conoscenze acquisite attraverso l'analisi delle vie di segnalazione del GDNF nei neuroni periferici e nelle cellule mesencefaliche

embrionali della dopamina, i meccanismi con cui protegge i neuroni catecolaminergici del sistema nervoso centrale sono tuttora poco conosciuti.

In alcuni studi è stato ipotizzato che nel soggetto depresso vi è aumento della permeabilità della barriera emato-encefalica, tanto da consentire al GDNF localizzato nel torrente ematico di attraversarla e giungere fino all'interno del sistema nervoso centrale, ove eserciterebbe una funzione di ripristino nei confronti dei neuroni compromessi. Il rapporto tra alterazione della barriera emato-encefalica e livelli di GDNF potrebbe ricoprire un ruolo eziopatogenetico importante nello sviluppo della depressione: l'aumento del GDNF potrebbe indicare la sussistenza di una risposta compensatoria nei soggetti con disturbo depressivo maggiore<sup>96</sup>.

Come accennato in questo paragrafo, si è misurata una riduzione del livello di GDNF nella corteccia parietale. A tal proposito, è bene ricordare che i sintomi affettivi, come la regolazione delle emozioni, risultano estremamente influenzati dalla corteccia parietale<sup>97</sup>. Il meccanismo alla base dell'aumento del GDNF a livello della corteccia parietale di pazienti con disturbi affettivi non è stato ancora individuato; tuttavia, in letteratura è noto che i livelli di GDNF aumentano in risposta a danno neuronale secondario a stress cerebrale, come avviene in seguito a fenomeni ischemici o infiammatori<sup>98</sup>, il quale risulta responsabile di conseguente compromissione di resilienza e plasticità neuronale. In un precedente lavoro Michel et al.<sup>99</sup> hanno riscontrato, in talune aree corticali cerebrali e in aree cortico-limbiche di pazienti affetti da disturbi depressivi, un aumento dello stress ossidativo. Di conseguenza, si può ipotizzare che l'aumento del GDNF rappresenti una risposta adattativa e compensativa al danno neurale, che si estrinseca probabilmente attraverso le sue proprietà antiossidanti<sup>100</sup> e/o mediando l'attivazione degli astrociti e la riorganizzazione assodendritica e la sinaptogenesi locale con neuroni target<sup>101</sup>.

### 1.3 Lo stato dell'arte

Attualmente, la maggior parte degli studi sull'eventuale legame tra neurotrofine e suicidio sono effettuati *in vivo* o sul plasma<sup>102-104</sup>. Ulteriori interessanti dati potrebbero provenire da studi post-mortem effettuati direttamente sull'encefalo di soggetti suicidi. Un elemento da considerare è che la maggior parte di questi studi si focalizza sul legame tra neurotrofine e patologia neuropsichiatrica, ma di fatto non tutti i soggetti che pongono fine alla propria vita sono affette da patologia psichiatrica diagnosticata.

Pertanto, abbiamo effettuato una review della letteratura<sup>105</sup> mediante metodo PRISMA<sup>106</sup>, esaminando quindi i lavori relativi alla proteina o al gene del BDNF, nonché l'esiguo numero di lavori pubblicati sul GDNF, la cui scarsità potrebbe lasciar supporre un minore coinvolgimento nella dinamica suicidaria.

Dalla disamina della letteratura descritta, si evince che l'alterata regolazione del BDNF, come ad esempio in presenza di polimorfismo Val66Met, può favorire l'insorgenza di disturbi psichiatrici legati allo stress<sup>63, 107, 108</sup>, portando a un aumento del rischio suicidario secondo alcuni lavori<sup>64, 109</sup>, o nessuna correlazione con il suicidio, secondo un altro studio<sup>110</sup>.

Alcuni degli studi esaminanti il livello di BDNF nei prelievi post-mortem di encefalo hanno evidenziato valori ridotti rispetto ai controlli, indipendentemente dalla diagnosi psichiatrica, nella corteccia prefrontale ed ippocampo<sup>82, 83, 111, 112</sup>, nonché nell'amigdala<sup>68</sup> e nella corteccia cingolata anteriore<sup>113</sup> di soggetti affetti da disturbo depressivo maggiore. Inoltre, in uno studio<sup>114</sup> si è evidenziata anche una riduzione statisticamente significativa del BDNF nella corteccia prefrontale nel sesso femminile e nell'ippocampo nel sesso maschile. In un ulteriore studio<sup>77</sup> è stato dosato anche il recettore TrkB oltre ai livelli della proteina del BDNF, rilevandone una riduzione nell'ippocampo dei casi rispetto ai controlli, in soggetti affetti da disturbo depressivo maggiore. Alcuni autori hanno dosato anche i livelli della proteina del BDNF su sangue, rilevandone una riduzione nei soggetti suicidi<sup>115</sup>.

Anche Schneider et al.<sup>116</sup> hanno valutato soggetti affetti da sindrome depressiva, rilevando una maggiore metilazione del promotore del BDNF nella corteccia frontale, in accordo con altri studi<sup>117</sup>. Secondo un ulteriore studio<sup>118</sup>, i pattern di metilazione rinvenuti nel sangue possono riflettere quelli a livello encefalico.

In uno studio<sup>119</sup> non sono emerse differenze significative nella metilazione del DNA del BDNF dei casi rispetto ai controlli.

Un altro dato interessante, supportato da ulteriore evidenze<sup>51, 55</sup>, è che il livello cerebrale di BDNF è risultato più elevato in soggetti suicidi affetti da depressione maggiore in terapia farmacologica, rispetto ai controlli non suicidi<sup>96</sup>.

Questi Autori, riscontrando che i livelli nel sistema nervoso centrale (in particolare, a carico del liquido cefalorachidiano e dei tessuti cerebrali) e quelli periferici (plasma) di BDNF e GDNF sono strettamente correlati, hanno ipotizzato che, alla base di tale fenomeno, vi sia una disregolazione della barriera emato-encefalica che, nei disturbi depressivi, porterebbe all'aumentata permeabilità della stessa, consentendo a diverse molecole di attraversarla.

Per quanto concerne il GDNF, nello studio di Michel et al.<sup>99</sup> non è stato possibile dimostrare un incremento statisticamente significativo dei livelli di questa neurotrofina in diverse aree cerebrali dei pazienti depressi che assumevano terapia farmacologica antidepressiva.

In definitiva, i risultati di tale revisione sistematica sostengono parzialmente l'ipotesi che un livello più basso delle neurotrofine sia legato ad un aumento del rischio di suicidio, suggerendo un ruolo più incisivo del BDNF rispetto al ruolo del GDNF.

L'identificazione di un biomarker di suicidio rimane una sfida per la comunità scientifica e forense.

## 2. OBIETTIVI

Sulla base dello studio della corrente letteratura, è emersa l'assenza di marcatori utilizzabili per la diagnosi di *rischio suicidario*. La presenza di un marcatore sensibile e facilmente dosabile potrebbe essere uno strumento indispensabile per lo *screening* dei soggetti a rischio, ad esempio pazienti affetti da depressione maggiore, disturbo di ansia generalizzata, tossicodipendenti, etc.

Inoltre, vi sono pochi dati sperimentali derivati da studi su campioni biologici di origine autoptica.

L'obiettivo del presente studio è quello di analizzare la correlazione tra suicidio e grado di espressione del BDNF e del GDNF, neurotrofine sempre più interessanti e promettenti nel panorama scientifico, su prelievi autoptici in determinate aree cerebrali, in maniera tale da valutarne il ruolo come marker neurobiologico predittivo del rischio suicidario, con eventuali rilevanti ripercussioni in ambito clinico-psichiatrico e medico-legale. In particolare, tali fattori neurotrofici potrebbero avere un ruolo rilevante sia nella prevenzione di eventi suicidari nella popolazione a rischio più elevato per comportamenti anticonservativi, permettendo di adoperarsi precocemente per limitare preventivamente tale rischio, sia nella ricerca di un nuovo potenziale target farmacologico. Infine, stante l'estrema scarsità di studi che hanno esaminato l'espressione del GDNF nei soggetti suicidi, la presente tesi si prefigge anche lo scopo di essere il primo studio a valutare l'espressione di tale neurotrofina in tessuti cerebrali post-mortem di soggetti suicidi, confrontandola con quella rinvenuta nei campioni autoptici di soggetti deceduti per cause non suicidarie, al fine di evidenziare un suo eventuale coinvolgimento nel comportamento suicidario.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 LA CASISTICA**

La casistica utilizzata nel presente studio fa riferimento alle morti giunte all'osservazione della Medicina Legale delle Università di Foggia e di Ferrara nel periodo 2020-2022. Si è quindi effettuato uno studio retrospettivo su un campione di soggetti deceduti a seguito di episodio suicidario.

Il campione di soggetti analizzati nello studio è rappresentata da una serie di 20 cadaveri deceduti a seguito di atto suicidario tra novembre 2020 e marzo 2023, nonché da 10 casi-controllo deceduti per cause naturali, sottoposti ad esame autoptico.

Sono stati esclusi dallo studio i cadaveri in avanzato stadio di decomposizione ed i cadaveri positivi allo screening per le comuni droghe di abuso. Nei campioni in cui era nota l'assunzione di farmaci, gli stessi sono stati dosati e rinvenuti a dosaggi terapeutici.

Per ciò che riguarda i controlli, sono stati selezionati e scelti tra i soggetti deceduti per cause naturali o traumatiche, privi di anamnesi psichiatrica e di storia di abuso di alcool o droghe, negativi alle analisi tossicologiche.

Al fine di riassumere brevemente le principali fasi del presente studio, occorre specificare che sono state eseguite le seguenti procedure:

- Analisi della documentazione sanitaria del soggetto, con particolare riferimento all'anamnesi psichiatrica e alle eventuali terapie farmacologiche.
- Esame autoptico completo con accertamenti istologici.
- Prelievo di materiale ematico periferico al fine di studiare la concentrazione di eventuali sostanze stupefacenti e/o farmacologiche a effetto psicoattivo.

- Prelievo dell'encefalo *in toto* e successiva fissazione in soluzione formolica.
- Campionamento di parenchima cerebrale ottenuto da corteccia prefrontale, giro del cingolo, ippocampo, nuclei della base.
- Processazione dei campioni mediante tecnica immunohistochimica con utilizzo di anticorpi anti-BDNF e anti-GDNF in tali sedi.
- Lettura del preparato mediante microscopia ottica e interpretazione dei dati ricavati.

I soggetti suicidi sono stati selezionati sulla base dei dati anamnestici a disposizione. In particolare, sono stati reclutati: soggetti che, all'anamnesi, non presentavano alcuna diagnosi di disturbo psichiatrico, individui affetti da disturbo depressivo, soggetti che presentavano altra patologia psichiatrica. Dei 20 casi considerati, si precisa che 6 individui non presentavano alcuna diagnosi di disturbo psichiatrico, tuttavia erano stati coinvolti in eventi recenti particolarmente critici e stressanti (lutto, perdita del lavoro, detenzione). I restanti 14 casi, invece, presentavano una patologia psichiatrica nota; di questi, 6 erano affetti da disturbi dell'umore (5 da disturbo depressivo maggiore, 1 da disturbo bipolare), 8 da altri tipi di patologia psichiatrica diagnosticata (gioco d'azzardo patologico, disturbo da uso di sostanze, uso problematico di alcol, disturbo dello spettro autistico, autolesionismo, disturbo dell'adattamento).

In tutti i casi considerati, sui campioni di fluidi biologici e frammenti organici, prelevati in sede autoptica, sono state eseguite analisi tossicologiche per testare le principali sostanze stupefacenti d'abuso, nonché i più comuni principi attivi farmacologici. Si sottolinea che, al fine di escludere l'eventuale influenza di principi attivi psicofarmacologici sull'espressione di BDNF e GDNF, sono stati esclusi a priori gli individui sottoposti a terapia con farmaci antidepressivi e/o antipsicotici, ovvero risultati positivi a sostanze stupefacenti e/o psicoattive alle analisi tossicologiche eseguite in sede autoptica. Per completezza occorre

precisare che, tuttavia, 3 dei 20 soggetti studiati assumevano regolarmente solo blanda terapia a base di farmaci non neurolettici né antidepressivi (principalmente benzodiazepine) i cui principi attivi, in base alle risultanze delle analisi tossicologiche, risultavano comunque ricompresi nel range di dosaggio terapeutico (indicati con \* nella tabella sottostante). Si sottolinea, inoltre, che 5 dei 20 casi analizzati erano soggetti sottoposti a regime detentivo.

Sono stati esclusi i soggetti affetti da patologie neurodegenerative, malattia di Alzheimer e malattia di Parkinson

La casistica pertanto è schematizzata come di seguito.

<b>N°</b>	<b>Sesso</b>	<b>Età</b>	<b>Metodo</b>	<b>Anamnesi psichiatrica</b>	<b>Pregressi tentativi di suicidio</b>	<b>Terapia farmacologica</b>
1	M	40	Lesione d'arma da fuoco	Gioco d'azzardo patologico	No	No
2	M	36	Impiccamento	Riferita perdita del lavoro	No	No
3	F	39	Precipitazione	Anoressia nervosa e disturbo bipolare	No	No*
4	M	40	Precipitazione	Disturbo da uso di sostanze	No	No
5	M	21	Precipitazione	Etilismo	No	
6	M	56	Impiccamento	Disturbo depressivo maggiore	No	No
7	M	37	Impiccamento	Disturbo da uso di sostanze	No	No
8	M	24	Precipitato	Disturbo dello spettro autistico	No	No
9	M	65	Impiccamento	Disturbo depressivo maggiore	No	No
10	M	35	Impiccamento	Disturbo da uso di sostanze In regime detentivo	No	No*
11	M	42	Impiccamento	Non diagnosticata In regime detentivo	No	No
12	M	46	Impiccamento	In regime detentivo	Si	No
13	M	35	Impiccamento	Disturbo dell'adattamento In regime detentivo	Si	No*
14	M	89	Arma da taglio	Non diagnosticata	Si	No
15	M	36	Impiccamento	In regime detentivo	No	
16	F	22	Impiccamento	Autolesionismo Storia di abusi in età infantile	No	No
17	M	58	Impiccamento	Disturbo depressivo maggiore	No	No
18	M	85	Arma da taglio	Riferito pregresso evento luttuoso	No	No
19	M	62	Impiccamento	Disturbo depressivo maggiore	No	No
20	M	84	Impiccamento	Disturbo depressivo maggiore	No	No

### **3.2 IL CAMPIONAMENTO**

Per ogni caso si è proceduto al prelievo *in toto* dell'encefalo durante l'esame autoptico, con opportuna conservazione in soluzione formolica.

Dopo 21 giorni sono state effettuate le operazioni di campionamento: l'encefalo è stato sezionato mediante tagli sagittali, individuando e prelevando quattro aree di interesse dall'emisfero destro, ossia la corteccia prefrontale, il giro del cingolo, i nuclei della base e l'ippocampo.

Per ogni area è stata ricavata una sezione dello spessore di 4  $\mu\text{m}$ , che è stata inclusa in paraffina e colorata utilizzando protocolli standard<sup>120</sup>.

Tutti i campioni ottenuti sono stati trattati mediante colorazione immunohistochimica (IHC) per gli anticorpi anti-BDNF e anti-GDNF, così da procedere alla ricerca delle neurotrofine.

### **3.3 LE INDAGINI IMMUNOISTOCHIMICHE**

Per il presente studio la colorazione con metodo immunohistochimico è stata eseguita su campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

Le sezioni di tessuto sono state immerse in successione in vaschette contenenti xilene, due bagni della durata di 20 minuti ciascuno, quindi due bagni alcool 100% da 5 minuti ciascuno, poi in alcool 90% per 5 minuti, a seguire un bagno da 20 minuti in alcool 90% e perossido di idrogeno, poi sono stati immersi in alcool 70% per altri 5 minuti ed infine passati brevemente in acqua distillata.

Successivamente i vetrini sono stati lavati con tampone fosfato salino (PBS), per poi essere coperti con acqua ossigenata al 3% per 15 minuti a temperatura ambiente. Tale passaggio risulta necessario per inibire la perossidasi endogena (che, essendo l'enzima che viene utilizzato, potrebbe portare alla presenza di falsi positivi). I vetrini sono stati nuovamente lavati con PBS e si è proceduto allo smascheramento antigenico mediante l'acido

etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0,25 mM e riscaldamento in forno a microonde a 650 W per due cicli di 5' ciascuno.

Dopo tali passaggi è stato utilizzato un siero di blocco BSA (Albumina Sierica Bovina), per 15 minuti. L'utilizzo del BSA è necessario per mantenere costante il pH dei tessuti ed è prodromico all'utilizzo dell'anticorpo primario. Al termine, si elimina l'eccesso di BSA senza risciacquo del vetrino.

A tal punto, si è proceduto ad aggiungere l'anticorpo primario (BDNF o GDNF) con diluzione ad 1:500 e lasciato incubare per 2 ore a temperatura ambiente.

Il complesso Antigene-Anticorpo formatosi nella reazione immune non è di per sé visibile. Pertanto, si rende necessario l'utilizzo di marcatori che direttamente o indirettamente possono evidenziarne la formazione. A tal proposito, la tecnica utilizzata prevede l'uso di enzimi legati all'anticorpo secondario, al fine di evidenziare la formazione del complesso immune. Questo catalizza la formazione di un precipitato colorato e insolubile, visibile al microscopio, nel sito in cui è avvenuta la reazione Ag-Ab.

Dopo aver utilizzato l'anticorpo primario, si è effettuato un ulteriore lavaggio con PBS, al fine di eliminarne l'eccedenza. Il vetrino è stato incubato con l'anticorpo secondario biotinitato per 15' a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore lavaggio il preparato è stato incubato con il complesso Streptoavidina-Perossidasi per 15' a temperatura ambiente ed infine ulteriormente lavato con PBS, al termine del quale si è aggiunto il cromogeno DAB.

Dopo viraggio della DAB, i vetrini sono stati immersi in ematossilina per 1', quindi risciacquati abbondantemente in acqua di fonte in modo da permetterne il viraggio, quindi sono stati rapidamente disidratati immergendoli in bagni successivi di: alcool 95%, alcool 100% e xilolo.

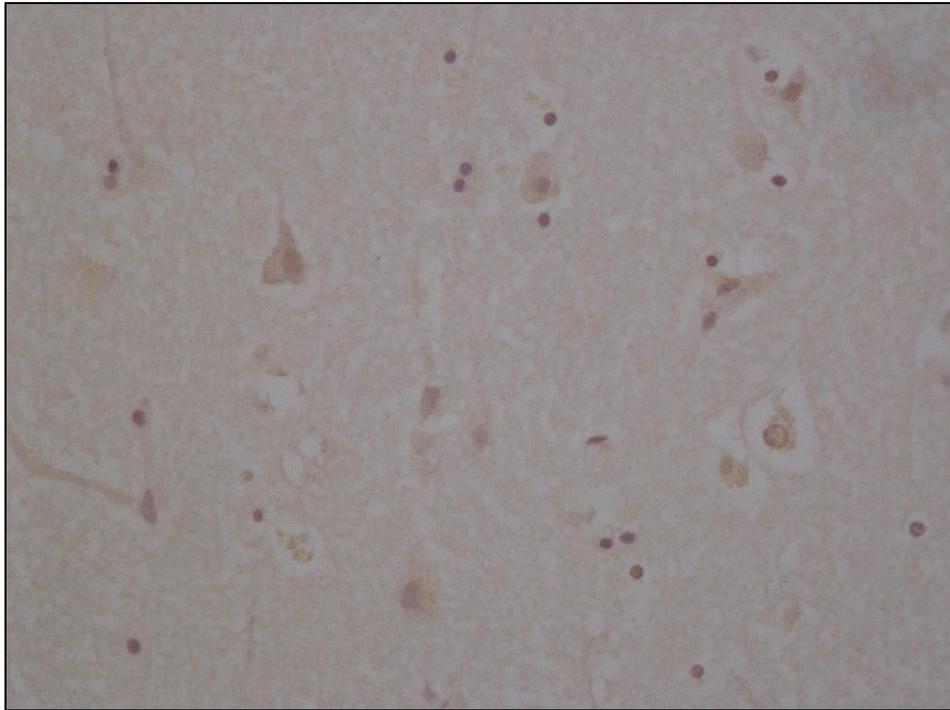
Terminata questa procedura si è proceduto a montaggio del vetrino ed all'osservazione in microscopia ottica. Il microscopio ottico utilizzato è il Nikon Eclipse E90i, mediante il programma NIS – Elements F. Le immagini sono state

acquisite mediante una macchina fotografica digitale (Nikon) collegata al microscopio ad ingrandimento 40x. I parametri per l'acquisizione delle immagini sono stati stabiliti all'inizio dell'osservazione e mantenuti costanti per tutte le immagini. La quantificazione delle cellule positive alla colorazione con DAB è stata effettuata usando il software Image J ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)) ed espressa come numero di cellule positive colorate per area analizzata.

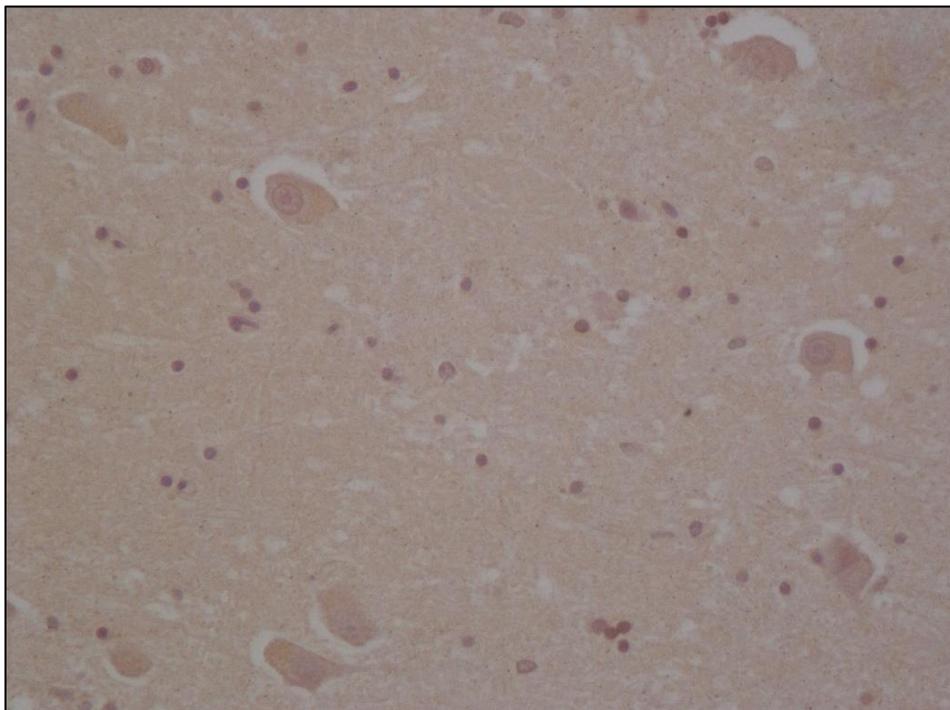
### **3.4 L'ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Windows GraphPad Prism 10 per Windows (La Jolla, CA, USA). I dati sono stati sottoposti a test di verifica dell'omogeneità delle varianze di Barlett, successivamente analizzati mediante sistema analitico della varianza di Kruskal-Wallis – one-way ANOVA (ANOVA a una via), seguito da correzione mediante test di Dunn per confronti multipli, in caso di 3 o più fattori indipendenti, ovvero attraverso sistema analitico two-way ANOVA (ANOVA a due vie) per 2 fattori indipendenti. Un valore  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. I risultati sono espressi come medie  $\pm$  la deviazione standard nei grafici. Le deviazioni standard sono indicate nella sezione Risultati.

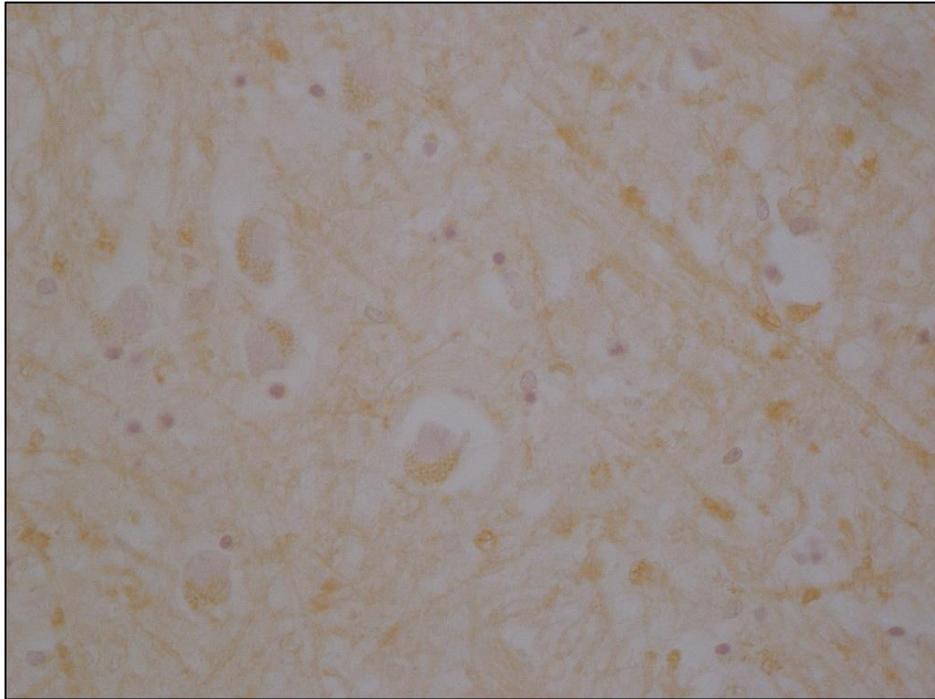
## 4. RISULTATI



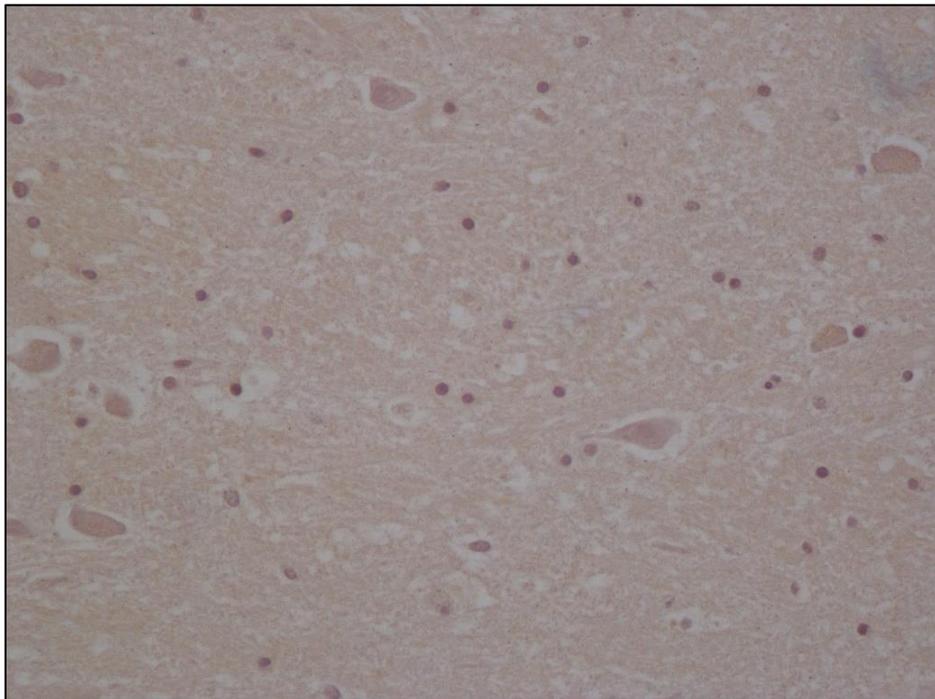
*Figura 2. BDNF su corteccia prefrontale di un campione*



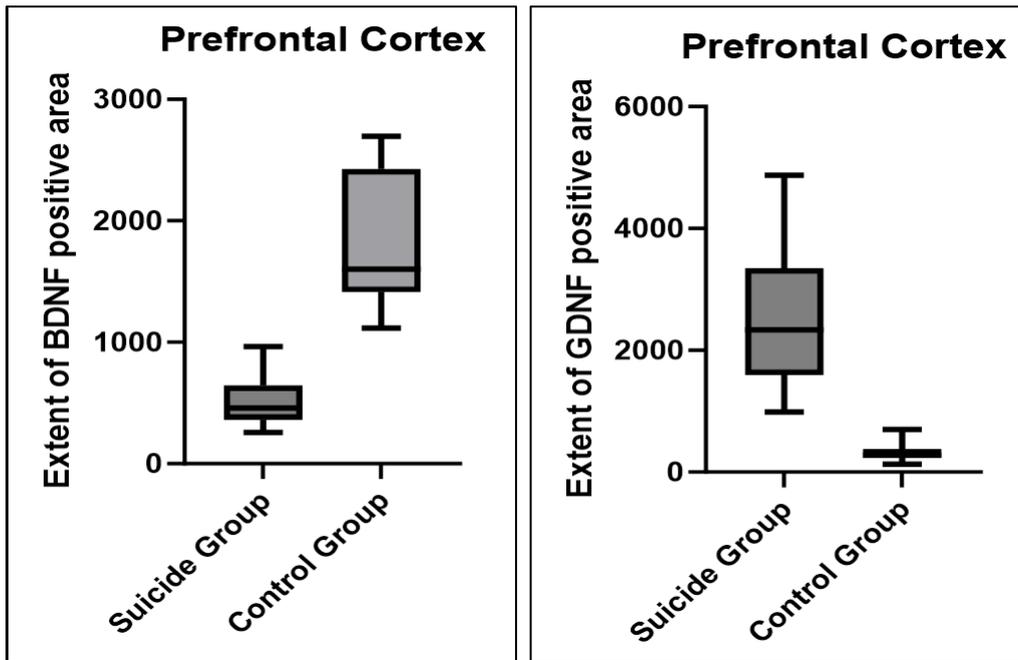
*Figura 3. BDNF su corteccia prefrontale di un controllo*



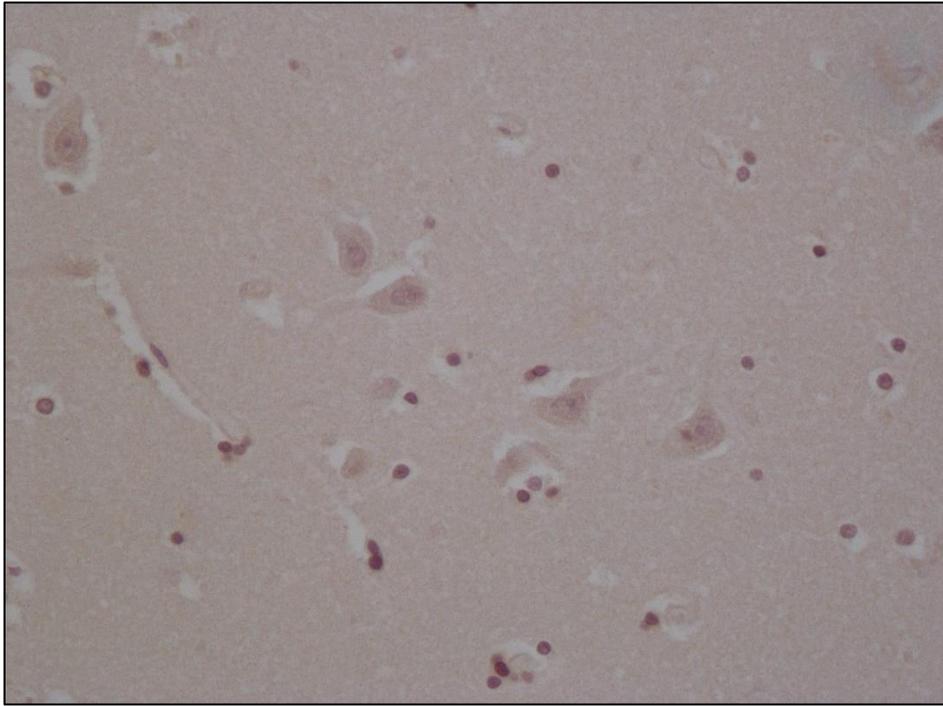
*Figura 4. GDNF su corteccia prefrontale di un campione*



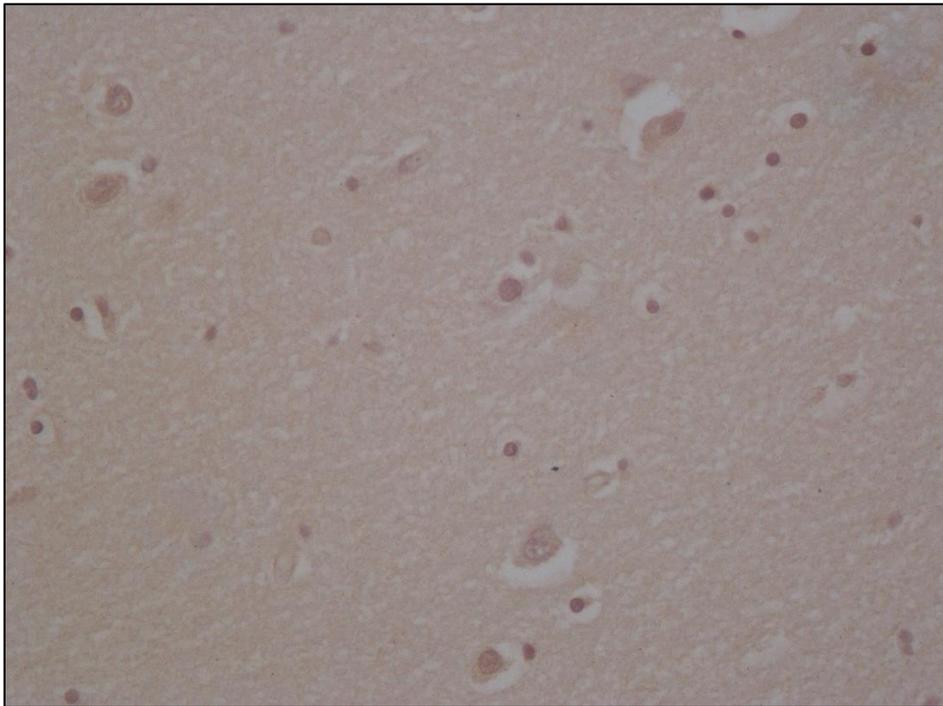
*Figura 5. GDNF su corteccia prefrontale di un controllo*



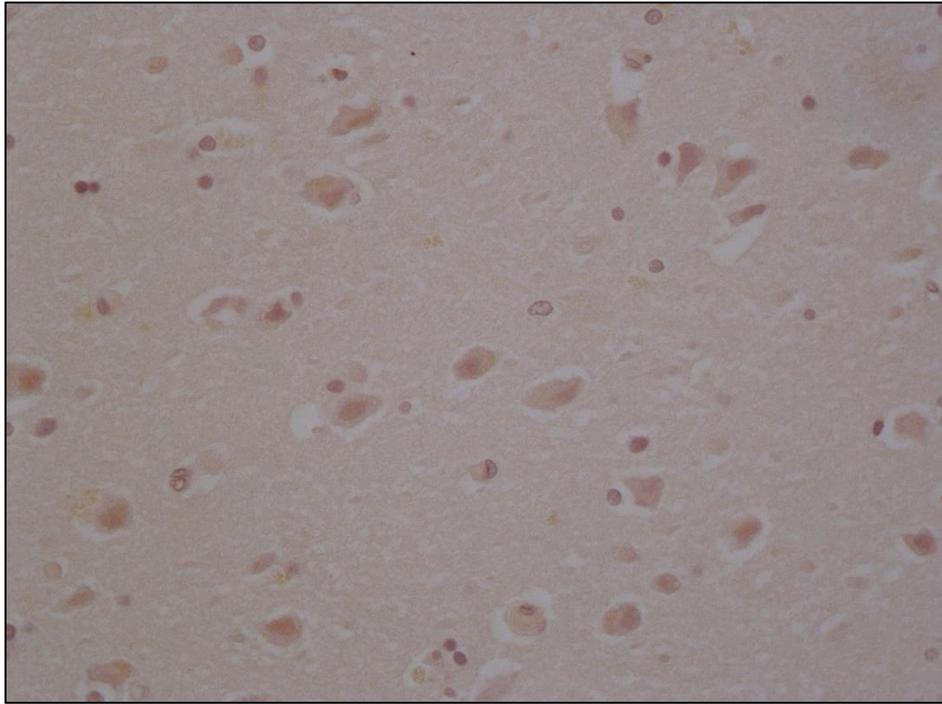
*Corteccia prefrontale.* L'ANOVA a due vie ha evidenziato una differenza statisticamente significativa in entrambi in casi ( $p < 0.0001$ ). In particolare, si è notata una ridotta espressione del BDNF nei casi di suicidio rispetto ai controlli, mentre l'espressione del GDNF risulta aumentata nei casi rispetto ai controlli.



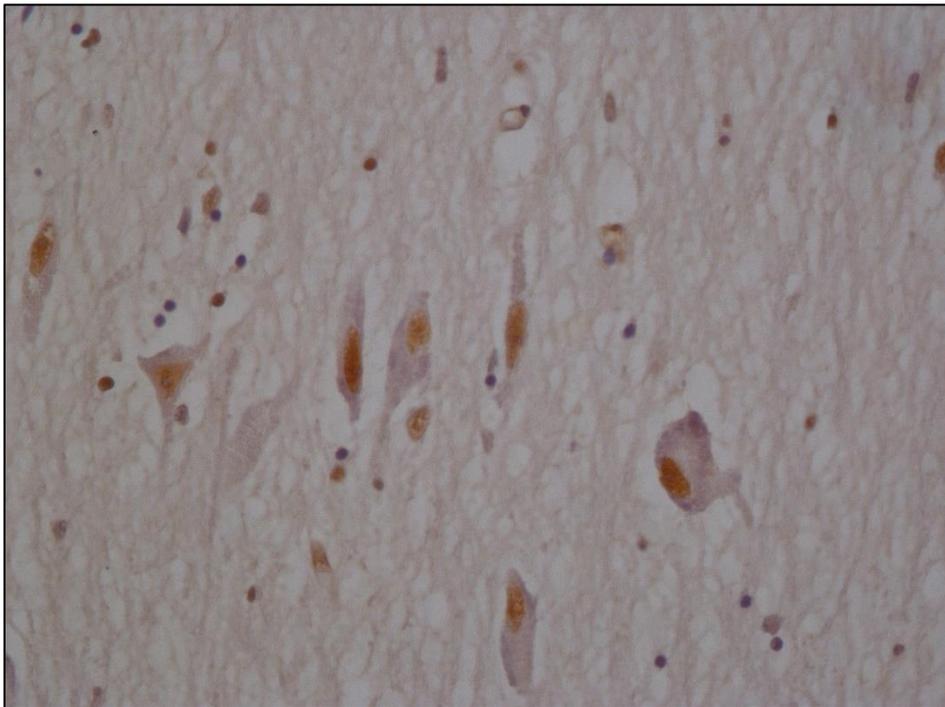
*Figura 6. BDNF su ippocampo di un campione*



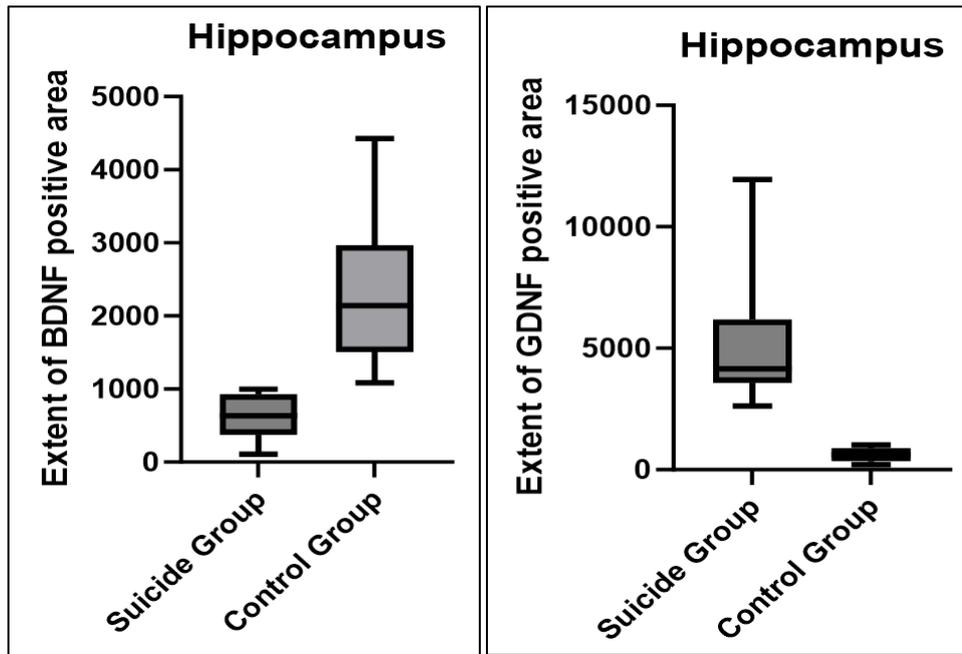
*Figura 7. BDNF su ippocampo di un controllo*



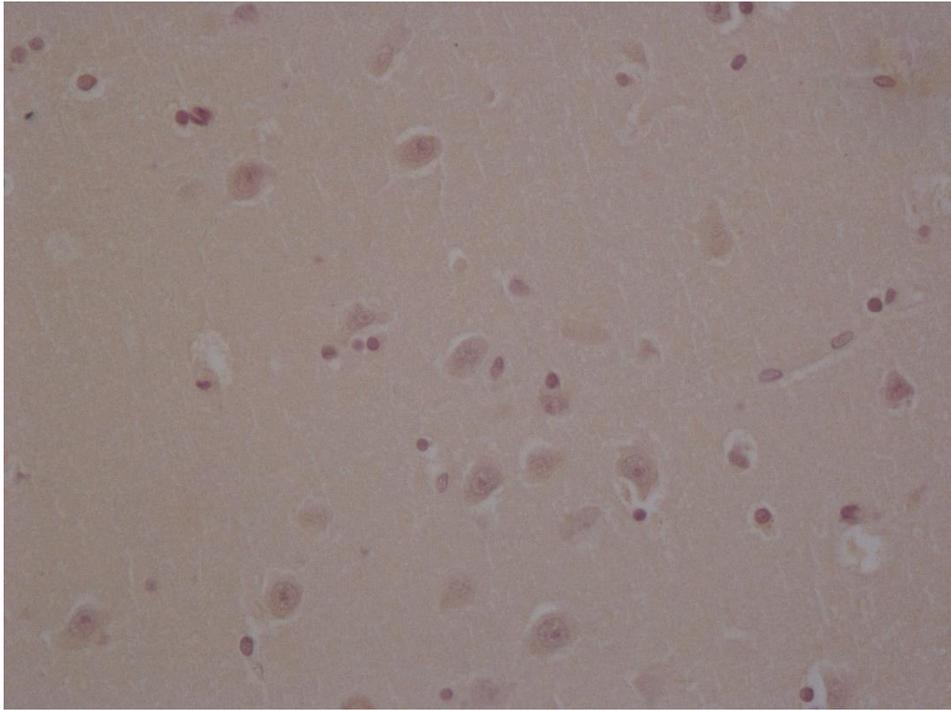
*Figura 8. GDNF su ippocampo di un caso*



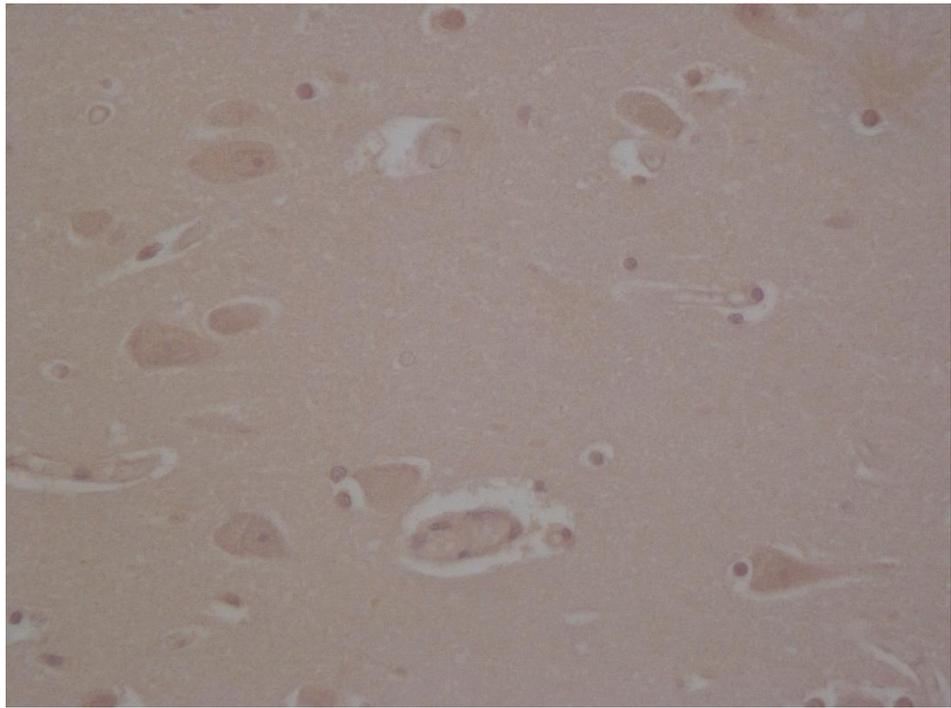
*Figura 9. GDNF su ippocampo di un controllo*



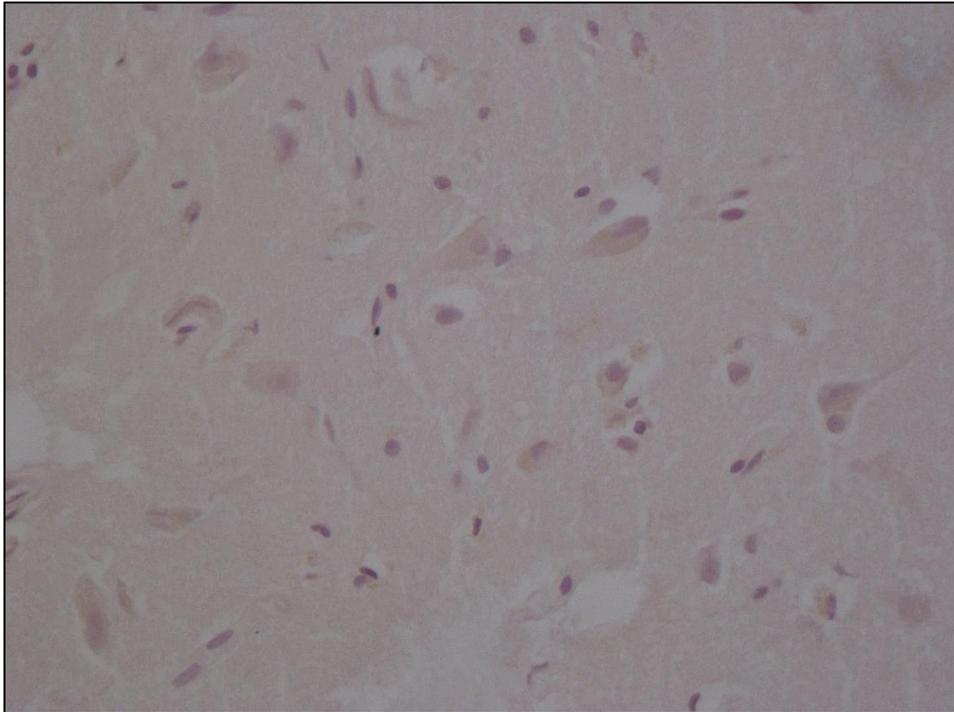
**Ippocampo.** L'ANOVA a due vie ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nell'espressione del BDNF ( $p < 0.001$ ) e del GDNF ( $< 0.0001$ ). In particolare, si è notata una ridotta espressione del BDNF nei casi di suicidio rispetto ai controlli, mentre l'espressione del GDNF risulta aumentata nei casi rispetto ai controlli.



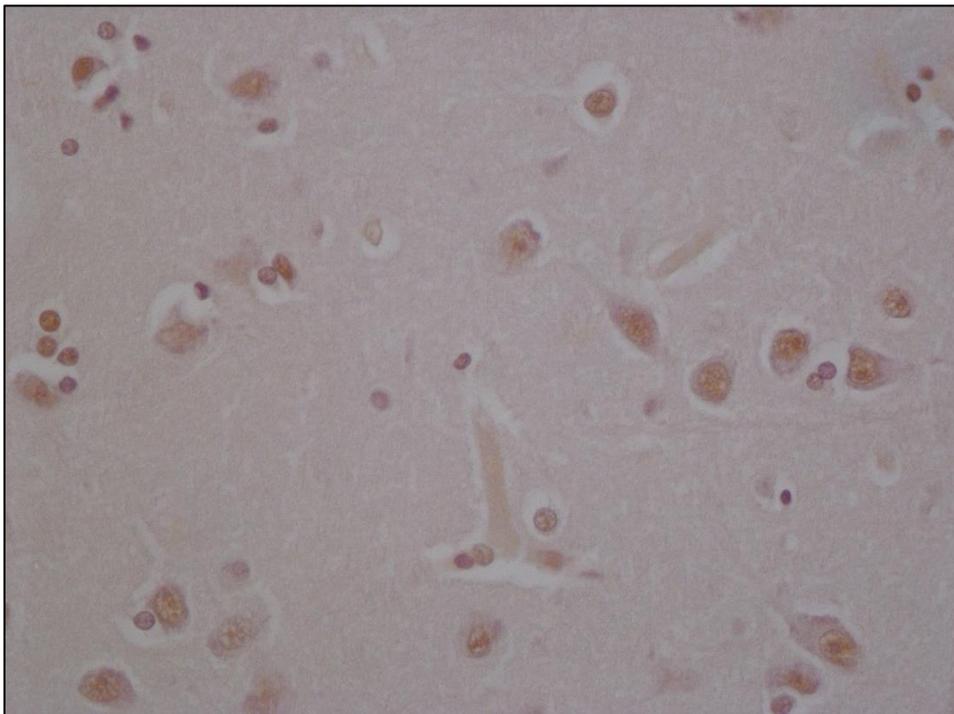
*Figura 10. BDNF su giro del cingolo di un caso*



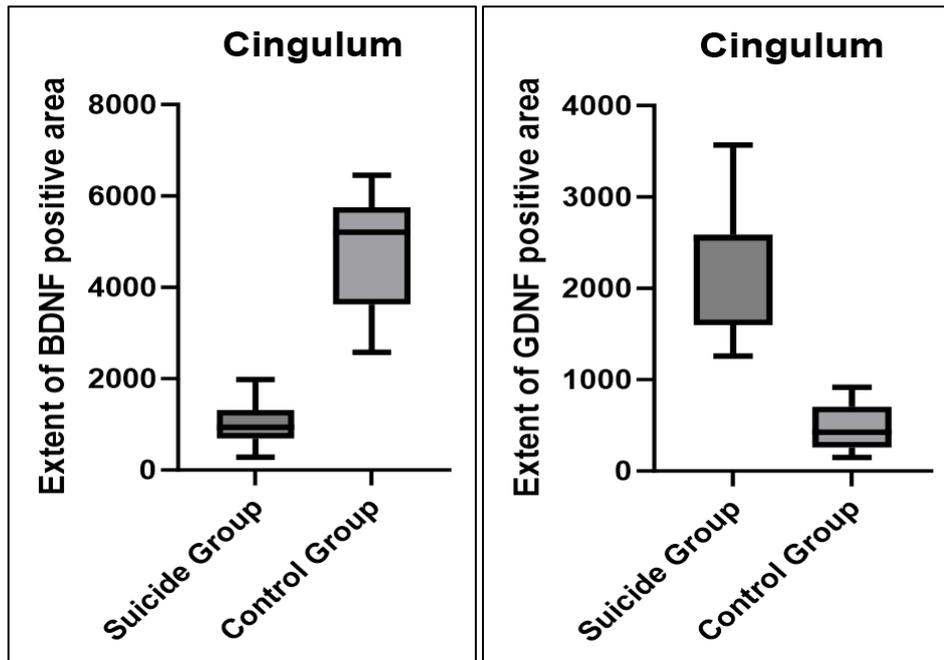
*Figura 11. BDNF su giro del cingolo di un controllo*



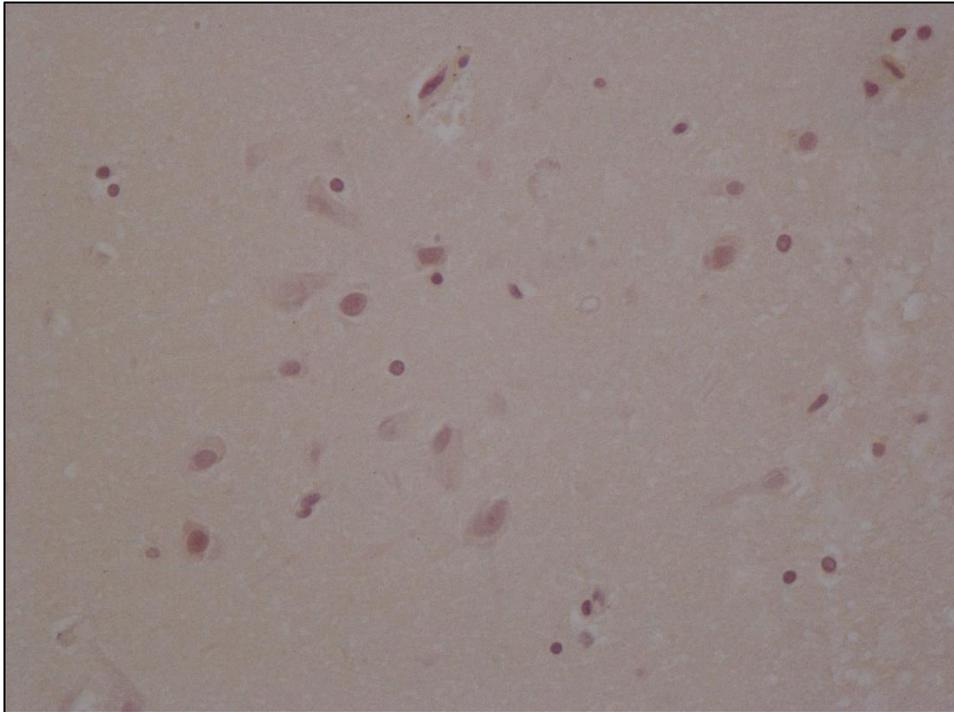
*Figura 12. GDNF su giro del cingolo di un caso*



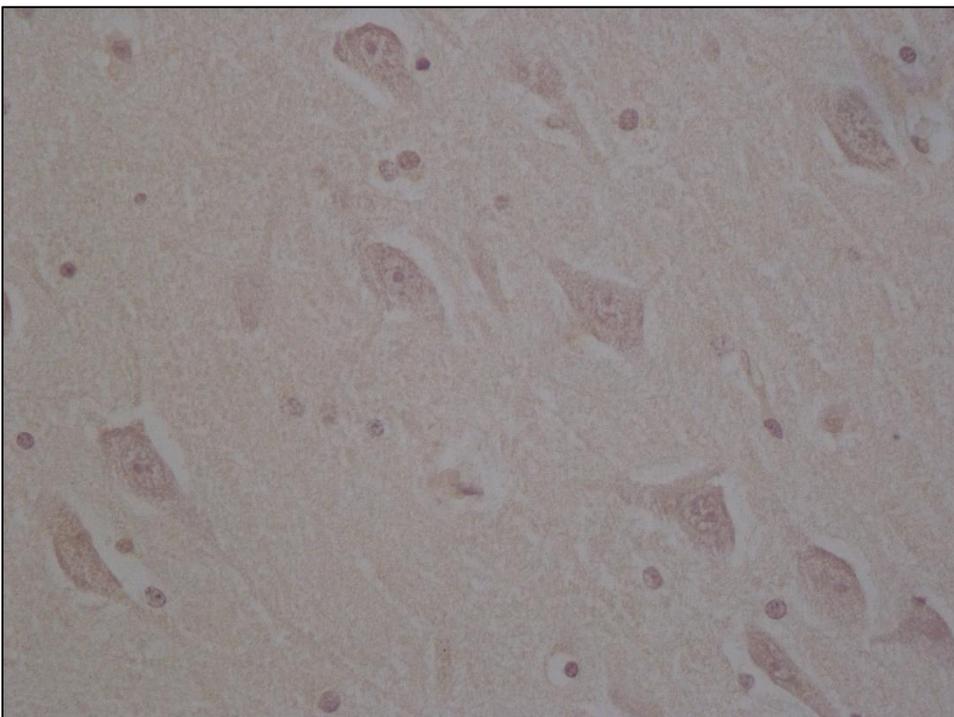
*Figura 13. GDNF su giro del cingolo di un controllo*



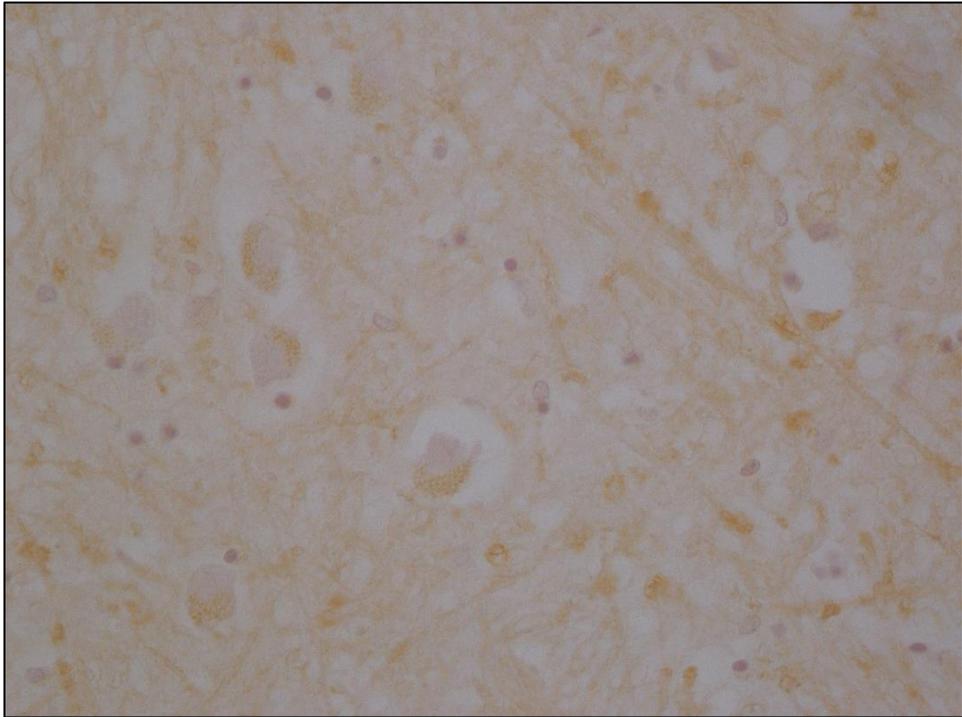
**Giro del cingolo.** L'ANOVA a due vie ha evidenziato una differenza statisticamente significativa in entrambi in casi ( $p < 0.0001$ ). In particolare, si è notata una ridotta espressione del BDNF nei casi di suicidio rispetto ai controlli, sebbene meno spiccata rispetto alle altre aree esaminate. Anche in questo caso l'espressione del GDNF risulta aumentata nei casi rispetto ai controlli.



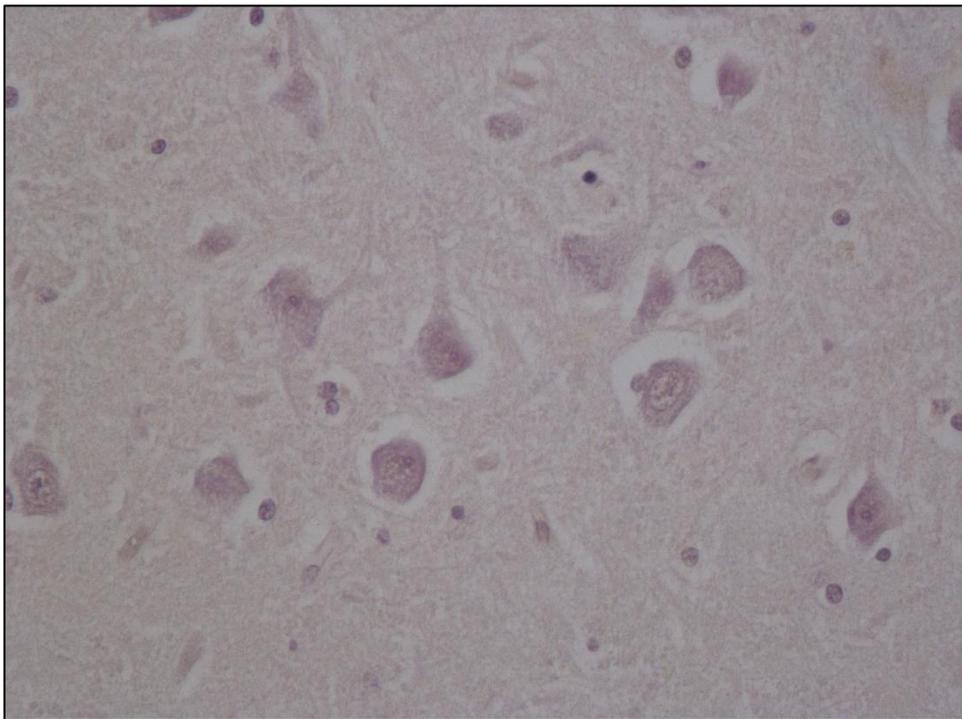
*Figura 14. BDNF su nuclei della base di un caso*



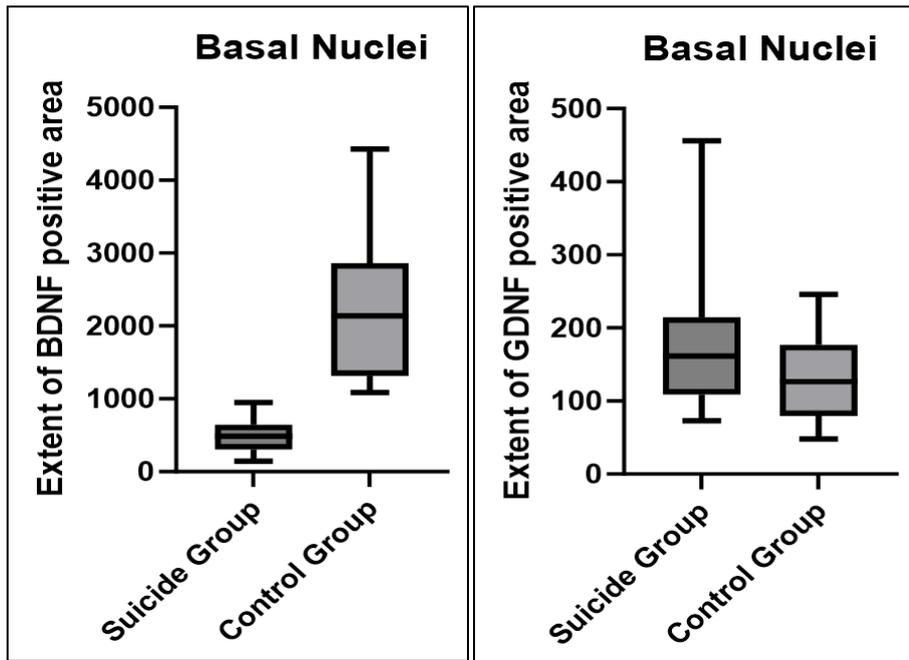
*Figura 15. BDNF su nuclei della base di un controllo*



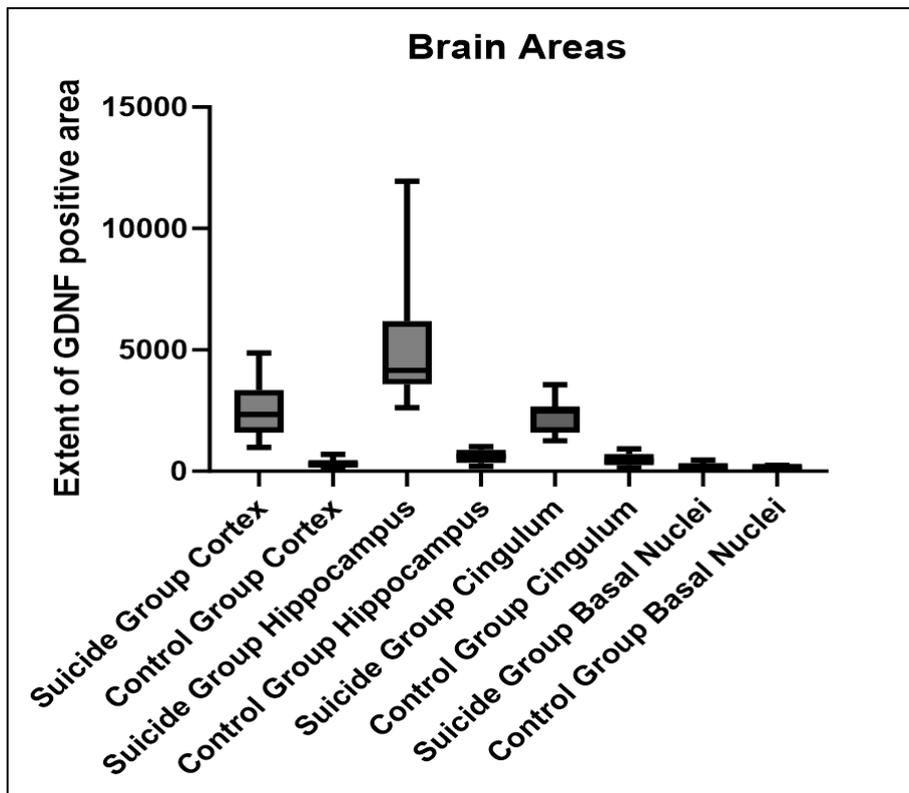
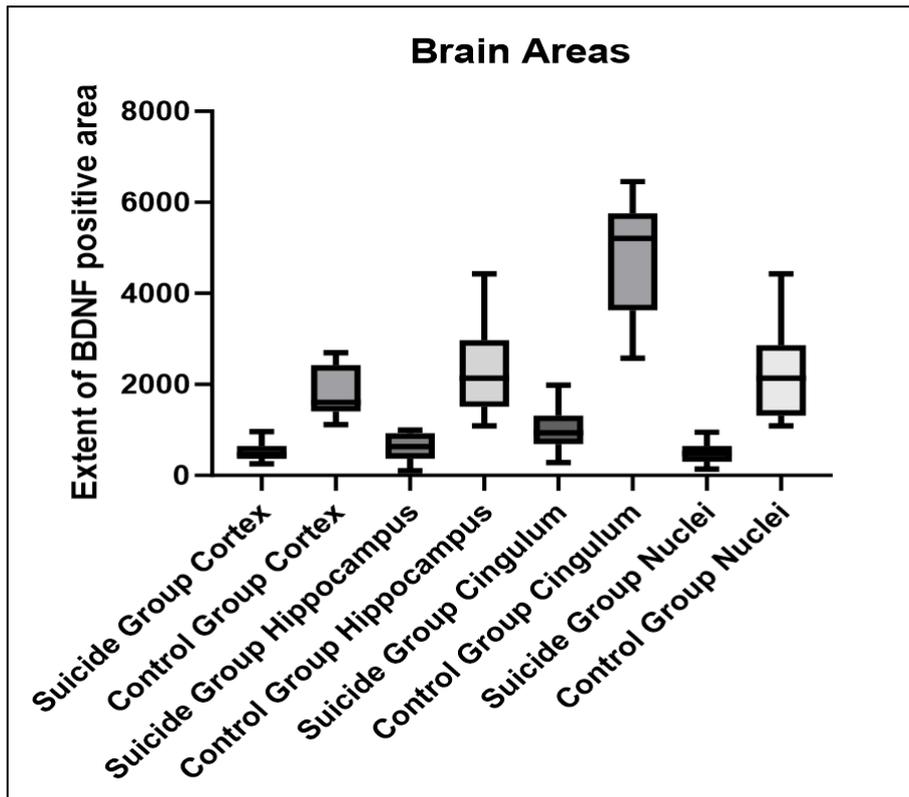
*Figura 16. GDNF su nuclei della base di un caso*



*Figura 17. GDNF su nuclei della base di un controllo*



*Nuclei della base.* L'ANOVA a due vie ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nell'espressione del BDNF ( $p < 0.001$ ), mentre non sono state evidenziate differenze statisticamente significative nel GDNF ( $p < 0.1$ ). In particolare, si è notata una ridotta espressione del BDNF nei casi di suicidio rispetto ai controlli. Si è osservato un minimo aumento dell'espressione del GDNF nei casi rispetto ai controlli.



**Brain areas.** L'ANOVA ad una via ha evidenziato una differenza statisticamente significativa in entrambi in casi ( $p < 0.0001$ ). Si è osservata una riduzione dell'espressione del BDNF in tutte le aree cerebrali dei casi di suicidio rispetto

ad i controlli, in particolar modo nell'ippocampo. L'espressione del GDNF altresì è risultata aumentata in tutte le aree dei casi rispetto ad i controlli, in particolar modo dell'ippocampo, ad eccezione dei nuclei della base, ove non si sono riportate differenze statisticamente significative tra i due gruppi.



osservata una riduzione dell'espressione del BDNF in tutte le aree cerebrali dei casi di suicidio sia nei soggetti affetti da disturbo dell'umore che dei soggetti affetti da altre patologie psichiatriche, rispetto ad i controlli. L'espressione del GDNF altresì è risultata aumentata in maniera uniforme.

## 5. CONCLUSIONI

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di valutare nei tessuti encefalici di pazienti deceduti per suicidio, mediante tecnica immunoistochimica, l'espressione di due fattori neurotrofici, il GDNF e il BDNF, di notevole recente interesse scientifico, stante la verosimile correlazione al rischio suicidario. L'eventuale impiego di tali fattori, in ambito clinico, nel ruolo di marker neurobiologici predittori del rischio suicidario potrebbe consentire, difatti, la stratificazione del rischio di eventi suicidari nelle popolazioni aventi fattori di rischio specifici. Queste neurotrofine potrebbero essere utilizzate, inoltre, come potenziali target farmacologici utili per ricercare e sviluppare nuove terapie mirate.

Il campione preso in esame nel nostro studio era composto da 20 soggetti deceduti per suicidio e 10 controlli deceduti per cause non suicidarie, appaiati per sesso ed età, sottoposti ad esame autoptico, nell'ambito dell'attività di settore dell'Istituto di Medicina Legale di Foggia e Ferrara, nel periodo di tempo compreso tra il 2020 e il 2022.

Di questi individui, il 90% era di sesso maschile (18 su 20), 10% femminile (2 su 20); 13 di essi (65%) avevano meno di 50 anni, 7 (35%) oltre 50 anni. Inoltre, 6 individui su 20 (30%) non presentavano alcuna diagnosi di disturbo psichiatrico, tuttavia erano stati coinvolti in eventi recenti particolarmente critici e stressanti, ad esempio eventi luttuosi, perdita del lavoro, detenzione. I restanti 14 casi (70%), invece, presentavano una patologia psichiatrica; di questi, 6 erano affetti da disturbi dell'umore (5 da disturbo depressivo maggiore, 1 da disturbo bipolare), 8 da altri tipi di patologia psichiatrica diagnosticata (gioco d'azzardo patologico, disturbo da uso di sostanze, uso problematico di alcol, disturbo dello spettro autistico, autolesionismo, disturbo dell'adattamento). Si sottolinea nuovamente, inoltre, che 5 dei 20 casi analizzati (25%) erano soggetti sottoposti a regime detentivo, altro fattore di rischio.

Allo scopo di escludere l'eventuale influenza di principi attivi psicofarmacologici sull'espressione di BDNF e GDNF, sono stati esclusi a priori gli individui sottoposti a terapia con farmaci antidepressivi e/o antipsicotici, ovvero risultati positivi a sostanze stupefacenti e/o psicoattive alle analisi tossicologiche eseguite in sede autoptica. Per completezza occorre sottolineare che 3 dei 20 soggetti studiati assumevano regolarmente solo blanda terapia a base di farmaci non neurolettici né antidepressivi (principalmente benzodiazepine) i cui principi attivi, in base alle risultanze delle analisi tossicologiche, risultavano comunque ricompresi nel range di dosaggio terapeutico.

In riferimento alle modalità suicidarie impiegate, 11 su 20 soggetti (55%) hanno portato a termine il comportamento anticonservativo mediante impiccamento (metodica più utilizzata, secondo i dati della letteratura<sup>121</sup>), 4 su 20 (20%) per precipitazione, 2 su 20 (10%) per mezzo di lesioni da arma da taglio, 2 su 20 (10%) mediante annegamento e 1 su 20 (5%) per mezzo di lesioni da arma da fuoco.

Il suicidio per overdose, che rappresenta il 60% dei suicidi maschili nel mondo e il 30% di quelli femminili, non è stato da noi preso in considerazione in quanto abbiamo voluto escludere volontariamente i soggetti risultati positivi alle analisi tossicologiche per evitare influenze di principi attivi farmacologici ovvero sostanze psicoattive sull'espressione di BDNF e GDNF.

Lo studio dell'espressione di queste due neurotrofine nei tessuti cerebrali prelevati post-mortem in soggetti deceduti per suicidio è scaturito dalla osservazione, in letteratura, di livelli alterati delle stesse in soggetti non suicidi affetti da disturbi psichiatrici, rispetto alla popolazione di controllo.

Le risultanze del nostro lavoro, che ha utilizzato una metodica immunoistochimica, ampiamente utilizzata nell'ambito della patologia forense<sup>122</sup>, hanno evidenziato una riduzione statisticamente significativa dei livelli del BDNF nelle diverse regioni encefaliche esaminate in tutti i 20 soggetti suicidi, da noi studiati, rispetto ai 10 controlli deceduti per cause non suicidarie.

In particolare, la riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) da noi riscontrata a livello di corteccia prefrontale, giro del cingolo e, in misura minore anche se ancora statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ), ippocampo e nuclei della base, risulta in accordo con i dati della letteratura<sup>111-113,123,124</sup>, che riportano diminuzioni significative dei livelli di BDNF nella corteccia prefrontale, ippocampo e giro del cingolo. Inoltre, è interessante considerare che l'esame globale delle diverse aree cerebrali ha evidenziato una riduzione del BDNF nei soggetti suicidi, rispetto ai controlli, statisticamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

Per quanto concerne il fattore neurotrofico GDNF, abbiamo evidenziato una aumentata espressione di questa proteina nei tessuti cerebrali dei 20 soggetti suicidi oggetto di studio rispetto ai 10 controlli. In particolare, abbiamo osservato a livello di corteccia prefrontale, ippocampo e giro del cingolo un aumento del GDNF statisticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) nei soggetti suicidi rispetto ai controlli. A livello dei nuclei della base dei soggetti suicidi, invece, era presente un lieve incremento nei livelli di GDNF rispetto ai controlli che non è risultato, tuttavia, statisticamente significativo. È interessante considerare che l'esame globale delle diverse aree cerebrali ha evidenziato un incremento del GDNF nei soggetti suicidi, rispetto ai controlli, significativo dal punto di vista statistico ( $p < 0.0001$ ). La nostra ricerca è unica, oltre a quella di Michel et al.<sup>93</sup> sullo studio dell'espressione del GDNF direttamente a livello di talune aree encefaliche, nonché la prima che ha eseguito lo studio in soggetti deceduti per suicidio non sottoposti a terapia farmacologica con antidepressivi e/o antipsicotici. I pochi studi presenti in letteratura sul GDNF, difatti, hanno valutato la sua concentrazione nel sangue periferico di pazienti con disturbi depressivi o, più in generale, dell'umore.

I risultati del nostro studio sono in accordo anche con i dati di un lavoro di Rosa et al.<sup>125</sup>, che ha riportato un aumento dei livelli del GDNF nel sangue periferico di pazienti affetti da disturbo bipolare in concomitanza di episodi depressivi acuti. Gli Autori hanno ipotizzato che l'aumentata sintesi del GDNF

potrebbe essere una caratteristica degli episodi acuti dei disturbi dell'umore in generale, sebbene vi siano discrepanze con altri studi<sup>94, 126</sup>.

In aggiunta, nella presente tesi, in seguito ai risultati dell'analisi statistica operata nei 20 casi e 10 controlli studiati, abbiamo ritenuto opportuno suddividere i 20 casi in un ulteriore sottogruppo allo scopo di confrontare la variabilità di espressione di BDNF e GDNF all'interno di ciascun sottogruppo e rispetto ai controlli, analizzando i 14 soggetti affetti da patologia psichiatrica, di cui 6 presentavano disturbo depressivo. Pertanto, dall'analisi di tutte le aree encefaliche, considerate nella loro globalità, abbiamo evidenziato una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) dell'espressione del BDNF sia nei soggetti affetti da disturbo depressivo, sia in quelli affetti da altra patologia psichiatrica, rispetto ai controlli, mentre non sono state osservate variazioni statisticamente significative nel confronto tra individui depressi e quelli con altri disturbi psichici. Inoltre, dall'analisi di tutte le aree encefaliche, considerate nel loro complesso, abbiamo evidenziato un incremento statisticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) dell'espressione del GDNF sia nei soggetti affetti da disturbo depressivo, sia in quelli affetti da altra patologia psichiatrica, rispetto ai controlli, mentre non si sono osservate variazioni statisticamente significative nel confronto tra individui depressi e quelli con altri disturbi psichici.

I risultati da noi ottenuti sull'espressione di BDNF e GDNF, in accordo con i dati dei lavori pubblicati in letteratura, supportano l'ipotesi secondo la quale livelli più scarsi di BDNF e più elevati di GDNF sono correlati a un aumentato rischio di suicidio.

Ulteriori studi da effettuare su una numerosità più elevata di soggetti e con metodiche uniformi e standardizzate su campioni di tessuti encefalici di soggetti deceduti per suicidio, prelevati in sede autoptica, potrebbero essere utili per riuscire a confermare l'ipotesi che i fattori neurotrofici BDNF e GDNF possano essere utilizzati nella pratica clinica come possibili markers di suicidio. In questo modo, come già sottolineato, si potrebbe ottenere una opportuna stratificazione

del rischio di eventi suicidari in determinate popolazioni aventi fattori di rischio specifici e, di conseguenza, attuare politiche di prevenzione efficaci.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Krug, E.G.; Mercy, J.A.; Dahlberg, L.L.; Zwi, A.B. The World Report on Violence and Health. *The Lancet* **2002**, *360*, 1083–1088, doi:10.1016/S0140-6736(02)11133-0.
- 2) World Health Organization 2023 data.who.int, Suicide mortality rate (per 100 000 population) [Indicator]. <https://data.who.int/indicators/i/16BBF41> (Accessed on 23 November 2023)
- 3) Chang, B.; Gitlin, D.; Patel, R. The Depressed Patient and Suicidal Patient in the Emergency Department: Evidence-Based Management and Treatment Strategies. *Emerg Med Pract* 2011, *13*, 1–23; quiz 23–24.
- 4) Vichi M, Ghirini S, Pompili M, Erbutto D, Siliquini R. “Suicidi. In rapporto Osservasalute 2018: stato di salute e qualità dell’assistenza nelle regioni italiane”. Prex S.p.A., Milano, 2019
- 5) Risk and Protective Factors | Suicide | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/suicide/factors/index.html> (accessed on 7 November 2022).
- 6) Beghi, M.; Butera, E.; Cerri, C.G.; Cornaggia, C.M.; Febbo, F.; Mollica, A.; Berardino, G.; Piscitelli, D.; Resta, E.; Logroscino, G.; et al. Suicidal Behaviour in Older Age: A Systematic Review of Risk Factors Associated to Suicide Attempts and Completed Suicides. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2021, *127*, 193–211, doi:10.1016/j.neubiorev.2021.04.011.
- 7) Brent, D.A.; Melhem, N. Familial Transmission of Suicidal Behavior. *Psychiatric Clinics of North America* 2008, *31*, 157–177, doi:10.1016/j.psc.2008.02.001.
- 8) Fusar-Poli, L.; Aguglia, A.; Amerio, A.; Orsolini, L.; Salvi, V.; Serafini, G.; Volpe, U.; Amore, M.; Aguglia, E. Peripheral BDNF Levels in Psychiatric

- Patients with and without a History of Suicide Attempt: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2021, 111, 110342, doi:10.1016/j.pnpbp.2021.110342.
- 9) Conejero, I.; Olié, E.; Calati, R.; Ducasse, D.; Courtet, P. Psychological Pain, Depression, and Suicide: Recent Evidences and Future Directions. *Curr Psychiatry Rep* 2018, 20, 33, doi:10.1007/s11920-018-0893-z.
  - 10) Granier, E.; Boulenger, J.P. [Suicidal Risk Scale]. *Encephale* 2002, 28, 29–38.
  - 11) *Encyclopedia of Personality and Individual Differences*; Zeigler-Hill, V., Shackelford, T.K., Eds.; Springer reference live; Springer: Cham, Switzerland, 2019; ISBN 9783319280998.
  - 12) Van Heeringen, K.; Mann, J.J. The Neurobiology of Suicide. *The Lancet Psychiatry* 2014, 1, 63–72, doi:10.1016/S2215-0366(14)70220-2.
  - 13) *The Neurobiological Basis of Suicide*; Dwivedi, Y., Ed.; *Frontiers in neuroscience*; Taylor & Francis/CRC Press: Boca Raton, FL, 2012; ISBN 9781439838815.
  - 14) Mann, J.J. Neurobiology of Suicidal Behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4, 819–828, doi:10.1038/nrn1220.
  - 15) *Manuale di suicidologia*; Girardi, P., Pompili, M., Eds.; *Collana di psichiatria*; Pacini: Ospedaletto, Pisa, 2015; ISBN 9788863158281.
  - 16) Garcia, R. Stress, Metaplasticity, and Antidepressants. *Curr Mol Med* 2002, 2, 629–638, doi:10.2174/1566524023362023.
  - 17) Thoenen, H. Neurotrophins and Neuronal Plasticity. *Science* 1995, 270, 593–598, doi:10.1126/science.270.5236.593.
  - 18) Anisman, H.; Merali, Z.; Poulte, M.O. Gamma-Aminobutyric Acid Involvement in Depressive Illness Interactions with Corticotropin-Releasing Hormone and Serotonin. In *The Neurobiological Basis of Suicide*; Dwivedi,

- Y., Ed.; *Frontiers in Neuroscience*; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton (FL), 2012 ISBN 9781439838815.
- 19) Karege, F.; Bondolfi, G.; Gervasoni, N.; Schwald, M.; Aubry, J.-M.; Bertschy, G. Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Serum of Depressed Patients Probably Results from Lowered Platelet BDNF Release Unrelated to Platelet Reactivity. *Biological Psychiatry* 2005, 57, 1068–1072, doi:10.1016/j.biopsych.2005.01.008.
  - 20) Hock, C.; Heese, K.; Hulette, C.; Rosenberg, C.; Otten, U. Region-Specific Neurotrophin Imbalances in Alzheimer Disease: Decreased Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Increased Levels of Nerve Growth Factor in Hippocampus and Cortical Areas. *Arch Neurol* 2000, 57, 846, doi:10.1001/archneur.57.6.846.
  - 21) Hoxha, E.; Lippiello, P.; Zurlo, F.; Balbo, I.; Santamaria, R.; Tempia, F.; Miniaci, M.C. The Emerging Role of Altered Cerebellar Synaptic Processing in Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2018, 10, 396, doi:10.3389/fnagi.2018.00396.
  - 22) Allen, S.J.; Watson, J.J.; Shoemark, D.K.; Barua, N.U.; Patel, N.K. GDNF, NGF and BDNF as Therapeutic Options for Neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics* 2013, 138, 155–175, doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.004.
  - 23) Levi-Montalcini, R. The Nerve Growth Factor 35 Years Later. *Science* 1987, 237, 1154–1162, doi:10.1126/science.3306916.
  - 24) Ginty, D. Retrograde Neurotrophin Signaling: Trk-Ing along the Axon. *Current Opinion in Neurobiology* 2002, 12, 268–274, doi:10.1016/S0959-4388(02)00326-4.
  - 25) Hamburger, V.; Brunso-Bechtold, J.; Yip, J. Neuronal Death in the Spinal Ganglia of the Chick Embryo and Its Reduction by Nerve Growth Factor. *J. Neurosci.* 1981, 1, 60–71, doi:10.1523/JNEUROSCI.01-01-00060.1981.

- 26) Barde, Y.A.; Edgar, D.; Thoenen, H. Purification of a New Neurotrophic Factor from Mammalian Brain. *The EMBO Journal* 1982, 1, 549–553, doi:10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x.
- 27) Ibáñez, C.F.; Simi, A. P75 Neurotrophin Receptor Signaling in Nervous System Injury and Degeneration: Paradox and Opportunity. *Trends in Neurosciences* 2012, 35, 431–440, doi:10.1016/j.tins.2012.03.007.
- 28) Skaper, S.D. Neurotrophic Factors: An Overview. In *Neurotrophic Factors*; Skaper, S.D., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1727, pp. 1–17 ISBN 9781493975709 9781493975716.
- 29) Thorpe, L.W.; Perez-Polo, J.R. The Influence of Nerve Growth Factor on the in Vitro Proliferative Response of Rat Spleen Lymphocytes. *J of Neuroscience Research* 1987, 18, 134–139, doi:10.1002/jnr.490180120.
- 30) Otten, U.; Ehrhard, P.; Peck, R. Nerve Growth Factor Induces Growth and Differentiation of Human B Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 10059–10063, doi:10.1073/pnas.86.24.10059.
- 31) Thorpe, L.W.; Werrbach-Perez, K.; Perez-Polo, J.R. Effects of Nerve Growth Factor on the Expression of Interleukin-2 Receptors on Cultured Human Lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1987, 496, 310–311, doi:10.1111/j.1749-6632.1987.tb35781.x.
- 32) Gudat, F.; Laubscher, A.; Otten, U.; Pletscher, A. Shape Changes Induced by Biologically Active Peptides and Nerve Growth Factor in Blood Platelets of Rabbits. *Br J Pharmacol* 1981, 74, 533–538, doi:10.1111/j.1476-5381.1981.tb10461.x.
- 33) Aloe, L.; Levi-Montalcini, R. Mast Cells Increase in Tissues of Neonatal Rats Injected with the Nerve Growth Factor. *Brain Research* 1977, 133, 358–366, doi:10.1016/0006-8993(77)90772-7.
- 34) Ojeda, S.R.; Hill, D.F.; Katz, K.H. The Genes Encoding Nerve Growth Factor and Its Receptor Are Expressed in the Developing Female Rat

- Hypothalamus. *Molecular Brain Research* 1991, 9, 47–55, doi:10.1016/0169-328X(91)90129-L.
- 35) Skaper, S.D. Nerve Growth Factor: A Neuroimmune Crosstalk Mediator for All Seasons. *Immunology* 2017, 151, 1–15, doi:10.1111/imm.12717.
- 36) Donovan, M.J.; Lin, M.I.; Wiegand, P.; Ringstedt, T.; Kraemer, R.; Hahn, R.; Wang, S.; Ibañez, C.F.; Rafii, S.; Hempstead, B.L. Brain Derived Neurotrophic Factor Is an Endothelial Cell Survival Factor Required for Intramyocardial Vessel Stabilization. *Development* 2000, 127, 4531–4540, doi:10.1242/dev.127.21.4531.
- 37) Hefti, F. Nerve Growth Factor Promotes Survival of Septal Cholinergic Neurons after Fimbrial Transections. *J. Neurosci.* 1986, 6, 2155–2162, doi:10.1523/JNEUROSCI.06-08-02155.1986.
- 38) Yasuda, T.; Mochizuki, H. Use of Growth Factors for the Treatment of Parkinson's Disease. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2010, 10, 915–924, doi:10.1586/ern.10.55.
- 39) Bartrup, J.T.; Moorman, J.M.; Newberry, N.R. BDNF Enhances Neuronal Growth and Synaptic Activity in Hippocampal Cell Cultures: *NeuroReport* 1997, 8, 3791–3794, doi:10.1097/00001756-199712010-00027.
- 40) Altar, C.A.; Cai, N.; Bliven, T.; Juhasz, M.; Conner, J.M.; Acheson, A.L.; Lindsay, R.M.; Wiegand, S.J. Anterograde Transport of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Role in the Brain. *Nature* 1997, 389, 856–860, doi:10.1038/39885.
- 41) Kang, H.; Schuman, E.M. Long-Lasting Neurotrophin-Induced Enhancement of Synaptic Transmission in the Adult Hippocampus. *Science* 1995, 267, 1658–1662, doi:10.1126/science.7886457.
- 42) Aid, T.; Kazantseva, A.; Piirsoo, M.; Palm, K.; Timmusk, T. Mouse and Rat BDNF Gene Structure and Expression Revisited. *J of Neuroscience Research* 2007, 85, 525–535, doi:10.1002/jnr.21139.

- 43) Pruunsild, P.; Kazantseva, A.; Aid, T.; Palm, K.; Timmusk, T. Dissecting the Human BDNF Locus: Bidirectional Transcription, Complex Splicing, and Multiple Promoters. *Genomics* 2007, 90, 397–406, doi:10.1016/j.ygeno.2007.05.004.
- 44) Barker, P.A. Whither ProBDNF? *Nat Neurosci* 2009, 12, 105–106, doi:10.1038/nn0209-105.
- 45) Edelmann, E.; Leßmann, V.; Brigadski, T. Pre- and Postsynaptic Twists in BDNF Secretion and Action in Synaptic Plasticity. *Neuropharmacology* 2014, 76, 610–627, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.05.043.
- 46) Panja, D.; Bramham, C.R. BDNF Mechanisms in Late LTP Formation: A Synthesis and Breakdown. *Neuropharmacology* 2014, 76, 664–676, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.06.024.
- 47) Lommatzsch, M.; Quarcoo, D.; Schulte-Herbrüggen, O.; Weber, H.; Virchow, J.C.; Renz, H.; Braun, A. Neurotrophins in Murine Viscera: A Dynamic Pattern from Birth to Adulthood. *Intl J of Devlp Neuroscience* 2005, 23, 495–500, doi:10.1016/j.ijdevneu.2005.05.009.
- 48) Lommatzsch, M.; Braun, A.; Mannsfeldt, A.; Botchkarev, V.A.; Botchkareva, N.V.; Paus, R.; Fischer, A.; Lewin, G.R.; Renz, H. Abundant Production of Brain-Derived Neurotrophic Factor by Adult Visceral Epithelia. *The American Journal of Pathology* 1999, 155, 1183–1193, doi:10.1016/S0002-9440(10)65221-2.
- 49) Borba, E.M.; Duarte, J.A.; Bristot, G.; Scotton, E.; Camozzato, A.L.; Chaves, M.L.F. Brain-Derived Neurotrophic Factor Serum Levels and Hippocampal Volume in Mild Cognitive Impairment and Dementia Due to Alzheimer Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra* 2016, 6, 559–567, doi:10.1159/000450601.
- 50) Autry, A.E.; Monteggia, L.M. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol Rev* 2012, 64, 238–258, doi:10.1124/pr.111.005108.

- 51) Klein, A.B.; Williamson, R.; Santini, M.A.; Clemmensen, C.; Ettrup, A.; Rios, M.; Knudsen, G.M.; Aznar, S. Blood BDNF Concentrations Reflect Brain-Tissue BDNF Levels across Species. *Int. J. Neuropsychopharm.* 2011, 14, 347–353, doi:10.1017/S1461145710000738.
- 52) Sartorius, A.; Hellweg, R.; Litzke, J.; Vogt, M.; Dormann, C.; Vollmayr, B.; Danker-Hopfe, H.; Gass, P. Correlations and Discrepancies between Serum and Brain Tissue Levels of Neurotrophins after Electroconvulsive Treatment in Rats. *Pharmacopsychiatry* 2009, 42, 270–276, doi:10.1055/s-0029-1224162.
- 53) Serra-Millàs, M. Are the Changes in the Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Due to Platelet Activation? *WJP* 2016, 6, 84, doi:10.5498/wjp.v6.i1.84.
- 54) Radka, S.F.; Hoist, P.A.; Fritsche, M.; Altar, C.A. Presence of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain and Human and Rat but Not Mouse Serum Detected by a Sensitive and Specific Immunoassay. *Brain Research* 1996, 709, 122–130, doi:10.1016/0006-8993(95)01321-0.
- 55) Pan, W.; Banks, W.A.; Fasold, M.B.; Bluth, J.; Kastin, A.J. Transport of Brain-Derived Neurotrophic Factor across the Blood–Brain Barrier. *Neuropharmacology* 1998, 37, 1553–1561, doi:10.1016/S0028-3908(98)00141-5.
- 56) Shimizu, E.; Hashimoto, K.; Okamura, N.; Koike, K.; Komatsu, N.; Kumakiri, C.; Nakazato, M.; Watanabe, H.; Shinoda, N.; Okada, S.; et al. Alterations of Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Depressed Patients with or without Antidepressants. *Biological Psychiatry* 2003, 54, 70–75, doi:10.1016/S0006-3223(03)00181-1.
- 57) Lima Giacobbo, B.; Doorduyn, J.; Klein, H.C.; Dierckx, R.A.J.O.; Bromberg, E.; De Vries, E.F.J. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 2019, 56, 3295–3312, doi:10.1007/s12035-018-1283-6.

- 58) Chen, S.; Jiang, H.; Liu, Y.; Hou, Z.; Yue, Y.; Zhang, Y.; Zhao, F.; Xu, Z.; Li, Y.; Mou, X.; et al. Combined Serum Levels of Multiple Proteins in TPA-BDNF Pathway May Aid the Diagnosis of Five Mental Disorders. *Sci Rep* 2017, 7, 6871, doi:10.1038/s41598-017-06832-6.
- 59) Lindholm, J.S.O.; Castrén, E. Mice with Altered BDNF Signaling as Models for Mood Disorders and Antidepressant Effects. *Front. Behav. Neurosci.* 2014, 8, doi:10.3389/fnbeh.2014.00143.
- 60) Castrén, E.; Monteggia, L.M. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biological Psychiatry* 2021, 90, 128–136, doi:10.1016/j.biopsych.2021.05.008.
- 61) Nuernberg, G.L.; Aguiar, B.; Bristot, G.; Fleck, M.P.; Rocha, N.S. Brain-Derived Neurotrophic Factor Increase during Treatment in Severe Mental Illness Inpatients. *Transl Psychiatry* 2016, 6, e985–e985, doi:10.1038/tp.2016.227.
- 62) Youssef, M.M.; Underwood, M.D.; Huang, Y.-Y.; Hsiung, S.; Liu, Y.; Simpson, N.R.; Bakalian, M.J.; Rosoklija, G.B.; Dwork, A.J.; Arango, V.; et al. Association of BDNF Val66Met Polymorphism and Brain BDNF Levels with Major Depression and Suicide. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2018, 21, 528–538, doi:10.1093/ijnp/pyy008.
- 63) Zhao, M.; Chen, L.; Yang, J.; Han, D.; Fang, D.; Qiu, X.; Yang, X.; Qiao, Z.; Ma, J.; Wang, L.; et al. BDNF Val66Met Polymorphism, Life Stress and Depression: A Meta-Analysis of Gene-Environment Interaction. *Journal of Affective Disorders* 2018, 227, 226–235, doi:10.1016/j.jad.2017.10.024.
- 64) Zai, C.C.; Manchia, M.; De Luca, V.; Tiwari, A.K.; Chowdhury, N.I.; Zai, G.C.; Tong, R.P.; Yilmaz, Z.; Shaikh, S.A.; Strauss, J.; et al. The Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene in Suicidal Behaviour: A Meta-Analysis. *Int. J. Neuropsychopharm.* 2012, 15, 1037–1042, doi:10.1017/S1461145711001313.

- 65) Molendijk, M.L.; Bus, B.A.A.; Spinhoven, P.; Penninx, B.W.J.H.; Kenis, G.; Prickaerts, J.; Voshaar, R.O.; Elzinga, B.M. Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Major Depressive Disorder: State–Trait Issues, Clinical Features and Pharmacological Treatment. *Mol Psychiatry* 2011, 16, 1088–1095, doi:10.1038/mp.2010.98.
- 66) Colla, M.; Kronenberg, G.; Deuschle, M.; Meichel, K.; Hagen, T.; Bohrer, M.; Heuser, I. Hippocampal Volume Reduction and HPA-System Activity in Major Depression. *Journal of Psychiatric Research* 2007, 41, 553–560, doi:10.1016/j.jpsychires.2006.06.011.
- 67) Brunoni, A.R.; Machado-Vieira, R.; Zarate, C.A.; Vieira, E.L.M.; Vanderhasselt, M.-A.; Nitsche, M.A.; Valiengo, L.; Benseñor, I.M.; Lotufo, P.A.; Gattaz, W.F.; et al. BDNF Plasma Levels after Antidepressant Treatment with Sertraline and Transcranial Direct Current Stimulation: Results from a Factorial, Randomized, Sham-Controlled Trial. *European Neuropsychopharmacology* 2014, 24, 1144–1151, doi:10.1016/j.euroneuro.2014.03.006.
- 68) Guilloux, J.-P.; Douillard-Guilloux, G.; Kota, R.; Wang, X.; Gardier, A.M.; Martinowich, K.; Tseng, G.C.; Lewis, D.A.; Sibille, E. Molecular Evidence for BDNF- and GABA-Related Dysfunctions in the Amygdala of Female Subjects with Major Depression. *Mol Psychiatry* 2012, 17, 1130–1142, doi:10.1038/mp.2011.113.
- 69) Ray, M.T.; Shannon Weickert, C.; Webster, M.J. Decreased BDNF and TrkB mRNA Expression in Multiple Cortical Areas of Patients with Schizophrenia and Mood Disorders. *Transl Psychiatry* 2014, 4, e389–e389, doi:10.1038/tp.2014.26.
- 70) Lommatzsch, M.; Zingler, D.; Schuhbaeck, K.; Schloetcke, K.; Zingler, C.; Schuff-Werner, P.; Virchow, J.C. The Impact of Age, Weight and Gender on BDNF Levels in Human Platelets and Plasma. *Neurobiology of Aging* 2005, 26, 115–123, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.03.002.

- 71) Tuomisto, J.; Tukiainen, E.; Ahlfors, U.G. Decreased Uptake of 5-Hydroxytryptamine in Blood Platelets from Patients with Endogenous Depression. *Psychopharmacology* 1979, 65, 141–147, doi:10.1007/BF00433040.
- 72) Kimhy, D.; Vakhrusheva, J.; Bartels, M.N.; Armstrong, H.F.; Ballon, J.S.; Khan, S.; Chang, R.W.; Hansen, M.C.; Ayanruoh, L.; Lister, A.; et al. The Impact of Aerobic Exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurocognition in Individuals With Schizophrenia: A Single-Blind, Randomized Clinical Trial. *SCHBUL* 2015, 41, 859–868, doi:10.1093/schbul/sbv022.
- 73) Katoh-Semba, R.; Wakako, R.; Komori, T.; Shigemi, H.; Miyazaki, N.; Ito, H.; Kumagai, T.; Tsuzuki, M.; Shigemi, K.; Yoshida, F.; et al. Age-related Changes in BDNF Protein Levels in Human Serum: Differences between Autism Cases and Normal Controls. *Intl J of Devlp Neuroscience* 2007, 25, 367–372, doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.07.002.
- 74) Fernandes, B.S.; Molendijk, M.L.; Köhler, C.A.; Soares, J.C.; Leite, C.M.G.S.; Machado-Vieira, R.; Ribeiro, T.L.; Silva, J.C.; Sales, P.M.G.; Quevedo, J.; et al. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) as a Biomarker in Bipolar Disorder: A Meta-Analysis of 52 Studies. *BMC Med* 2015, 13, 289, doi:10.1186/s12916-015-0529-7.
- 75) Yasuda, S.; Liang, M.-H.; Marinova, Z.; Yahyavi, A.; Chuang, D.-M. The Mood Stabilizers Lithium and Valproate Selectively Activate the Promoter IV of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neurons. *Mol Psychiatry* 2009, 14, 51–59, doi:10.1038/sj.mp.4002099.
- 76) Jornada, L.K.; Moretti, M.; Valvassori, S.S.; Ferreira, C.L.; Padilha, P.T.; Arent, C.O.; Fries, G.R.; Kapczinski, F.; Quevedo, J. Effects of Mood Stabilizers on Hippocampus and Amygdala BDNF Levels in an Animal Model of Mania Induced by Ouabain. *Journal of Psychiatric Research* 2010, 44, 506–510, doi:10.1016/j.jpsychires.2009.11.002.

- 77) Inonu University, Department of Psychiatry, Malatya, Turkey; Gonenir Erbay, L.; Karlidag, R.; Inonu University, Department of Psychiatry, Malatya, Turkey; Oruc, M.; Inonu University, Department of Forensic Medicine, Malatya, Turkey; Cigremis, Y.; Inonu University, Department of Medical Biology and Genetics, Malatya, Turkey; Celbis, O.; Inonu University, Department of Forensic Medicine, Malatya, Turkey ASSOCIATION OF BDNF / TRKB AND NGF / TRKA LEVELS IN POSTMORTEM BRAIN WITH MAJOR DEPRESSION AND SUICIDE. *Psychiat Danub* 2021, 33, 491–498, doi:10.24869/psyd.2021.491.
- 78) Misztak, P.; Pańczyszyn-Trzewik, P.; Nowak, G.; Sowa-Kućma, M. Epigenetic Marks and Their Relationship with BDNF in the Brain of Suicide Victims. *PLoS ONE* 2020, 15, e0239335, doi:10.1371/journal.pone.0239335.
- 79) Zheng, Y.; Fan, W.; Zhang, X.; Dong, E. Gestational Stress Induces Depressive-like and Anxiety-like Phenotypes through Epigenetic Regulation of BDNF Expression in Offspring Hippocampus. *Epigenetics* 2016, 11, 150–162, doi:10.1080/15592294.2016.1146850.
- 80) Duarte Azevedo, M.; Sander, S.; Tenenbaum, L. GDNF, A Neuron-Derived Factor Upregulated in Glial Cells during Disease. *JCM* 2020, 9, 456, doi:10.3390/jcm9020456.
- 81) Christophersen, N.S.; Grønborg, M.; Petersen, T.N.; Fjord-Larsen, L.; Jørgensen, J.R.; Juliusson, B.; Blom, N.; Rosenblad, C.; Brundin, P. Midbrain Expression of Delta-like 1 Homologue Is Regulated by GDNF and Is Associated with Dopaminergic Differentiation. *Experimental Neurology* 2007, 204, 791–801, doi:10.1016/j.expneurol.2007.01.014.
- 82) Ducray, A.; Krebs, S.H.; Schaller, B.; Seiler, R.W.; Meyer, M.; Widmer, H.R. GDNF Family Ligands Display Distinct Action Profiles on Cultured GABAergic and Serotonergic Neurons of Rat Ventral Mesencephalon. *Brain Research* 2006, 1069, 104–112, doi:10.1016/j.brainres.2005.11.056.

- 83) Hochstrasser, T.; Ullrich, C.; Sperner-Unterweger, B.; Humpel, C. Inflammatory Stimuli Reduce Survival of Serotonergic Neurons and Induce Neuronal Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Rat Dorsal Raphe Nucleus Organotypic Brain Slices. *Neuroscience* 2011, 184, 128–138, doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.070.
- 84) Jaumotte, J.D.; Zigmond, M.J. Comparison of GDF5 and GDNF as Neuroprotective Factors for Postnatal Dopamine Neurons in Ventral Mesencephalic Cultures. *J of Neuroscience Research* 2014, 92, 1425–1433, doi:10.1002/jnr.23425.
- 85) Uzdensky, A.; Komandirov, M.; Fedorenko, G.; Lobanov, A. Protection Effect of GDNF and Neurturin on Photosensitized Crayfish Neurons and Glial Cells. *J Mol Neurosci* 2013, 49, 480–490, doi:10.1007/s12031-012-9858-6.
- 86) Pascual, A.; Hidalgo-Figueroa, M.; Piruat, J.I.; Pintado, C.O.; Gómez-Díaz, R.; López-Barneo, J. Absolute Requirement of GDNF for Adult Catecholaminergic Neuron Survival. *Nat Neurosci* 2008, 11, 755–761, doi:10.1038/nn.2136.
- 87) Sampaio, T.; Savall, A.; Gutierrez, M.Z.; Pinton, S. Neurotrophic Factors in Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases: Implications for Pathogenesis and Therapy. *Neural Regen Res* 2017, 12, 549, doi:10.4103/1673-5374.205084.
- 88) Sharif, M.; Noroozian, M.; Hashemian, F. Do Serum GDNF Levels Correlate with Severity of Alzheimer’s Disease? *Neurol Sci* 2021, 42, 2865–2872, doi:10.1007/s10072-020-04909-1.
- 89) Sharif, M.; Noroozian, M.; Hashemian, F. Do Serum GDNF Levels Correlate with Severity of Alzheimer’s Disease? *Neurol Sci* 2021, 42, 2865–2872, doi:10.1007/s10072-020-04909-1.
- 90) Straten, G.; Eschweiler, G.W.; Maetzler, W.; Laske, C.; Leyhe, T. Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Concentrations in Cerebrospinal

- Fluid and Serum of Patients with Early Alzheimer's Disease and Normal Controls. *JAD* 2009, 18, 331–337, doi:10.3233/JAD-2009-1146.
- 91) Lin, P.-Y.; Tseng, P.-T. Decreased Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Levels in Patients with Depression: A Meta-Analytic Study. *Journal of Psychiatric Research* 2015, 63, 20–27, doi:10.1016/j.jpsychires.2015.02.004.
- 92) Wang, H.; Yang, Y.; Pei, G.; Wang, Z.; Chen, N. Neurotrophic Basis to the Pathogenesis of Depression and Phytotherapy. *Front. Pharmacol.* 2023, 14, 1182666, doi:10.3389/fphar.2023.1182666.
- 93) Michel, T.M.; Frangou, S.; Camara, S.; Thiemeyer, D.; Jecel, J.; Tatschner, T.; Zoechling, R.; Grünblatt, E. Altered Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Concentrations in the Brain of Patients with Depressive Disorder: A Comparative Post-Mortem Study. *Eur. psychiatr.* 2008, 23, 413–420, doi:10.1016/j.eurpsy.2008.06.001.
- 94) Otsuki, K.; Uchida, S.; Watanuki, T.; Wakabayashi, Y.; Fujimoto, M.; Matsubara, T.; Funato, H.; Watanabe, Y. Altered Expression of Neurotrophic Factors in Patients with Major Depression. *Journal of Psychiatric Research* 2008, 42, 1145–1153, doi:10.1016/j.jpsychires.2008.01.010.
- 95) Miller, C.A. Stressed and Depressed? Check Your GDNF for Epigenetic Repression. *Neuron* 2011, 69, 188–190, doi:10.1016/j.neuron.2011.01.006.
- 96) Gadad, B.S.; Vargas-Medrano, J.; Ramos, E.I.; Najera, K.; Fagan, M.; Forero, A.; Thompson, P.M. Altered Levels of Interleukins and Neurotrophic Growth Factors in Mood Disorders and Suicidality: An Analysis from Periphery to Central Nervous System. *Transl Psychiatry* 2021, 11, 341, doi:10.1038/s41398-021-01452-1.
- 97) Anderson, A. Regional Brain Responses to Serotonin in Major Depressive Disorder. *Journal of Affective Disorders* 2004, doi:10.1016/j.jad.2004.04.003.

- 98) Wei, G.; Wu, G.; Cao, X. Dynamic Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor after Cerebral Ischemia: *NeuroReport* 2000, 11, 1177–1183, doi:10.1097/00001756-200004270-00007.
- 99) Michel, T.M.; Frangou, S.; Thiemeyer, D.; Camara, S.; Jecel, J.; Nara, K.; Brunklaus, A.; Zochling, R.; Riederer, P. Evidence for Oxidative Stress in the Frontal Cortex in Patients with Recurrent Depressive Disorder—a Postmortem Study. *Psychiatry Research* 2007, 151, 145–150, doi:10.1016/j.psychres.2006.04.013.
- 100) Chao, C.C.; Lee, E.H.Y. Neuroprotective Mechanism of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor on Dopamine Neurons: Role of Antioxidation. *Neuropharmacology* 1999, 38, 913–916, doi:10.1016/S0028-3908(99)00030-1.
- 101) Tokumine, J.; Kakinohana, O.; Cizkova, D.; Smith, D.W.; Marsala, M. Changes in Spinal GDNF, BDNF, and NT-3 Expression after Transient Spinal Cord Ischemia in the Rat. *J of Neuroscience Research* 2003, 74, 552–561, doi:10.1002/jnr.10760.
- 102) Salas-Magaña, M.; Tovilla-Zárate, C.A.; González-Castro, T.B.; Juárez-Rojop, I.E.; López-Narváez, M.L.; Rodríguez-Pérez, J.M.; Ramírez Bello, J. Decrease in Brain-derived Neurotrophic Factor at Plasma Level but Not in Serum Concentrations in Suicide Behavior: A Systematic Review and Meta-analysis. *Brain and Behavior* 2017, 7, e00706, doi:10.1002/brb3.706.
- 103) Kim, Y.-K.; Lee, H.-P.; Won, S.-D.; Park, E.-Y.; Lee, H.-Y.; Lee, B.-H.; Lee, S.-W.; Yoon, D.; Han, C.; Kim, D.-J.; et al. Low Plasma BDNF Is Associated with Suicidal Behavior in Major Depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2007, 31, 78–85, doi:10.1016/j.pnpbp.2006.06.024.
- 104) Sonal, A.; Raghavan, V. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Suicidal Behavior: A Review of Studies from Asian Countries. *Asian Journal of Psychiatry* 2018, 33, 128–132, doi:10.1016/j.ajp.2018.03.004.

- 105) De Simone, S.; Bosco, M.A.; La Russa, R.; Vittorio, S.; Di Fazio, N.; Neri, M.; Cipolloni, L.; Baldari, B. Suicide and Neurotrophin Factors: A Systematic Review of the Correlation between BDNF and GDNF and Self-Killing. *Healthcare* 2022, 11, 78, doi:10.3390/healthcare11010078.
- 106) Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *Syst Rev* 2021, 10, 89, doi:10.1186/s13643-021-01626-4.
- 107) Felmingham, K.L.; Dobson-Stone, C.; Schofield, P.R.; Quirk, G.J.; Bryant, R.A. The Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism Predicts Response to Exposure Therapy in Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry* 2013, 73, 1059–1063, doi:10.1016/j.biopsych.2012.10.033.
- 108) Miao, Z.; Wang, Y.; Sun, Z. The Relationships Between Stress, Mental Disorders, and Epigenetic Regulation of BDNF. *IJMS* 2020, 21, 1375, doi:10.3390/ijms21041375.
- 109) Paska, A.V.; Zupanc, T.; Pregelj, P. The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Pathophysiology of Suicidal Behavior. *Psychiatr Danub* 2013, 25 Suppl 2, S341-344.
- 110) Ratta-apha, W.; Hishimoto, A.; Yoshida, M.; Ueno, Y.; Asano, M.; Shirakawa, O.; Sora, I. Association Study of BDNF with Completed Suicide in the Japanese Population. *Psychiatry Research* 2013, 209, 734–736, doi:10.1016/j.psychres.2013.05.030.
- 111) Dwivedi, Y.; Rizavi, H.S.; Conley, R.R.; Roberts, R.C.; Tamminga, C.A.; Pandey, G.N. Altered Gene Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Receptor Tyrosine Kinase B in Postmortem Brain of Suicide Subjects. *Arch Gen Psychiatry* 2003, 60, 804, doi:10.1001/archpsyc.60.8.804.

- 112) Karege, F.; Vaudan, G.; Schwald, M.; Perroud, N.; La Harpe, R. Neurotrophin Levels in Postmortem Brains of Suicide Victims and the Effects of Antemortem Diagnosis and Psychotropic Drugs. *Molecular Brain Research* 2005, 136, 29–37, doi:10.1016/j.molbrainres.2004.12.020.
- 113) Tripp, A.; Oh, H.; Guilloux, J.-P.; Martinowich, K.; Lewis, D.A.; Sibille, E. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling and Subgenual Anterior Cingulate Cortex Dysfunction in Major Depressive Disorder. *AJP* 2012, 169, 1194–1202, doi:10.1176/appi.ajp.2012.12020248.
- 114) Hayley, S.; Du, L.; Litteljohn, D.; Palkovits, M.; Faludi, G.; Merali, Z.; Poulter, M.O.; Anisman, H. Gender and Brain Regions Specific Differences in Brain Derived Neurotrophic Factor Protein Levels of Depressed Individuals Who Died through Suicide. *Neuroscience Letters* 2015, 600, 12–16, doi:10.1016/j.neulet.2015.05.052.
- 115) Ropret, S.; Zupanc, T.; Komel, R.; Videtič Paska, A. Single Nucleotide Polymorphisms in the BDNF Gene and Suicide in the Slovenian Sample. *Neuroscience Letters* 2015, 602, 12–16, doi:10.1016/j.neulet.2015.06.027.
- 116) Schneider, E.; El Hajj, N.; Müller, F.; Navarro, B.; Haaf, T. Epigenetic Dysregulation in the Prefrontal Cortex of Suicide Completers. *Cytogenet Genome Res* 2015, 146, 19–27, doi:10.1159/000435778.
- 117) Keller, S.; Sarchiapone, M.; Zarrilli, F.; Videtič, A.; Ferraro, A.; Carli, V.; Sacchetti, S.; Lembo, F.; Angiolillo, A.; Jovanovic, N.; et al. Increased BDNF Promoter Methylation in the Wernicke Area of Suicide Subjects. *Arch Gen Psychiatry* 2010, 67, 258, doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.9.
- 118) Kang, H.-J.; Kim, J.-M.; Lee, J.-Y.; Kim, S.-Y.; Bae, K.-Y.; Kim, S.-W.; Shin, I.-S.; Kim, H.-R.; Shin, M.-G.; Yoon, J.-S. BDNF Promoter Methylation and Suicidal Behavior in Depressive Patients. *Journal of Affective Disorders* 2013, 151, 679–685, doi:10.1016/j.jad.2013.08.001.

- 119) Ropret, S.; Kouter, K.; Zupanc, T.; Videtic Paska, A. BDNF Methylation and MRNA Expression in Brain and Blood of Completed Suicides in Slovenia. *WJP* 2021, 11, 1301–1313, doi:10.5498/wjp.v11.i12.1301.
- 120) Salthouse, T.N. Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. *The Bulletin of the Society of Pharmacological and Environmental Pathologists* 1977, 5, 15–15, doi:10.1177/019262337700500405.
- 121) O'Connor, R.C.; Platt, S.; Gordon, J. *International Handbook of Suicide Prevention: Research, Policy and Practice*; Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex, U.K., 2011; ISBN 9781444331912.
- 122) Baldari, B.; Vittorio, S.; Sessa, F.; Cipolloni, L.; Bertozzi, G.; Neri, M.; Cantatore, S.; Fineschi, V.; Aromatario, M. Forensic Application of Monoclonal Anti-Human Glycophorin A Antibody in Samples from Decomposed Bodies to Establish Vitality of the Injuries. A Preliminary Experimental Study. *Healthcare* 2021, 9, 514, doi:10.3390/healthcare9050514.
- 123) Karege, F.; Perret, G.; Bondolfi, G.; Schwald, M.; Bertschy, G.; Aubry, J.-M. Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Major Depressed Patients. *Psychiatry Research* 2002, 109, 143–148, doi:10.1016/S0165-1781(02)00005-7.
- 124) Middlemas, D.S.; Lindberg, R.A.; Hunter, T. TrkB, a Neural Receptor Protein-Tyrosine Kinase: Evidence for a Full-Length and Two Truncated Receptors. *Molecular and Cellular Biology* 1991, 11, 143–153, doi:10.1128/mcb.11.1.143-153.1991.
- 125) Rosa, A.R.; Frey, B.N.; Andreazza, A.C.; Ceresér, K.M.; Cunha, A.B.M.; Quevedo, J.; Santin, A.; Gottfried, C.; Gonçalves, C.A.; Vieta, E.; et al. Increased Serum Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Immunocontent during Manic and Depressive Episodes in Individuals with Bipolar Disorder. *Neuroscience Letters* 2006, 407, 146–150, doi:10.1016/j.neulet.2006.08.026.

- 126) Takebayashi, M.; Hisaoka, K.; Nishida, A.; Tsuchioka, M.; Miyoshi, I.; Kozuru, T.; Hikasa, S.; Okamoto, Y.; Shinno, H.; Morinobu, S.; et al. Decreased Levels of Whole Blood Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) in Remitted Patients with Mood Disorders. *Int. J. Neuropsychopharm.* 2006, 9, 607, doi:10.1017/S1461145705006085.