

Sandra Patrícia Santos Mondego

# A hipótese do Citocromo P450 na etiologia do suicídio

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Alda Cardoso e co-orientada pelo Professor Doutor Luís Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Quanto maior o conhecimento, menor o ego,  
quanto maior o ego, menor o conhecimento.”

Albert Einstein

# Agradecimentos

Durante todos estes meses, muitos foram os momentos em que duvidei se realmente seria capaz de realizar e concluir este trabalho e confesso que cheguei mesmo a pensar em desistir, mas como já dizia Albert Einstein “algo só é impossível até que alguém duvide e acabe por provar o contrário”.

A realização deste trabalho não seria possível sem a disponibilidade, contribuição e apoio de muitas pessoas, a quem eu quero expressar o meu sincero reconhecimento.

À unidade de Genética Clínica e Molecular e ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, instituição de acolhimento, onde foi realizado este trabalho.

À Professora Doutora Alda Cardoso, minha orientadora, pela oportunidade que me foi dada em realizar este trabalho experimental. Agradeço-lhe por toda a disponibilidade, incentivo, críticas e partilha de conhecimentos científicos, que permitiram a concretização deste projeto de investigação.

Ao Professor Doutor Luís Almeida, meu co-orientador, pela disponibilidade e ajuda na resolução de algumas situações académicas.

Aos meus pais, por sempre acreditarem no meu sucesso e por tudo o que fizeram e continuam a fazer por mim. Obrigado por todo o apoio incondicional, disponibilidade, paciência e incentivo em mais uma etapa da minha vida.

À minha irmã Mariana, pelo apoio, compreensão e interesse demonstrado em ouvir os meus desabaços sempre que as coisas corriam menos bem.

À minha querida avó Fernanda, a quem dedico este trabalho por tudo o que fez por mim e por ser uma pessoa maravilhosa, de quem eu tenho muito orgulho.

Ao André, por todo o apoio, amor e paciência e por toda a força para prosseguir até ao fim desta caminhada.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Helena, Márcia e Pedro, por todos os momentos de companheirismo e amizade.

A todos os meus amigos e familiares que me acompanharam durante esta fase da minha vida.

A todos, muito obrigado!

“O êxito começa no momento exacto em que o homem decide o que quer e começa a trabalhar para o conseguir” - Roberto Shinyashiki

# Índice

Abreviaturas.....	viii
Resumo .....	x
Capítulo 1 – Introdução .....	2
1.1 Suicídio.....	2
1.2 O sistema do citocromo P450.....	3
1.3 Contextualização do sistema do citocromo P450 na etiologia do suicídio.....	6
1.3.1 Genes candidatos do citocromo P450.....	7
1.3.1.1 CYP1A2 (Citocromo P450, Família 1, Subfamília A, polipéptido 2).....	7
1.3.1.2 CYP2E1 (Citocromo P450, Família 2, Subfamília E, Polipéptido 1).....	8
1.4 Considerações gerais de genética.....	10
1.5 Objetivos.....	11
Capítulo 2 – Metodologia .....	13
2.1 Caracterização da amostra.....	13
2.2 Extração de DNA genómico .....	13
2.3 Quantificação da amostra.....	15
2.4 Amplificação de DNA genómico.....	16
2.5 Enzimas de Restrição e Eletroforese em Gel de Agarose.....	17
2.6 Genotipagem de polimorfismos em Genes do CYP450 .....	18
2.6.1 Estudo do polimorfismo C734A localizado no intrão 1 do gene <i>CYP1A2</i> .....	18
2.6.2 Estudo dos polimorfismos -1053C>T e 7632T>A localizados na região reguladora 5' e no intrão 6 do gene <i>CYP2E1</i> , respetivamente .....	19
2.7 Análise Estatística .....	21
Capítulo 3 – Resultados e Discussão .....	23
3.1 Polimorfismo C734A do gene <i>CYP1A2</i> .....	23

---

3.2 Polimorfismos -1053 C>T e 7632T>A do Gene <i>CYP2E1</i> .....	25
Capítulo 4 – Conclusão.....	30
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas.....	32

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> — Taxas de suicídio por regiões e países do mundo.....	2
<b>Figura 2</b> — Estrutura prostética contendo o átomo de Ferro (III) inserido na protoporfirina IX, com um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína, como ligando axial.....	4
<b>Figura 3</b> — Representação esquemática do ciclo catalítico do citocromo P450.....	4
<b>Figura 4</b> — Funções do citocromo P450.....	5
<b>Figura 5</b> — Nomenclatura do sistema do Citocromo P450.....	5
<b>Figura 6</b> — Representação esquemática da estrutura do gene <i>CYP1A2</i> , com a localização do polimorfismo C734A no intrão 1.....	8
<b>Figura 7</b> — Representação esquemática da estrutura do gene <i>CYP2E1</i> , com a localização dos polimorfismos -1053C>T na região reguladora 5' e 7632T>A no intrão 6.....	9
<b>Figura 8</b> — Representação esquemática das etapas envolvidas durante o processo de extração de DNA genômico.....	14
<b>Figura 9</b> — Representação esquemática das etapas de PCR.....	17
<b>Figura 10</b> — Locais de restrição para a enzima <i>BspI20I</i> .....	23
<b>Figura 11</b> — Imagem esquemática correspondente aos produtos obtidos da digestão com a enzima de restrição <i>BspI20I</i> .....	23
<b>Figura 12</b> — Locais de restrição para a enzima <i>RsaI</i> .....	25
<b>Figura 13</b> — Representação esquemática correspondente dos produtos resultantes da digestão com a enzima de restrição <i>RsaI</i> , para o polimorfismo -1053C>T do gene <i>CYP2E1</i> .....	25
<b>Figura 14</b> — Sítios de restrição para a endonuclease <i>DraI</i> .....	27
<b>Figura 15</b> — Figura esquematizada dos fragmentos de digestão obtidos para o polimorfismo 7632T>A do gene <i>CYP2E1</i> , utilizando a endonuclease <i>DraI</i> .....	27

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> — Reagentes e as respectivas quantidades utilizados para a amplificação e genotipagem do polimorfismo C734A do gene <i>CYP1A2</i> .....	19
<b>Tabela 2</b> — Constituintes da reação de PCR e as suas respectivas quantidades utilizados para a amplificação e genotipagem dos polimorfismos -1053C>T e 7632T>A do gene <i>CYP2E1</i> .....	20
<b>Tabela 3</b> — Frequências genóticas e alélicas referentes ao polimorfismo C734A do gene <i>CYP1A2</i> em vítimas de suicídio e controlos.....	24
<b>Tabela 4</b> — Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -1053C>T do gene <i>CYP2E1</i> em vítimas de suicídio e controlos.....	26
<b>Tabela 5</b> — Resultados das frequências genóticas e alélicas obtidos para o polimorfismo 7632T>A do gene <i>CYP2E1</i> em vítimas de suicídio e controlos.....	28

## Abreviaturas

- cm — Centímetros
- CNV — *Copy Number Variation*
- CYP — Citocromo P450
- CYP1 — Citocromo P450, família 1
- CYP2 — Citocromo P450, família 2
- CYP3 — Citocromo P450, família 3
- CYP1A2 — Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 2
- CYP2D6 — Citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6
- CYP2C9 — Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9
- CYP2C19 — Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19
- CYP2E1 — Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1
- CYP450 — *Cytochrome P450*, Citocromo P450
- Da — Dalton
- DGS — Direção Geral de Saúde
- DNA — *Deoxyribonucleic acid*
- dNTP's — Desoxinucleótidos trifosfato
- dATP — Desoxiadenina trifosfato
- dCTP — Desoxicitosina trifosfato
- dGTP — Desoxiguanina trifosfato
- dTTP — Desoxitimina trifosfato
- EDTA — Ácido etilenodiaminotetracético
- EM — *Extensive Metabolizers*
- HGP — *Human Genome Project*
- IM — *Intermediate Metabolizers*
- kb — Kilobase
- kDa — Kilodalton
- Mb — Megabase
- mg — Miligrama
- mL — Mililitro
- mM — Milimolar
- MEOS — Sistema Microsomal Hepático de Oxidação do Etanol

---

mRNA – RNA mensageiro  
nm – Nanómetro  
ng – Nanograma  
NADPH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*  
Pb – Pares de bases  
PCR – *Polimerase Chain Reaction*  
PM – *Poor Metabolizers*  
RENNDA – Registo Nacional de Não Dadores  
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
RNA – *Ribonucleic acid*  
ROS – Espécies reativas de oxigénio  
rpm – Rotações por minuto  
SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*  
STRs – *Short Tandem Repeats*  
TBE – Tris-borato EDTA  
U – Unidade  
UM – *Ultrarapid Metabolizers*  
UTR – *Untranslated region*  
UV – Ultra-Violeta  
VNTR – *Variable Number of Tandem Repeat*  
WHO – *World Health Organization*  
 $\mu\text{g}$  – Micrograma  
 $\mu\text{L}$  – Microlitro  
 $\mu\text{M}$  – Micromolar

## Resumo

O comportamento suicida é um grave problema de saúde pública e uma das principais causas de morte em todo o mundo. É considerado uma doença complexa e heterogênea estando associado a doenças psiquiátricas, estimando-se que entre 10% a 15% da população em geral sofre um episódio depressivo clínico durante a sua vida. Os genes da família do citocromo P450 estão envolvidos no metabolismo e eliminação de uma variedade de xenobióticos, carcinogénios e fármacos utilizados na prática clínica para o tratamento de doenças do foro psiquiátrico. Alterações nos genes que codificam as enzimas responsáveis pela metabolização dos fármacos podem afetar a resposta terapêutica. Antipsicóticos atípicos têm contribuído para diminuir o risco de suicídio em indivíduos com doenças psiquiátricas. Assim, estudou-se o envolvimento de SNPs dos genes *CYP1A2* (C734A) e *CYP2E1* (-1053C>T e 7632T>A) na etiopatogenia do suicídio numa amostra da população Portuguesa. Para a realização deste estudo utilizou-se amostras de vítimas de suicídio da população Portuguesa obtidas no decorrer de autópsias Médico-Legais, realizadas nos Gabinetes e Delegações do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses. Os polimorfismos genéticos dos genes *CYP1A2* e *CYP2E1* foram analisados por PCR-RFLP.

Os resultados obtidos para as frequências genotípicas ( $\chi^2=1,24$ ;  $df=2$ ;  $p=0,54$ ) e alélicas ( $\chi^2=0,93$ ;  $df=1$ ;  $p=0,33$ ) do gene *CYP1A2* não revelaram associação entre o polimorfismo C734A e o suicídio. No gene *CYP2E1* estudaram-se dois polimorfismos genéticos, o -1053C>T localizado na região reguladora 5' e o 7632T>A presente no intrão 6 e não foi observada associação entre estes e o suicídio [(distribuição genotípica para o polimorfismo -1053C>T:  $\chi^2=0,226$ ;  $df=2$ ;  $p=0,634$ ; distribuição alélica para o polimorfismo -1053C>T:  $\chi^2=0,219$ ;  $df=1$ ;  $p=0,639$ ); (distribuição genotípica para o polimorfismo 7632T>A :  $\chi^2=0,065$ ;  $df=2$ ;  $p=0,968$ ; distribuição alélica para o polimorfismo 7632T>A:  $\chi^2=0,004$ ;  $df=1$ ;  $p=0,952$ )]. No seu conjunto, os nossos resultados não revelaram associação entre os polimorfismos dos genes do sistema do citocromo P450 estudados e o suicídio.

**Palavras-chave:** Suicídio, Citocromo P450, CYP1A2, CYP2E1, polimorfismo

## **Capítulo I- Introdução**

## Capítulo I – Introdução

### 1.1 Suicídio

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), todos os anos um milhão de indivíduos cometem o suicídio e as tentativas de suicídio são cerca de 20 vezes mais frequentes (WHO, 2012, 2013). Embora os dados epidemiológicos possam variar de país para país, verifica-se que as taxas anuais são maiores em países da Europa do Leste (Estónia, Letónia, Lituânia, Finlândia e Hungria) (Figura 1) (Hawton & van Heeringen, 2009). O comportamento suicida pode ocorrer em qualquer faixa etária, sendo que as taxas de suicídio tendem a aumentar com a idade em ambos os sexos. Contudo, nos últimos anos, tornou-se na segunda causa de morte em jovens com idades compreendidas entre os 15-19 anos (Bertolote & Fleischmann, 2005; WHO, 2012). Em Portugal no ano de 2011, a taxa de suicídios por 100 mil habitantes, foi de 9,6. Apesar de serem dados preocupantes, as estatísticas oficiais não refletem a realidade. A investigação realizada em Portugal nesta área é ainda escassa, pondo em causa a validade e fiabilidade destes dados estatísticos, devido ao elevado número de mortes violentas de etiologia indeterminada e a incorreções na certificação dos óbitos (DGS, 2013).

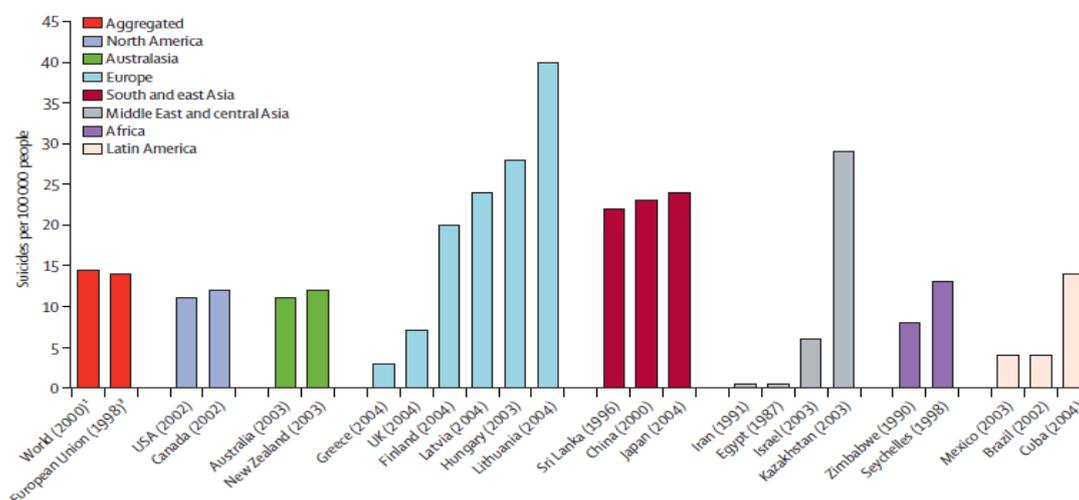


Figura 1 — Taxas de suicídio por regiões e países do mundo. Adaptado de Hawton & van Heeringen, 2009.

O suicídio define-se pelo ato de tirar a própria vida de forma voluntária e, por vezes, intencionalmente. O comportamento suicida pode ser classificado em três categorias, a ideação suicida, as tentativas de suicídio e o suicídio consumado. A ideação suicida refere-se ao pensamento de comportamentos destinados a acabar com a própria vida. As tentativas de suicídio consistem em comportamentos potencialmente autodestrutivos, independentemente do grau de

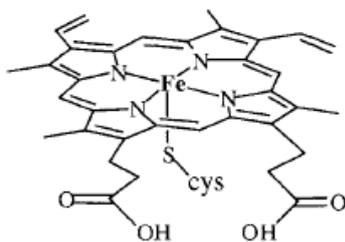
intencionalidade, mas não resultando em morte. No suicídio consumado, o indivíduo realiza com sucesso a sua vontade de morrer. Em média, o suicídio consumado é mais frequente no sexo masculino do que no feminino, ao contrário das tentativas de suicídio (WHO, 2012). O suicídio pode ser consumado através de métodos violentos e/ ou não-violentos. Os métodos violentos e altamente letais estão associados com um maior nível de agressão e de impulsividade, como por exemplo, o uso de armas de fogo e enforcamento. Estes métodos são mais frequentes entre os homens, enquanto que nas mulheres predominam os métodos por envenenamento ou afogamento, que são métodos menos violentos e menos letais (Ajdacic-Gross *et al.*, 2008).

Estudos familiares, de gémeos e de adoção demonstram que os fatores genéticos desempenham um papel importante no comportamento suicida (Brent & Mann, 2005). Estima-se que 43% da variabilidade do comportamento suicida pode ser explicada por fatores genéticos e que 57% se devem a fatores ambientais. Para além disso, outros fatores têm sido considerados, nomeadamente, os fatores sociodemográficos, como o clima, religião, idade, género, sistema político e social. O suicídio está associado com algumas doenças psiquiátricas, tais como, a esquizofrenia, a depressão e o alcoolismo (Mann, 2003; McGuffin *et al.*, 2010; Ishii *et al.*, 2014). Em Portugal, as doenças do foro psiquiátrico afetam cerca de 23% dos portugueses (DGS, 2013). O risco de suicídio representa cerca de 4-5% das mortes em indivíduos com esquizofrenia (Palmer *et al.*, 2005) e as tentativas de suicídio são mais frequentes, atingindo cerca de 20-40% dos indivíduos com esquizofrenia, principalmente, durante a fase inicial da doença (Pompili *et al.*, 2007; Sanchez-Gistau *et al.*, 2013). Alguns fatores clínicos, como o estado depressivo e a falta de esperança têm contribuído para o comportamento suicida (Acosta *et al.*, 2013). De acordo com a WHO, aproximadamente 90% das vítimas de suicídio foram diagnosticadas com pelo menos uma doença psiquiátrica (WHO, 2013). Estes dados estão de acordo com alguns estudos que têm demonstrado uma forte tendência para o comportamento suicida em indivíduos sujeitos a um tratamento antidepressivo (Laje *et al.*, 2007; Perlis *et al.*, 2007).

## 1.2 O sistema do citocromo P450

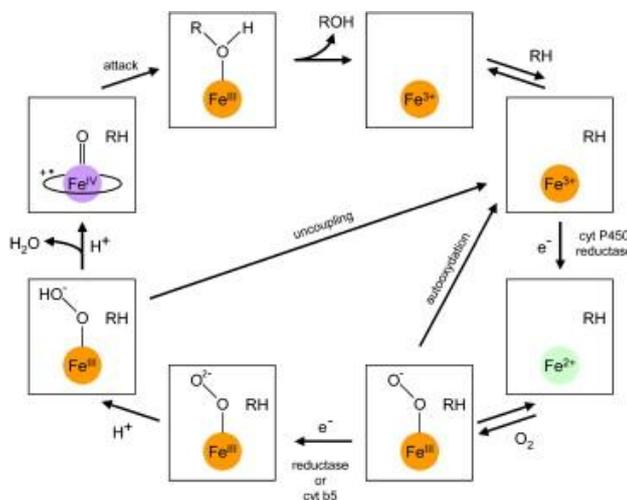
O sistema do citocromo P450 encontra-se presente em quase todos os organismos desde protistas, plantas e mamíferos, incluindo o Homem. Estima-se que o aparecimento do gene ancestral deste complexo tenha ocorrido há mais de 3,5 biliões de anos (Hasler *et al.*, 1999). O termo P450 deriva da presença de um pigmento vermelho (que originou a designação P) com uma absorvância máxima da radiação eletromagnética a 450 nm, após redução ou ligação de monóxido de carbono. Este pigmento tratava-se de uma hemoproteína, a qual foi designada de P450 (Omura & Sato, 1962; Estabrook, 1998; Hasler *et al.*, 1999). Este complexo enzimático é constituído por hemoproteínas com uma composição de aproximadamente 500 aminoácidos por cadeia polipeptídica e com um peso molecular próximo dos 50 000 Daltons. O seu centro ativo é constituído por um grupo prostético ou grupo hemo integrado num átomo de ferro (III), de posição central e inserido numa protoporfirina IX, que se encontra ligado covalentemente a um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína

(Figura 2). Este sistema presente em inúmeros tecidos, mas particularmente no fígado, encontra-se associado às membranas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias (Hasler *et al.*, 1999).



**Figura 2** — Estrutura prostética contendo o átomo de Ferro (III) inserido na protoporfirina IX, com um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína, como ligando axial. Adaptado de Groves 2005.

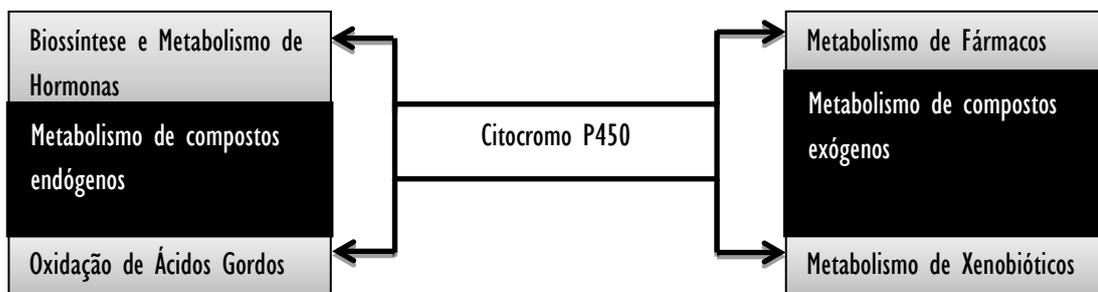
As enzimas dependentes do citocromo P450 participam em muitas reações de biotransformação. Durante o ciclo catalítico ocorrem reações de oxidação-redução, onde o átomo de ferro (III) é reduzido na presença de um substrato (RH) e de elétrons provenientes do NADPH (Figura 3) (Dürr *et al.*, 2007).



**Figura 3** — Representação esquemática do ciclo catalítico do citocromo P450. As cores indicam os estados de oxidação do átomo de ferro do grupo hemo. Adaptado de Dürr *et al.*, 2007.

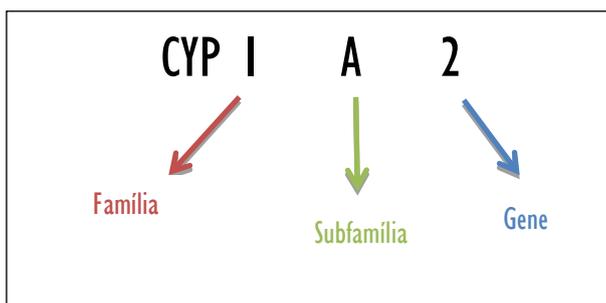
O sistema de monoxigenases dependentes do citocromo P450 desempenha um papel importante na síntese e na degradação de compostos endógenos, incluindo o metabolismo oxidativo de esteróides, vitaminas, ácidos gordos, ácidos biliares, prostaglandinas e aminas biogénicas. Para além disso, funciona também como elementos de defesa contra a acumulação e produção de efeitos secundários de certos compostos exógenos, tais como, fármacos e xenobióticos (Figura 4), isto é, compostos químicos estranhos ao organismo, mas com capacidade de atuar no seu interior (por exemplo, aditivos

alimentares, componentes ambientais e fumo de tabaco) (Ingelman-Sundberg, 2004; Zhou *et al.*, 2009). As enzimas do citocromo P450 são responsáveis por cerca de 5-10% do metabolismo e eliminação de muitos fármacos utilizados diariamente na prática clínica, incluindo, os medicamentos psicotrópicos. A CYP2D6 metaboliza pelo menos 30% dos medicamentos clinicamente prescritos, enquanto que o restante é metabolizado por outras subunidades, como a CYP1A2, a CYP2C9, a CYP2C19 e a CYP2E1 (Shimada *et al.*, 1994). Os fármacos e os xenobióticos lipofílicos são convertidos por oxidação em metabolitos mais hidrofílicos, perdendo o seu efeito farmacológico ou a sua toxicidade, de modo a serem mais facilmente eliminados do organismo. Porém, a oxidação de certos compostos exógenos, pode em alguns casos levar à formação de intermediários altamente reativos, capazes de atacar macromoléculas essenciais ao equilíbrio fisiológico da célula. Estas espécies reativas podem converter-se em compostos com atividade biológica irrelevante, sendo posteriormente eliminados do organismo ou podem se acumular nas células, aumentando os efeitos citotóxicos, mutagénicos ou carcinogénicos.



**Figura 4** — Funções do citocromo P450.

Os genes da superfamília P450 foram subdivididos e classificados de acordo com as recomendações do comité de nomenclatura, com base na identificação dos aminoácidos e critérios de organização genética e filogenética. Assim, esta nomenclatura consta do prefixo CYP, usado para designar o citocromo P450, seguido por um número que corresponde à família, uma letra que designa a subfamília e um número, que se refere ao gene específico (Figura 5). A sigla completa, quando em itálico, refere-se ao gene que codifica a enzima em questão. As enzimas de cada família partilham entre si uma homologia genética de, pelo menos, 40% e dentro de cada subfamília essa homologia é de, pelo menos, 55% (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).



**Figura 5** — Nomenclatura do sistema do Citocromo P450.

Atualmente, o genoma humano contém 18 famílias de CYP, divididas em 41 subfamílias de proteínas codificadas por 57 genes (Nebert *et al.*, 2013). As enzimas responsáveis pela biotransformação de xenobióticos no Homem e na maioria dos mamíferos pertencem às famílias CYP1, CYP2 e CYP3. A atividade e a expressão destas enzimas podem ser afetadas por fatores ambientais, genéticos, fármacos, estilo de vida, idade e gênero.

Os genes do citocromo P450 humanos são muito polimórficos (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007) e a presença de variantes alélicas num indivíduo ou numa população pode interferir com os efeitos farmacológicos e toxicológicos de fármacos, toxinas e substâncias cancerígenas. Estes efeitos levam a diferenças interindividuais e interétnicas, podendo afetar a resposta aos fármacos utilizados, por exemplo para o tratamento da depressão (Kirchheiner *et al.*, 2004; Sim *et al.*, 2013). Deste modo, a indução e/ou inibição destas enzimas pode originar situações de elevada toxicidade ou diminuição da atividade enzimática. A inibição da atividade das enzimas do citocromo P450 origina um aumento dos níveis sanguíneos do fármaco, podendo causar efeitos tóxicos no organismo. Em contraste, a indução da atividade das enzimas diminui os níveis sanguíneos, o que compromete a eficácia terapêutica. Diferentes perfis metabólicos têm sido descritos de acordo com a atividade enzimática: metabolizadores lentos (PM) que contém genes com alterações ou deleções; metabolizadores intermédios (IM) constituídos por um alelo funcional e um alelo alterado ou por dois alelos alterados; metabolizadores extensivos (EM) que apresentam dois alelos funcionais; e os metabolizadores ultra-rápidos (UM) que têm mais do que dois genes ativos (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). Deste modo, os genes do citocromo P450 são fundamentais em muitos processos e a presença de mutações nos genes ou deficiências nas enzimas podem estar na origem de várias doenças humanas graves.

### 1.3 Contextualização do sistema do citocromo P450 na etiologia do suicídio

O comportamento suicida está associado a doenças psiquiátricas. Indivíduos com doenças do foro psiquiátrico são sujeitos ao tratamento com antidepressivos e antipsicóticos. Embora, o objetivo do tratamento farmacológico consista essencialmente em controlar e reduzir os sintomas caraterísticos destas psicopatologias, os antipsicóticos atípicos também contribuem indiretamente para reduzir o comportamento suicida (Meltzer *et al.*, 2003; Leon *et al.*, 2011; Tiihonen *et al.*, 2012; Meltzer, 2013; Reutfors *et al.*, 2013). A clozapina é um antipsicótico atípico metabolizado pelas enzimas do citocromo P450, principalmente pela CYP1A2 (Eiermann *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2009). Este fármaco foi utilizado em alguns estudos em indivíduos com doenças psiquiátricas e com histórico de tentativas de suicídio, onde se verificou uma redução do comportamento suicida (Meltzer *et al.*, 2003; Weitoft *et al.*, 2014). A atividade da enzima CYP1A2 revela importância no metabolismo oxidativo da clozapina e determinados fatores ambientais podem induzir a atividade enzimática, contribuindo para o aumento da expressão da enzima CYP1A2. Alguns estudos têm demonstrado que polimorfismos no gene *CYP1A2* estão associados com um aumento dos efeitos de antipsicóticos (Viiki *et al.*, 2014). Genes deste sistema têm sido implicados no tratamento da depressão *major*, onde indivíduos com esta psicopatologia apresentam um risco de suicídio de 6-15% (Davies

*et al.*, 2001; Zobel & Maier, 2010; Licinio & Wong, 2011). Recentemente, foram publicados dois estudos em indivíduos com doenças psiquiátricas, onde avaliaram o papel de polimorfismos dos genes do citocromo P450 no comportamento suicida (Serafini *et al.*, 2012; Höfer *et al.*, 2013). Para além dos agentes neuropsicofarmacológicos, as enzimas deste sistema também são responsáveis pela metabolização de vários xenobióticos, como o etanol e as *N*-nitrosaminas existentes na constituição do tabaco. Assim, e seguindo esta linha de raciocínio, uma outra hipótese a ter em conta é o facto de uma grande maioria dos indivíduos com doenças psiquiátricas ser fumadora. Indivíduos fumadores com doenças psiquiátricas apresentam um risco de suicídio maior, em relação aos não fumadores (Tanskanen *et al.*, 1998; Malone *et al.*, 2003; Breslau *et al.*, 2005; Bronisch *et al.*, 2008; Hughes, 2008). Um estudo *postmortem* em humanos, comparando fumadores e não fumadores, revela que indivíduos fumadores apresentam concentrações significativamente mais baixas de serotonina (Benwell *et al.*, 1990). Assim, e de acordo com esse estudo, o tabagismo pode eventualmente, afetar a função da serotonina. Baixos níveis de serotonina no sistema nervoso central têm sido relacionados com o comportamento suicida (Mann, 2003). Várias isoformas do sistema do citocromo P450 têm sido sugeridas por desempenharem um papel importante em processos fisiológicos, nomeadamente a nível do sistema nervoso central (SNC) (Miksys & Tyndale, 2013). Uma grande parte dos fármacos terapêuticos que atuam no SNC são metabolizados pelas enzimas do CYP (Porcelli *et al.*, 2011). Um maior conhecimento do metabolismo de neurotransmissores endógenos pelas enzimas do CYP no cérebro, pode contribuir para uma melhor compreensão do suicídio.

### 1.3.1 Genes candidatos do citocromo P450

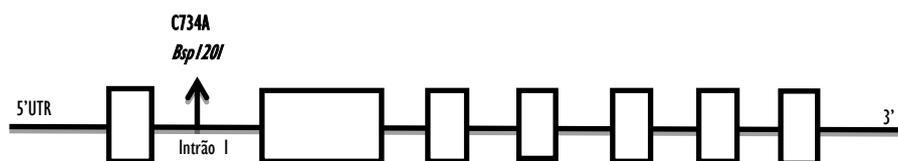
#### 1.3.1.1 CYP1A2 (Citocromo P450, Família I, Subfamília A, polipéptido 2)

A CYP1A2 é a principal enzima da família I do citocromo P450 expressa no fígado humano, representando cerca de 13% do seu conteúdo total de P450 (Shimada *et al.*, 1994). Esta enzima é responsável pela metabolização de alguns antipsicóticos atípicos utilizados clinicamente, incluindo a olanzapina e clozapina (Eiermann *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2009). A terapia com clozapina em indivíduos com esquizofrenia tem contribuído para reduzir o comportamento suicida (Meltzer *et al.*, 2003; Meltzer, 2013). Vários estudos com polimorfismos do gene CYP1A2 têm sido realizados em indivíduos com esquizofrenia (Basile *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2005; Tay *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2012). A atividade de CYP1A2 é um factor importante no tratamento com clozapina em indivíduos com doenças psiquiátricas (Lous *et al.*, 2003). Deste modo, o risco de suicídio relacionado com as doenças afetivas pode estar associado com a presença de polimorfismos neste gene.

A presença de diferenças interindividuais nos níveis de expressão e na atividade de CYP1A2 contribuem para que existam diferenças significativas entre os indivíduos no metabolismo de fármacos e xenobióticos (Sim *et al.*, 2013). Estas variações na atividade catalítica de CYP1A2 são afetadas principalmente por fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Zhou *et al.*, 2009). O gene *CYP1A2* humano é muito polimórfico, tendo sido já identificados vários polimorfismos encontrados na

região reguladora 5' e no intrão I. Estas variantes são muito importantes, uma vez que podem afetar a atividade e a expressão enzimática de CYP1A2 (Carrillo & Benitez, 1996; Nakajima *et al.*, 1999; Sachse *et al.*, 1999). O polimorfismo C734A do gene *CYP1A2* contém uma transversão de C para A na posição 734, localizada no intrão I (Figura 6) e está associado com um aumento da atividade da enzima CYP1A2 em fumadores (Sachse *et al.*, 1999; Sachse *et al.*, 2003; Ghotbi *et al.*, 2007). Sabe-se que o hábito de fumar é frequente entre os indivíduos com esquizofrenia e que o suicídio tem sido associado com o tabagismo (Malone *et al.*, 2003). Os constituintes do fumo do cigarro, como as *N*-nitrosaminas, induzem a atividade da enzima CYP1A2, resultando em baixos níveis plasmáticos do fármaco (Sachse *et al.*, 1999; Backman *et al.*, 2008; Sim *et al.*, 2013). Fatores que inibam ou induzam a atividade de CYP1A2 são responsáveis por alterações no funcionamento da enzima CYP1A2 e revelam importância na suscetibilidade para determinadas doenças, bem como para a determinação da dosagem de antipsicóticos/ antidepressivos em indivíduos com doenças psiquiátricas (Lous *et al.*, 2003).

O gene *CYP1A2* localiza-se no cromossoma 15 (15q24.1) e tem aproximadamente 7,8 kb. É composto por sete exões e seis intrões, sendo que o primeiro exão é não codificante (Figura 6). A CYP1A2 é uma proteína com 515 aminoácidos e com uma massa molecular de 58,294 Da (Ikeya *et al.*, 1989).



**Figura 6** — Representação esquemática da estrutura do gene *CYP1A2*, com a localização do polimorfismo C734A no intrão I. Adaptado de Sachse *et al.*, 1999.

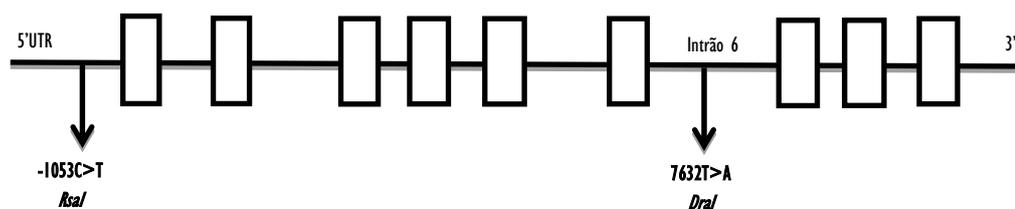
Na literatura poucos são os estudos de investigação com o polimorfismo do gene *CYP1A2* e o comportamento suicida (Serafini *et al.*, 2012; Höfer *et al.*, 2013).

### 1.3.1.2 CYP2E1 (Citocromo P450, Família 2, Subfamília E, Polipéptido 1)

O citocromo P450 2E1 (CYP2E1) é um membro da superfamília do citocromo P450 e o principal componente do sistema microsomal hepático de oxidação do etanol (MEOS). Esta enzima é expressa principalmente no fígado, mas também em outros tecidos extrahepáticos, incluindo o cérebro, onde tem sido observada em diferentes regiões cerebrais de modelos animais e de humanos (Upadhyay *et al.*, 2000; Ogony *et al.*, 2008). Recentemente, foram realizados estudos de associação entre os polimorfismos genético de *CYP2E1* e a suscetibilidade para a esquizofrenia, bem como a relação entre a resposta terapêutica de um antipsicótico atípico em indivíduos com esquizofrenia (Huo *et al.*, 2012). As doenças psiquiátricas representam um fator de risco para o suicídio (Ishii *et al.*, 2014), pelo que estudos com polimorfismos deste gene poderá ser relevante para uma melhor compreensão do comportamento suicida. Por outro lado, os antipsicóticos utilizados para o

tratamento de doenças do foro psiquiátrico, também são importantes para reduzir o comportamento suicida (Meltzer *et al.*, 2003; Reutfors *et al.*, 2013). Tal como a enzima CYP1A2, também a CYP2E1 está envolvida no metabolismo de alguns fármacos clínicos, incluindo os medicamentos psicotrópicos. Para além destas evidências, também se tem verificado que indivíduos com doenças do foro psiquiátrico e com comportamentos suicidas, apresentam uma forte ligação com o tabagismo (Malone *et al.*, 2003). A enzima CYP2E1 é responsável pela metabolização e bioativação de muitos compostos de baixo peso molecular e de natureza hidrofóbica, nomeadamente, xenobióticos, como o etanol e *N*-nitrosaminas (Gonzalez, 2007). O consumo excessivo de etanol e a administração de nicotina, resultam na indução da atividade da enzima e, conseqüentemente, no aumento dos níveis de transcrição do mRNA de *CYP2E1* (Lieber, 1999; Howard *et al.*, 2001). A indução de CYP2E1 pode aumentar as concentrações de espécies reativas de oxigénio (ROS) e levar ao desenvolvimento do stress oxidativo. Os ROS provocam diferentes efeitos nas células, como a desnaturação de proteínas, inativação de enzimas e mutações no DNA (Lu & Cederbaum, 2008). Resultados anteriores indicam que esta enzima pode influenciar a neurotransmissão dopaminérgica e formar ROS (Dai *et al.*, 1993; Hipólito *et al.*, 2009). Alterações em neurotransmissores, como a dopamina e a serotonina, estão associadas com o comportamento suicida (Raison *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2009). Após estas evidências e sabendo que o comportamento suicida está relacionado com as doenças psiquiátricas e que estas parecem ser moduladas por alterações na atividade e na expressão da enzima CYP2E1, torna-se importante investigar um eventual papel de variantes genéticas do gene *CYP2E1* na etiologia do suicídio.

A regulação da expressão do gene *CYP2E1* é complexa, envolvendo vários níveis, como a transcrição, tradução, estabilização do mRNA e degradação da proteína (Lieber, 1999). O gene *CYP2E1* humano localiza-se no cromossoma 10 (10q24.3) e contém 9 exões e 8 intrões (Figura 7) (Umeno *et al.*, 1988). Mais de 10 polimorfismos foram identificados na região reguladora 5' e intrónica. Os polimorfismos que se localizam na região reguladora 5' do gene estão relacionados com a alteração da expressão da enzima. O polimorfismo -1053C>T situa-se na região reguladora 5' (Figura 7) e contém o local de restrição para a enzima de restrição *RsaI*. Um outro polimorfismo genético que tem revelado importância funcional é o 7632 T>A do gene *CYP2E1* e que constitui um local de restrição para a enzima *DraI* (Uematsu *et al.*, 1991). Esta variante consiste numa substituição nucleotídica no sexto intrão (Figura 7), sendo pouco provável que afete diretamente na expressão do gene.



**Figura 7** — Representação esquemática da estrutura do gene *CYP2E1*, com a localização dos polimorfismos -1053C>T na região reguladora 5' e 7632 T>A no intrão 6. Adaptado de Yim *et al.*, 2013.

Até ao momento e na literatura disponível não existem evidências de estudos entre os polimorfismos -1053 C>T e 7632 T>A do gene *CYP2E1*.

#### 1.4 Considerações gerais de genética

O genoma humano é constituído por cerca de 30.000 genes, com um total de 3,12 biliões de nucleótidos. Encontra-se armazenado em longas moléculas de DNA, chamadas de cromossomas. No total existem 23 pares de cromossomas (22 pares autossómicos e 1 par sexual) ao longo do genoma humano. As sequências de DNA localizadas numa determinada região específica (*locus*) e que codificam proteínas são conhecidas como genes e uma forma alternativa de um gene designa-se de alelo. A um conjunto de alelos, denomina-se de genótipo (Kingsmore *et al.*, 2008).

Um alelo presente numa população com uma frequência superior a 1%, denomina-se de polimorfismo genético. Estes polimorfismos são muito utilizados em estudos genéticos como marcadores genéticos, onde a localização da sequência de DNA é conhecida. Existem vários tipos de polimorfismos no genoma, SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*), STRs (*Short Tandem Repeats*) e os CNVs (*Copy Number Variation*). Os SNPs são sequências de DNA que diferem por um único par de bases, com alterações localizadas em todo o genoma e variam de indivíduo para indivíduo. As classes de SNPs podem ser divididas em, não génicas, génicas, intrónicas, 5'UTR, 3'UTR, sinónimas e não sinónimas (Barreiro *et al.*, 2008). Os RFLPs contêm uma alteração de um par de bases na sequência de DNA que é reconhecida por uma enzima de restrição. Os VNTRs são caracterizados por alterações em sequências de DNA repetitivo e os STRs são sequências curtas de DNA repetitivo. Os CNVs são segmentos de DNA com um tamanho compreendido entre 1 kilobase (Kb) e vários megabases (Mb). São uma forma de variação genética nos humanos e parecem ser responsáveis por vários mecanismos, tais como a diversidade genética entre os indivíduos e o aumento da suscetibilidade para certas doenças (Burmeister, 1999; Cook & Scherer, 2008; Videira, 2011). Uma mutação que ocorra na região codificante ou nas regiões reguladoras de um gene estrutural pode alterar o produto do gene ou interferir na sua expressão, originando uma alteração fenotípica, que pode levar ao desenvolvimento de uma patologia. Uma doença que se deva a uma alteração de um único gene mutante é conhecida como mendeliana. As doenças mendelianas baseiam-se em padrões muito específicos de herança nas famílias. Porém, muitas doenças, como as psiquiátricas, não seguem os padrões mendelianos, uma vez que são afetadas por vários fatores (doenças complexas) (Hunter, 2005).

O Projeto Genoma Humano (HGP) foi um projeto internacional de 13 anos, iniciado em 1990 e finalizado em 2003. Este ambicioso projeto tinha como objetivos, a sequenciação de 3 biliões de pares de bases do genoma humano, mapear e identificar todos os genes humanos presentes na sequência de DNA e desenvolver um sistema de armazenamento público com toda a informação sobre as sequências de DNA, disponível numa base de dados. Este passo na ciência veio

contribuir para o avanço do conhecimento da biologia humana, permitindo melhorar a medicina e o desenvolvimento de novas tecnologias utilizadas para sequenciar o DNA (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

O Projeto Internacional HapMap surgiu com o intuito de descrever as variantes de SNPs que ocorrem nos seres humanos. Deste modo, o projeto descreve o que essas variantes são, onde ocorrem no DNA humano e como são distribuídas entre os indivíduos dentro das populações e entre populações em diferentes partes do mundo. Assim, foi possível a identificação de haplótipos, que são combinações de variantes alélicas presentes no mesmo cromossoma, sendo geralmente herdadas juntas, devido ao desequilíbrio de *linkage*. O conhecimento de variantes de sequências de DNA que possam contribuir para o desenvolvimento de uma doença, permite uma melhor compreensão das doenças complexas (The International HapMap Consortium, 2007).

O Projeto dos 1000 genomas surgiu com o intuito de desenvolver uma plataforma que permitisse uma melhor compreensão da contribuição genética para a doença. Através do projeto do genoma humano sabe-se que todos os Humanos compartilham cerca de 99% do material genético e que as diferenças individuais são devidas a aproximadamente 1% do DNA restante. Assim, o projeto dos 1000 genomas focou-se no estudo dessas variantes genéticas que diferenciam cada indivíduo. Deste modo, sequenciou-se 1092 indivíduos saudáveis de 14 diferentes países da Europa, África, América e da Ásia. Com este estudo internacional foi possível identificar 38 milhões de SNPs, 1,4 milhões de pequenas inserções e deleções e mais de 14000 grandes deleções presentes na população humana. O conhecimento de polimorfismos no DNA humano é essencial para uma melhor localização das variantes genéticas que possam estar associadas com uma determinada doença, bem como com a resposta aos fármacos (The 1000 Genomes Project Consortium, 2011, 2012).

## 1.5 Objetivos

O sistema do citocromo P450 tem sido implicado no comportamento suicida. Deste modo, pretende-se estudar o envolvimento de SNPs nos genes *CYP1A2* (C734A) e *CYP2E1* (-1053C>T e 7632T>A) na etiologia do suicídio na população Portuguesa.

## **Capítulo 2 - Metodología**

## Capítulo 2 — Metodologia

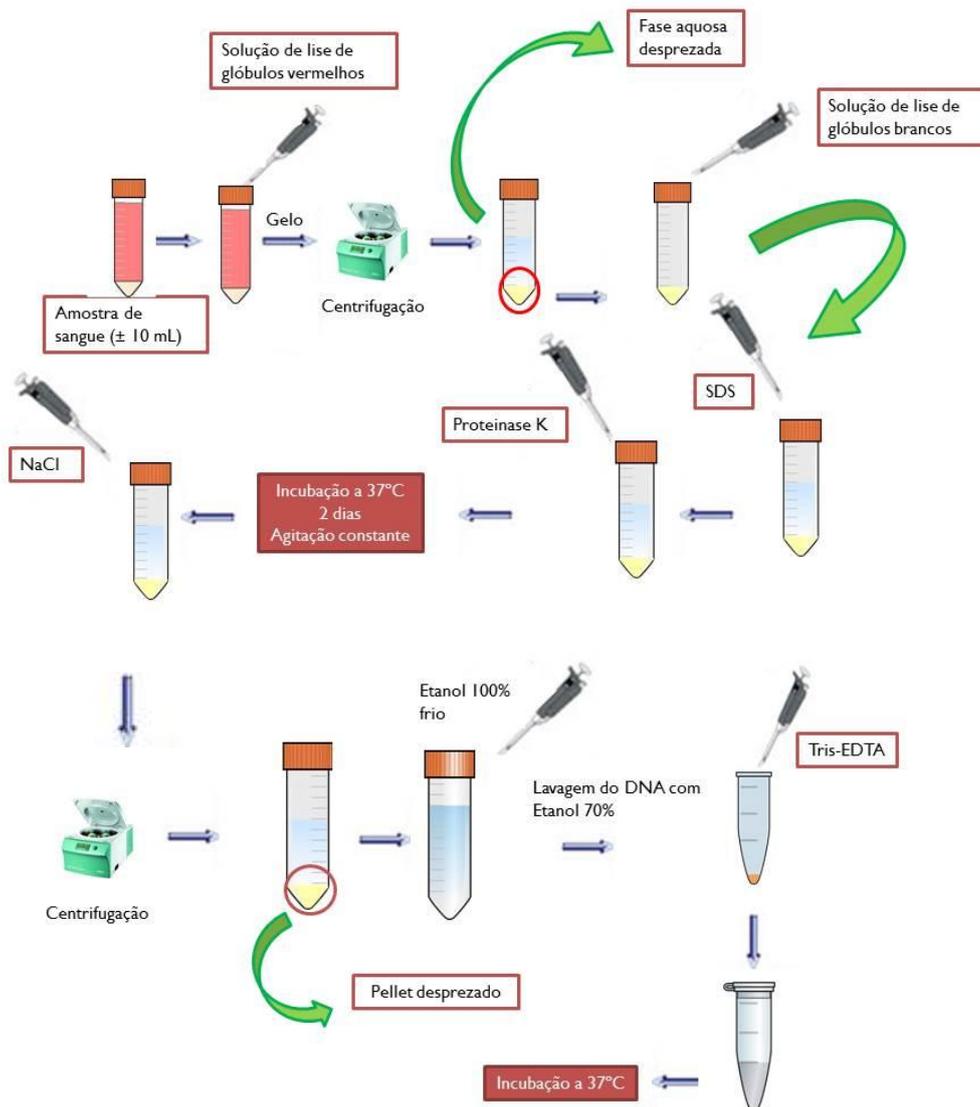
### 2.1 Caracterização da amostra

As amostras utilizadas para este estudo foram recolhidas de vítimas de suicídio e de controlos, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 18 e 86 anos, na população Portuguesa, no decorrer das autópsias Médico-Legais, realizadas nos Gabinetes e Delegações do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses. As vítimas de suicídio consumaram o suicídio violento e não violento. Todas as amostras foram recolhidas, após consulta ao Registo Nacional de Não Dadores (RENDA).

### 2.2 Extração de DNA genómico

Os principais objetivos de um método de extração de DNA genómico consistem, principalmente, em obter DNA em quantidade suficiente, mantendo a integridade da molécula e livre de inibidores, de forma a evitar a sua degradação e contaminação. Existem diferentes métodos especializados utilizados para a extração de DNA genómico, incluindo, o método de extração orgânica (Fenol-Clorofórmio), o método de extração de fase sólida e o método de extração enzimático. O método de extração orgânica é um método de extração líquido-líquido que separa moléculas com base na sua solubilidade diferencial. Este método utiliza solventes tóxicos e envolve muitas etapas, o que pode aumentar o risco de contaminação das amostras, podendo interferir nos passos de quantificação e de PCR. O método de extração de fase sólida baseia-se na absorção dos ácidos nucleicos a superfícies sólidas (por exemplo, matrizes de sílica e partículas de vidro), com base no pH e no teor de sal do tampão (Tan & Yip, 2009). Porém, o método de extração enzimático apresenta vantagens relativamente aos outros métodos, uma vez que permite obter DNA de elevado peso molecular, com bons rendimentos e grau de pureza da amostra. O princípio do método baseia-se no *salting out* das proteínas celulares por desidratação e precipitação com uma solução saturada de NaCl. Este método de desproteinização evita a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos e de elevado custo, como o fenol e o clorofórmio (Miller *et al.*, 1988).

A escolha adequada do método de extração depende do tipo de amostra e da quantidade de DNA necessária. O DNA genómico pode ser extraído de diferentes materiais, nomeadamente, amostras de sangue, esfregaços bucais, saliva, urina, entre outros materiais biológicos. Porém, o sangue apresenta-se como um material biológico de eleição para o isolamento e purificação de DNA genómico de alto peso molecular e de fácil obtenção. (Dickinson *et al.*, 2001). Os principais passos da purificação incluem a lise das membranas celulares, libertação da molécula de DNA, inativação das nucleases celulares, precipitação e solubilização do DNA.



**Figura 8** — Representação esquemática das etapas envolvidas durante o processo de extração de DNA genômico.

Neste trabalho experimental, recolheu-se aproximadamente 10 mL de sangue de vítimas de suicídio para tubos contendo o anticoagulante EDTA (Sigma). O isolamento do DNA genômico (figura 8) realizou-se segundo uma metodologia enzimática descrita pelo método de Miller *et al.* (1988), com algumas modificações. Inicialmente, adicionou-se aos 10 mL, três volumes de uma solução tampão de lise de glóbulos vermelhos, constituída por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  155mM (Sigma),  $\text{KHCO}_3$  10mM (Sigma),  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1mM (Sigma) e ajustada a um pH de 7,4. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em gelo durante 20 minutos. Após o tempo de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas numa centrífuga refrigerada (Rotanta 460R, Hettich®), a 2500 rpm, durante 15 minutos e a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e repetiu-se o procedimento anterior. Ao pellet obtido, adicionou-se 4 mL de uma solução tampão de lise de glóbulos brancos, constituída por Tris-HCl 10 mM (Sigma), NaCl 400 mM (Sigma),  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 mM (Sigma) e ajustada a um pH de 8. Com o pellet em solução, adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de detergente iônico SDS a 10% (BioRad®) e ao fim, de algum tempo, 30  $\mu\text{L}$  de Proteínase

K (Roche) a 20 mg/mL foram adicionados. O SDS é um detergente e um agente desnaturante, que dissocia o DNA das proteínas nucleares e inibe, em certa medida, a atividade de DNAses. A Proteinase K é uma protease endolítica, utilizada para hidrolisar as proteínas, clivando as suas ligações peptídicas. As amostras foram incubadas a 37°C durante cerca de dois dias sob agitação constante (Incubator SI60D, Bibby – Stuart Scientific). As proteínas foram removidas por *salting-out*, após a adição de 3 mL de uma solução saturada de NaCl 6M (Sigma) seguida de centrifugação a 3750 rpm, durante 30 minutos e a 25°C. Ao sobrenadante obtido, adicionou-se duas vezes o volume de etanol absoluto para precipitar o DNA genómico. O etanol induz uma mudança estrutural nas moléculas de DNA, fazendo com que se agreguem e, conseqüentemente, precipitem. Seguidamente, procedeu-se à lavagem do DNA em etanol a 70% e adicionou-se Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM (Sigma), Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 1 mM (Sigma), ajustado a pH 7,4) para permitir a solubilização do DNA. Por fim, as amostras foram incubadas a 37°C até uma total solubilização do DNA e posteriormente, armazenadas a 4°C.

### 2.3 Quantificação da amostra

Os ácidos nucleicos em solução absorvem fortemente a radiação ultravioleta (UV) a comprimentos de onda compreendidos entre 220 e 320 nm, com um pico de absorção máximo a 260 nm. Este processo é baseado na Lei de *Lambert-Beer* que estabelece que a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional ao percurso óptico e concentração da amostra,  $A = \epsilon cl$ , em que A-absorvância,  $\epsilon$ -coeficiente de extinção molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ), c-Concentração da amostra (mol/L) e l-percurso óptico (Owen-Reece *et al.*, 1999).

A absorvância dos ácidos nucleicos no UV deve-se à presença das bases azotadas, pirimidinas e purinas e é utilizada como medida de pureza dos ácidos nucleicos. A razão  $A_{260}/A_{280}$  permite estimar o grau de pureza da amostra contendo ácidos nucleicos (Nicklas & Buel, 2003). Se a amostra estiver pura, a razão deverá estar compreendida entre 1,8 e 2,0. Porém, para valores inferiores a este intervalo, a amostra poderá estar contaminada com proteínas.

Para uma solução de DNA em cadeia dupla, com uma  $A_{260}$  nm de uma unidade e, considerando o percurso óptico de 1 cm, a concentração de ácido nucleico será aproximadamente 50  $\mu g/mL$ . Assim, e utilizando a equação da Lei de *Lambert-Beer* é possível estabelecer a seguinte equação,  $[DNA](\mu g/mL) = A_{260} \times \text{fator de diluição} \times 50 \mu g/mL$  (Nicklas & Buel, 2003).

Para a quantificação e determinação do grau de pureza das amostras, estas foram diluídas (1:25) e adicionadas a uma célula de quartzo (Quartz spectrophotometer, Micro 16.50-Q-10/8,5mm, Bio-Rad® Labs). Antes de iniciar a leitura das absorvâncias, procedeu-se à calibração do aparelho (100  $\mu L$  de água milliQ). A leitura das absorvâncias das amostras a 260 nm e a 280 nm, a determinação das respetivas concentrações e as razões das absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$  foram realizadas num espectrofotómetro (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, Bio-Rad®).

## 2.4 Amplificação de DNA genómico

A técnica de PCR deve-se o seu nome ao Dr. Kary Mullis e seus colegas, que desenvolveram o processo em meados dos anos 1980. Este avanço na Ciência e na Tecnologia permitiu a Mullis, o prémio nobel em Química em 1993. Esta técnica tornou-se numa das ferramentas mais utilizadas em biologia molecular e em genética (Mullis, 1990), uma vez que permite amplificar regiões específicas do DNA, obtendo-se múltiplas cópias a partir de uma quantidade reduzida de DNA (Fairchild *et al.*, 2006). É uma técnica com uma diversidade de aplicações, nomeadamente, a sua utilização no estudo de polimorfismos e mutações pontuais, na sequenciação do DNA, análise de RNA, em processos de clonagem, diagnóstico de doenças hereditárias e infecciosas (Peake, 1989; Videira, 2011). Porém, é um método muito sensível e por esse motivo deve ser realizado com o máximo de cuidado a fim de evitar contaminações e falsos resultados.

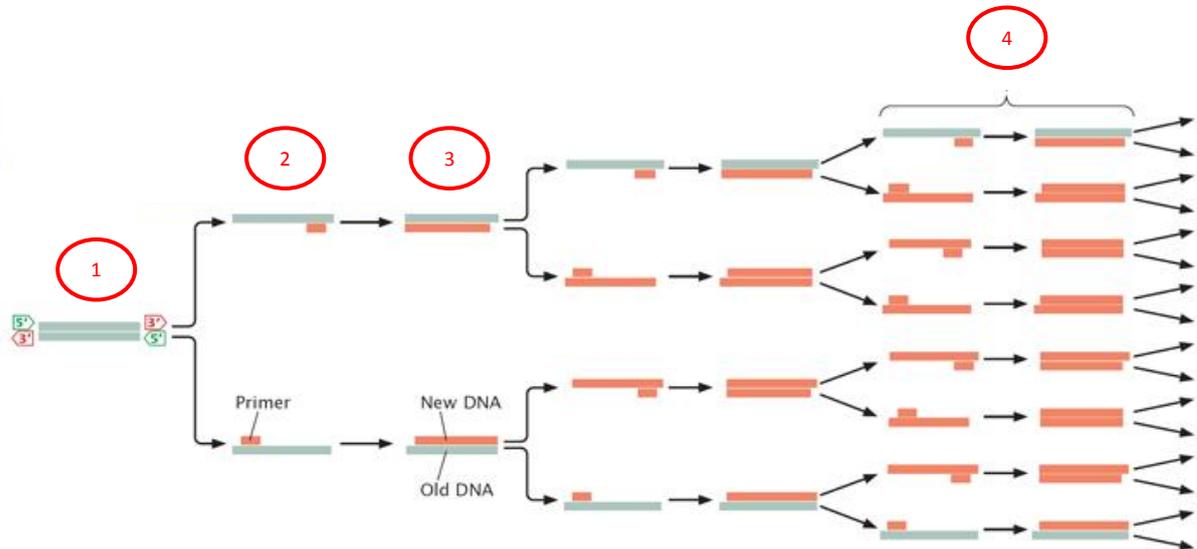
Para a realização de uma reação de PCR é necessário essencialmente, a sequência de DNA que se quer amplificar, um par de *primers* (normalmente cerca de 20 a 30 bases de comprimento), desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e uma enzima para a síntese de DNA, como a *Taq* DNA polimerase. Esta enzima foi extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, que vive em águas termais. É uma polimerase estável e ativa a elevadas temperaturas, conseguindo sobreviver à incubação prolongada a 94°C (Mullis, 1990). Estas características tornam esta enzima perfeita na fase de adicionar dNTPs livres e na formação da nova cadeia de DNA. Contudo, é necessário a utilização de determinados reagentes que garantam as condições ótimas para um correto funcionamento da enzima. O *buffer* (tampão) tem como função proporcionar o meio adequado para o funcionamento da enzima e o  $Mg^{2+}$  aumenta substancialmente a estabilidade da enzima e da cadeia de DNA (Fairchild *et al.*, 2006).

Uma reação de PCR envolve uma série de ciclos, realizados com diferentes temperaturas, em que cada ciclo consiste em três fases: desnaturação da molécula de DNA (Desnaturação), emparelhamento dos *primers* (*Annealing*) e síntese de DNA (Extensão) (figura 9). O passo de desnaturação consiste na incubação do DNA a uma temperatura elevada, cerca de 95°C para separar a dupla cadeia. O emparelhamento dos *primers* ocorre a temperaturas inferiores, cerca de 55°C. Esta temperatura varia, dependendo da composição dos *primers* e da sua complementaridade com o DNA alvo. É uma fase muito importante porque é nesta etapa que ocorre o reconhecimento e a ligação dos *primers* às sequências complementares do DNA. Por fim, a síntese de DNA é realizada pela *Taq* DNA polimerase a 72°C. Esta enzima faz a elongação dos *primers* usando como molde a cadeia a que cada *primer* está emparelhado. A síntese é dirigida no sentido 5'→3', a partir da região de iniciação. É um processo muito rápido, simples e eficaz (Peake, 1989; Videira, 2011).

As reacções de PCR são realizadas em termocicladores (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad®) que, ao longo de minutos a algumas horas (Fairchild *et al.*, 2006), amplificam o DNA exponencialmente, obtendo-se a cada  $n$  ciclos,  $2^n$  moléculas de DNA (Saiki *et al.*, 1988).

Porém, esta técnica também apresenta algumas limitações, como por exemplo, a possibilidade de amplificação de sequências não específicas. Outra desvantagem é a limitada extensão da sequência que é possível amplificar, ou seja, é difícil

aplicar a PCR a sequências maiores do que 5kb. Pode também ocorrer incorporação incorrecta de bases durante a replicação, uma vez que a *Taq* DNA polimerase não tem a capacidade de correção de erros comuns às DNA polimerases (atividade exonuclease 3'→5') (Peake, 1989; Videira, 2011).



**Figura 9** — Representação esquemática das etapas de PCR. 1. A molécula de DNA é sujeita a temperaturas entre 90°-100°C e as duas cadeias separam-se. 2. Nesta fase a temperatura diminui para 30°-65°C e os *primers* ligam-se às sequências complementares. 3. A solução é novamente aquecida para temperaturas entre 60°-70°C. A *Taq* DNA polimerase sintetiza a nova cadeia de DNA, formando moléculas de DNA em cadeia dupla. 4. Os ciclos são repetidos várias vezes. Adaptada do WH Freeman and Company, 2005.

## 2.5 Enzimas de Restrição e Eletroforese em Gel de Agarose

As enzimas de restrição foram descobertas na década de 1970. Estas enzimas reconhecem sequências específicas de DNA em cadeia dupla, constituídas por 4 a 6 nucleótidos, clivando-as. A utilização destas enzimas é importante na clivagem da molécula de DNA em fragmentos mais pequenos e mais resistentes, permitindo o isolamento, identificação e caracterização da região de interesse do gene em estudo (Mullis, 1990).

Para estimar o tamanho dos fragmentos de ácidos nucleicos, após a digestão com enzimas de restrição, o método mais utilizado é a separação eletroforética. A eletroforese de DNA é essencialmente realizada em gel de agarose (Videira, 2011). O tamanho dos poros de agarose é determinado pela concentração do gel e pode ser manipulado para garantir uma separação mais eficaz, por exemplo, quanto menor for a diferença de tamanhos entre os fragmentos de DNA, mais concentrado terá de ser o gel de modo a conseguir uma boa separação dos fragmentos (Sambrook *et al.*, 1989).

A preparação do gel consiste em dissolver uma determinada quantidade de agarose numa solução tampão, como o TBE IX (Trizma base 89 mM (Sigma), Ácido Bórico 89 mM (Merck), Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 2mM). A utilização desta solução tampão é importante para garantir que não ocorre alteração da carga do DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Paralelamente, prepara-se uma

forma apropriada e colocam-se pentes que irão permitir obter fileiras de poços, onde posteriormente serão colocadas as amostras a analisar. A solução, que contém agarose, TBE IX e brometo de etídio, é colocada na montagem referida anteriormente e deixa-se a solidificar. Aos produtos de amplificação ou de digestão adiciona-se 5 µL de uma solução de *loading buffer* contendo dois corantes (azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25%) e glicerol a 30%. Esta solução aumenta a densidade da amostra e permite a sua coloração (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras de DNA e o marcador de pesos moleculares (Gene Ruler 100 bp, DNA *ladder*, Thermo Scientific) são colocados nos poços do gel. O gel é transferido para uma tina de eletroforese, imerso em TBE IX e sujeito a aplicação de um campo elétrico. O processo consiste em separar e identificar eficazmente as moléculas de DNA. Assim, as moléculas carregadas negativamente deslocam-se para o ânodo e as moléculas carregadas positivamente deslocam-se para o cátodo. Como as moléculas de DNA a pH neutro apresentam carga negativa, devido aos grupos fosfato, os fragmentos vão migrar para o pólo positivo (ânodo). A mobilidade dos fragmentos de DNA no gel de agarose é inversamente proporcional ao  $\log_{10}$  do número de pares de bases. Quanto menor for o fragmento de DNA, maior será a distância percorrida no gel de agarose durante a eletroforese (Fairchild *et al.*, 2006). As moléculas do mesmo tamanho vão migrar conjuntamente, formando bandas, que podem ser visualizadas com o auxílio de luz ultravioleta. O brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen) é uma substância mutagénica, que se intercala entre os pares de bases de DNA e na presença de raios UV, emite fluorescência (Sambrook *et al.*, 1989; Videira, 2011).

O tamanho dos fragmentos é comparado com um marcador de pesos moleculares (Gene Ruler 100 bp, DNA *ladder*, Thermo Scientific).

## 2.6 Genotipagem de polimorfismos em Genes do CYP450

### 2.6.1 Estudo do polimorfismo C734A localizado no intrão I do gene *CYP1A2*

O polimorfismo C734A do gene *CYP1A2* foi genotipado de acordo com o protocolo descrito por Basile *et al.* (2000), com algumas alterações. Este polimorfismo apresenta o local de restrição para a endonuclease *BspI20I*. Deste modo, procedeu-se à realização da técnica de PCR, onde cada tubo de reação continha um volume final de 25 µL, constituído pelos reagentes representados na tabela I. O DNA genómico foi desnaturado inicialmente a 95°C durante 5 minutos, seguindo-se o passo de amplificação que consistiu em 30 ciclos a 94°C 60", 57°C 60" e 72°C 60". O ciclo de PCR terminou com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

**Tabela I** — Reagentes e as respectivas quantidades utilizados para a amplificação e genotipagem do polimorfismo C734A do gene *CYP1A2*.

Reagente	Quantidade
DNA genómico	100 ng
Buffer (Invitrogen)	IX
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	1,5 mM
dNTPs (Invitrogen)	0,05 mM
Primers (Invitrogen)	1,5 ng/μL
<i>Taq</i> DNA polimerase (Invitrogen)	0,025 U/μL

Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *BspI20I* durante a noite a 37°C. Em seguida, adicionou-se 5 μL de corante (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%) com glicerol a 30%, aos fragmentos obtidos pela digestão com a enzima. Posteriormente, os produtos resultantes foram separados através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,5%, contendo TBE IX e brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen).

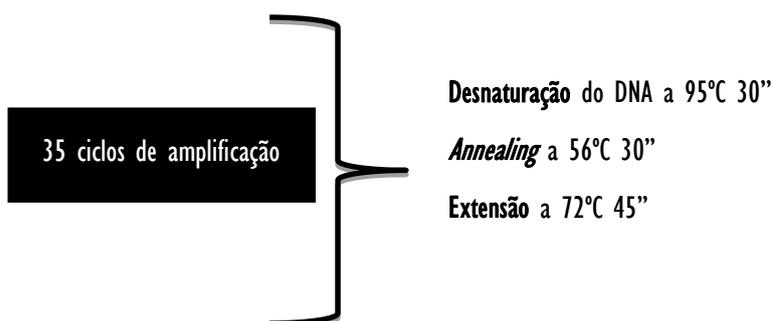
A visualização dos fragmentos de digestão foi efetuada no sistema de imagem *Gel Doc* (BioRad®) e os respetivos pesos moleculares foram determinados por comparação com um marcador de peso molecular (Gene Ruler 100 bp, DNA ladder, Thermo Scientific).

### 2.6.2 Estudo dos polimorfismos -1053C>T e 7632T>A localizados na região reguladora 5' e no intrão 6 do gene *CYP2E1*, respetivamente

Com base em algumas condições descritas por Wang *et al.* (1999), efetuou-se a genotipagem dos polimorfismos -1053C>T e 7632T>A do gene *CYP2E1*. Cada reação de PCR, num volume final de 25 μL, continha os reagentes presentes na tabela 2. Os ciclos de PCR para cada polimorfismo genético de *CYP2E1*, decorreram segundo as seguintes condições:

- Polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1*

**Desnaturação inicial** do DNA genómico a 95°C durante 5 minutos



**Extensão final** a 72°C durante 7 minutos

- Polimorfismo 7632T>A do gene *CYP2E1*

**Desnaturação inicial** do DNA genómico a 4°C durante 4 minutos;



**Extensão final** a 72°C durante 7 minutos.

**Tabela 2** — Constituintes da reação de PCR e as suas respectivas quantidades utilizados para a amplificação e genotipagem dos polimorfismos -1053C>T e 7632T>A do gene *CYP2E1*.

Reagente	-1053C>T	7632T>A
	Quantidade	
DNA genómico	100 ng	120 ng
Buffer (Invitrogen)	IX	IX
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	2 mM	2 mM
dNTPs (Invitrogen)	0,2 mM	0,2 mM
Primers (Invitrogen)	0,2 µM	0,2 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase (Invitrogen)	0,04 U/µL	0,6 U

Os produtos de amplificação foram incubados *overnight* e digeridos pelas enzimas de restrição *RsaI* e *DraI* a 37°C. Os fragmentos resultantes da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, contendo brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen) e tampão TBE IX, tendo sido adicionados 5 µL de corante (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%) com glicerol a 30% às amostras. Os fragmentos foram visualizados no sistema de imagem *Gel Doc* (BioRad®) e os respetivos pesos moleculares foram obtidos por comparação com um marcador de peso molecular (Gene Ruler™ 100 bp, DNA *ladder*, Thermo Scientific).

## 2.7 Análise Estatística

A análise dos resultados foi efetuada utilizando o *Primer of Biostatistics program* (versão 3.01) (Glantz, 1992).

## **Capítulo 3 - Resultados e Discussão**

## Capítulo 3 — Resultados e Discussão

### 3.1 Polimorfismo C734A do gene *CYP1A2*

No presente estudo investigou-se o papel do polimorfismo C734A do gene *CYP1A2* localizado no intrão I em amostras de vítimas de suicídio na população Portuguesa. Os produtos da amplificação de PCR foram digeridos pela enzima *BspI20I*. Os locais de restrição para a enzima *BspI20I* encontram-se representados na figura 10.



Figura 10 — Locais de restrição para a enzima *BspI20I*.

Na figura 11 está representado um esquema dos fragmentos resultantes da digestão com a endonuclease *BspI20I*. O alelo *wild-type* (alelo C) apresenta a sequência de restrição para a enzima, pelo que é identificado pela presença de dois fragmentos, a 130 pb e 240 pb. Por outro lado, o alelo mutante (alelo A) não contém o local de restrição para a enzima, sendo identificado apenas pelo fragmento a 370 pb.

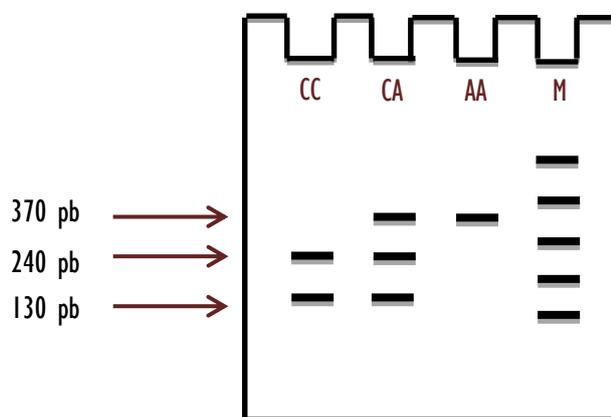


Figura 11 — Imagem esquemática correspondente aos produtos obtidos da digestão com a enzima de restrição *BspI20I*. O genótipo CC apresenta dois fragmentos de digestão a 130 pb e 240 pb. No genótipo AA apenas se observa um fragmento a 370 pb, uma vez que não apresenta local de restrição para a enzima. Relativamente ao genótipo CA, este contém o total dos três fragmentos. O M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb.

Na tabela 3 encontra-se representado a distribuição genotípica e alélica do polimorfismo C734A do gene *CYP1A2* em amostras de vítimas de suicídio e controlos. A percentagem de indivíduos com o genótipo CC revelou ser superior em vítimas de suicídio (54%), comparativamente com o grupo controlo (48%). Da mesma forma, o alelo C apresentou uma percentagem

superior em indivíduos vítimas de suicídio (74%), em comparação com o grupo controle (70%). Os resultados deste estudo não revelam associação entre o polimorfismo C734A do gene *CYP1A2* e o suicídio, quer para a distribuição genotípica ( $\chi^2=1,24$ ;  $df=2$ ;  $p=0,54$ ), quer para as frequências alélicas ( $\chi^2=0,93$ ;  $df=1$ ;  $p=0,33$ ).

**Tabela 3** — Frequências genotípicas e alélicas referentes ao polimorfismo C734A do gene *CYP1A2* em vítimas de suicídio e controles.

		Suicídio (n=183)	Controle (n=180)	
Genótipos (%)	CC	98 (54)	86 (48)	$\chi^2=1,24$ $df=2$ $p=0,54$
	CA	74 (40)	81 (45)	
	AA	11 (6)	13 (7)	
Alelos (%)	C	270 (74)	253 (70)	$\chi^2=0,93$ $df=1$ $p=0,33$
	A	96 (26)	107 (30)	

Atualmente, e de acordo com a literatura, existem apenas dois estudos com o polimorfismo genético de *CYP1A2* e o comportamento suicida (Serafini *et al.*, 2012; Höfer *et al.*, 2013). Serafini *et al.* (2012) estudaram este polimorfismo em mulheres Italianas diagnosticadas com doenças psiquiátricas. O estudo de Höfer *et al.* (2013) foi realizado em indivíduos caucasianos diagnosticados com a depressão *major*, onde o objetivo consistia em verificar se existia associação entre os perfis metabólicos do gene *CYP1A2* e o comportamento suicida. Em ambos os estudos não se verificou associação entre o polimorfismo C>A e o comportamento suicida, tal como se veio a verificar no nosso estudo (Serafini *et al.*, 2012; Höfer *et al.*, 2013).

Estas variações genéticas podem ter uma maior influência na alteração da resposta e/ ou toxicidade de uma variedade de fármacos e xenobióticos metabolizados pela *CYP1A2*. Diferentes estudos têm referido uma associação entre este polimorfismo e algumas doenças. Por exemplo, tem sido observado uma associação entre a discinesia tardia em indivíduos com esquizofrenia e esta mutação (Basile *et al.*, 2000). Uma grande maioria dos indivíduos com esquizofrenia é fumadora. Alguns estudos têm demonstrado uma relação positiva entre o tabagismo e o comportamento suicida em indivíduos com doenças psiquiátricas, pelo que seria interessante investigar este tipo de polimorfismo em indivíduos vítimas de suicídio que tenham sido fumadores. (Tanskanen *et al.*, 1998). Anteriormente já foi referido que fumar induz a atividade da enzima *CYP1A2* que, conseqüentemente, leva a uma diminuição dos níveis de antipsicóticos no plasma. Assim, o efeito destes fármacos é reduzido e pouco eficaz no tratamento, sendo muitas vezes necessário aumentar a dose dos antipsicóticos, o que pode

eventualmente aumentar os níveis de antipsicóticos no plasma, levando ao desenvolvimento de determinadas patologias (Basile *et al.*, 2000; Chong *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2005).

### 3.2 Polimorfismos -1053 C>T e 7632T>A do Gene *CYP2E1*

Polimorfismos genéticos do gene *CYP2E1* têm sido relacionados com o desenvolvimento de várias doenças psiquiátricas e na eficácia clínica de alguns medicamentos psicotrópicos. Neste trabalho experimental estudou-se uma possível associação entre os polimorfismos -1053C>T e 7632T>A do gene *CYP2E1* e a suscetibilidade para o suicídio na população Portuguesa.

Nas figuras 12 e 13 estão representadas os locais de restrição para a enzima *RsaI* e o esquema dos fragmentos resultantes da digestão com a *RsaI*, para o polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1*, respetivamente. Os genótipos para esta variante genética foram classificados como CC (homozigóticos), TT (homozigóticos) e CT (heterozigóticos). O alelo C é definido pela presença do local de restrição de *RsaI*. O alelo mutante raro (alelo T), caracteriza-se pela ausência do local de restrição *RsaI* e está associado com uma maior atividade transcricional do gene *CYP2E1*, resultando em níveis elevados de mRNA e de proteína, relativamente ao alelo *wild type* (alelo C) (Hayashi *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1994). Os produtos de amplificação a 410 pb foram digeridos com a enzima *RsaI*.

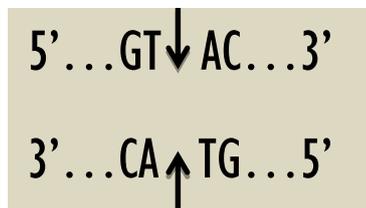


Figura 12 — Locais de restrição para a enzima *RsaI*.

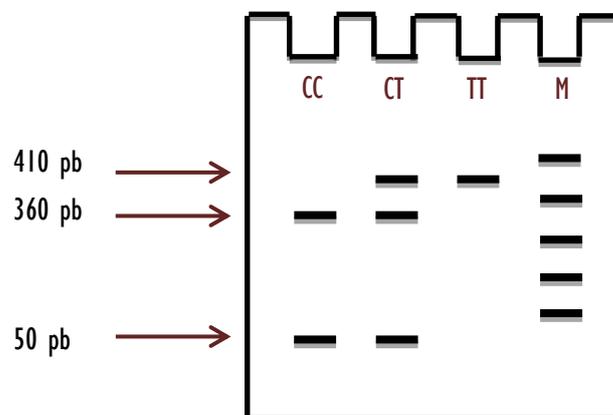


Figura 13 — Representação esquemática dos produtos resultantes da digestão com a enzima de restrição *RsaI*, para o polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1*. A variante homozigótica para o alelo C está representada pelos fragmentos a 50

e 360 pb. A variante heterozigótica é constituída pelos fragmentos a 50, 360 e 410 pb. Em relação à variante homozigótica para o alelo T, esta não apresenta local de restrição para a endonuclease, sendo representada apenas pelo fragmento a 410 pb. O marcador de peso molecular de 100 pb está representado pela letra M.

Na tabela 4 estão representadas as frequências genótípicas e alélicas referentes ao polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1* em amostras de vítimas de suicídio e controlos. O genótipo CC revelou ser ligeiramente superior em vítimas de suicídio (95,1%), em relação ao grupo controlo (93,4%). É de salientar, que neste estudo não existem indivíduos com a variante mutante homozigótica para o alelo T, tanto na amostra de vítimas de suicídio, como no grupo controlo. Por outro lado, verifica-se que o alelo *wild-type* (alelo C) encontra-se bem representado na população Portuguesa, com uma frequência de 96,7% no grupo controlo.

**Tabela 4** — Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1* em vítimas de suicídio e controlos.

		Suicídio (n=183)	Controlo (n=181)	
Genótipos (%)	CC	174 (95,1)	169 (93,4)	$\chi^2=0,226$ df=2 p=0,634
	CT	9 (4,9)	12 (6,6)	
	TT	0 (0)	0 (0)	
Alelos (%)	C	357 (97,5)	350 (96,7)	$\chi^2=0,219$ df=1 p=0,639
	T	9 (2,5)	12 (3,3)	

Os resultados obtidos para o polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1* em vítimas de suicídio não revelam associação relativamente às frequências genótípicas ( $\chi^2=0,226$ ; df=2; p=0,634) e alélicas ( $\chi^2=0,219$ ; df=1; p=0,639).

Os resultados apresentados constituem os primeiros dados no que diz respeito ao estudo do polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1* na etiologia do suicídio, tanto na população Portuguesa, como a nível mundial. Este polimorfismo genético tem sido descrito por influenciar a ligação do fator de transcrição na região reguladora 5' do gene *CYP2E1* e, consequentemente, em alterar os níveis de expressão de mRNA (Watanabe *et al.*, 1994). Apesar de neste estudo não se ter obtido associação entre o polimorfismo -1053C>T do gene *CYP2E1* e o suicídio, é necessário continuar nesta linha de investigação. Continuou-se o estudo de associação, com o intuito de avaliar a contribuição do polimorfismo 7632T>A do gene *CYP2E1* na etiologia do suicídio. Na figura 14 está esquematizada o local de restrição para a enzima de restrição *DraI* para o polimorfismo 7632T>A do gene *CYP2E1*. Após a amplificação do DNA pela técnica de PCR, os produtos amplificados foram

digeridos com a enzima de restrição *DraI*. A variante *wild-type* (DD) apresenta locais de restrição para a endonuclease *DraI*, dando origem aos fragmentos de 572, 302 e 121 pb. A variante mutante homozigótica (CC) não tem a sequência de restrição, sendo identificado pela presença dos fragmentos 874 e 121 pb. O genótipo DC, corresponde aos fragmentos a 874, 572, 302 e 121 pb (figura 15).

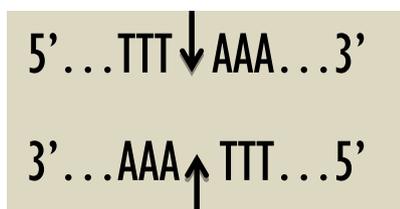


Figura 14 — Sítios de restrição para a endonuclease *DraI*.

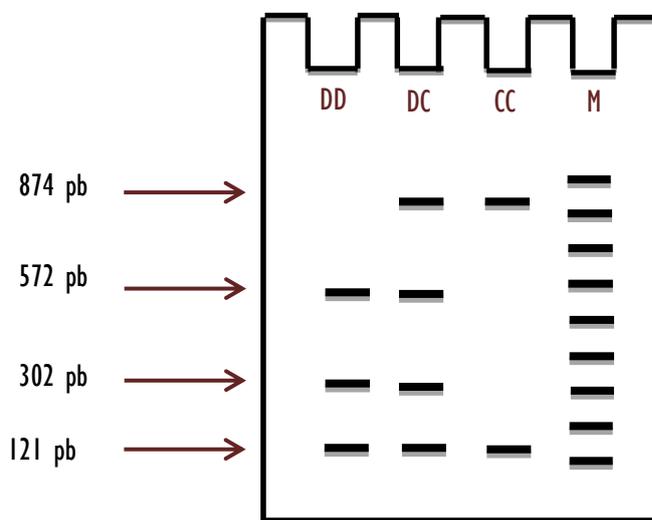


Figura 15 — Figura esquematizada pelos fragmentos de digestão obtidos para o polimorfismo 7632T>A do gene *CYP2E1*, utilizando a endonuclease *DraI*. O genótipo DD contém os fragmentos de restrição a 121, 302 e 572 pb. O genótipo CC está representado pelos fragmentos 121 e 874 pb. O genótipo DC é constituído por todos os fragmentos obtidos. A letra M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb.

Os resultados obtidos para a genotipagem do polimorfismo 7632T>A do gene *CYP2E1* estão descritos na tabela 5. No nosso estudo, o alelo mutante (alelo C) apresenta uma maior prevalência tanto nas amostras de suicídio (91,5%), como no grupo controlo (91,2%).

**Tabela 5** — Resultados das frequências genotípicas e alélicas obtidos para o polimorfismo 7632T>A do gene *CYP2E1* em vítimas de suicídio e controlos.

		Suicídio (n=260)	Controlo (n=280)	
Genótipos (%)	DD	3 (1,2)	3 (1,1)	$\chi^2=0,065$ df=2 p=0,968
	DC	38 (14,6)	43 (15,3)	
	CC	219 (84,2)	234 (83,6)	
Alelos (%)	D	44 (8,5)	49 (8,8)	$\chi^2= 0,004$ df=1 p=0,952
	C	476 (91,5)	511 (91,2)	

Ao analisarmos esta tabela, verificamos que não se obteve associação para as frequências genotípicas ( $\chi^2=0,065$ ; df=2; p=0,968) e alélicas ( $\chi^2=0,004$ ; df=1; p=0,952) entre a variante genética de *CYP2E1* e o suicídio. É importante salientar que, até à data, não está publicado qualquer estudo referente ao polimorfismo 7632T>A do gene *CYP2E1*.

A falta de associação entre os polimorfismos do gene *CYP2E1* e o suicídio, não significa que esta enzima não revela importância no comportamento suicida. *CYP2E1* é importante no metabolismo de xenobióticos e um potente produtor de espécies reativas de oxigénio (Zima *et al.*, 2001). A indução desta enzima com etanol pode causar stress oxidativo, levando a um aumento da produção de metabolitos de peroxidação lipídica em astrócitos, que têm sido verificados nos cérebros de indivíduos com esquizofrenia (Montoliu *et al.*, 1995; Schulz *et al.*, 2000). Já foi referido anteriormente que, o risco de suicídio está associado com algumas doenças psiquiátricas, nomeadamente, a esquizofrenia, pelo que as alterações manifestadas em estudos *postmortem* de indivíduos esquizofrénicos, podem estar associadas com uma maior suscetibilidade para o comportamento suicida.

## **Capítulo 4 - Conclusão**

## Capítulo 4 — Conclusão

1. Os resultados obtidos relativos ao polimorfismo C734A do gene *CYP1A2* não revelaram associação entre este polimorfismo genético e o suicídio na amostra estudada.
2. Relativamente ao gene *CYP2E1*, os resultados deste estudo não revelaram associação entre os polimorfismos - 1053C>T e 7632T>A e o suicídio.

## **Capítulo 5 - Referências Bibliográficas**

## Capítulo 5 — Referências Bibliográficas

ACOSTA, F. J.; AGUILAR, E. J.; CEJAS, M. R. & R., GRACIA — Beliefs about illness and their relationship with hopelessness, depression, insight and suicide attempts in schizophrenia. *Psychiatria Danubina*. 25(1) (2013) 49-54.

AJDACIC-GROSS, V.; WEISS, M. G.; RING, M.; HEPP, U.; BOPP, M.; GUTZWILLER, F. & W., RÖSSLER — Methods of suicide: international suicide patterns derived from the WHO mortality database. *Bulletin of the World Health Organization*. 86 (2008) 726-732.

BACKMAN, J. T.; SCHRÖDER, M. T. & P. J., NEUVONEN — Effects of gender and moderate smoking on the pharmacokinetics and effects of the CYP1A2 substrate tizanidine. *Eur J Clin Pharmacol*. 64 (2008) 17-24.

BARREIRO, L. B.; LAVAL, G.; QUACH, H.; PATIN, E. & L., QUINTANA-MURCI — Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nature Genetics*. 40(3) (2008) 340-345.

BASILE, V. S.; OZDEMIR, V.; MASELLIS, M.; WALKER, M. L.; MELTZER, H. Y.; LIEBERMAN, J. A.; POTKIN, S. G.; ALVA, G; KALOW, W; MACCIARDI, F. M. & J. L., KENNEDY — A functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (*CYP1A2*) gene: association with tardive dyskinesia in Schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 5(4) (2000) 410-417.

BENWELL, M. E. M.; BALFOUR, D. J. K. & J. M., ANDERSON — Smoking-associated changes in the serotonergic systems of discrete regions of human brain. *Psychopharmacology*. 102 (1990) 68-72.

BERTOLETE, J. M. & A., FLEISCHMANN — Suicidal behavior prevention: WHO perspectives on research. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 133 (2005) 8-12.

BRENT, D. A. & J. J., MANN — Family genetic studies, suicide, and suicide behavior. *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin Med Genet)*. 133C (2005) 13-24.

BRESLAU, N.; SCHULTZ, L. R.; JOHNSON, E. O.; PETERSON, E. L. & G. C., DAVIS — Smoking and the risk of suicidal behavior. *American Medical Association*. 62 (2005) 328-334.

BRONISCH, T.; HÖFLER, M. & R., LIEB — Smoking predicts suicidality: findings from a prospective community study. *Journal of Affective Disorders*. 108 (2008) 135-145.

BURMEISTER, M. — Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Society of Biological Psychiatry*. 45 (1999) 522-532.

- CARRILLO, J. A. & J., BENITEZ — CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br J Clin Pharmacol.* 41 (1996) 605-608.
- CHONG, S-A.; TAN, E-C.; TAN, C. H. & MYTHILY — Smoking and tardive dyskinesia: lack of involvement of the *CYP1A2* gene. *J Psychiatry Neurosci.* 28(3) (2003) 185-189.
- COOK, E. H. & S. W., SCHERER — Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature.* 455 (2008) 919-923.
- DAI, Y.; RASHBA-STEP, J. & A. I., CEDERBAUM — Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry.* 32 (1993) 6928-6937.
- DAVIES, S.; NAIK, P. C. & A. S., LEE — Depression, suicide, and the national service framework. *BMJ.* 322 (2001) 1500-1501.
- DICKINSON, J. L.; SALE, M. M.; CRAIG, J. E. & D. A., MACKEY — Laboratory methods in ophthalmic genetics: obtaining DNA from patients. *Ophthalmic Genetics.* 22(1) (2001) 49-60.
- DIREÇÃO-GERAL DE SAÚDE (DGS) — Portugal, Saúde mental em números. Programa Nacional para a Saúde Mental. (2013) 1-103.
- DÜRR, U. H. N.; NASKELL, L. & A., RAMAMOORTHY — The cytochromes P450 and b5 and their reductases-promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1768 (2007) 3325-3529.
- EIERMANN, B.; ENGEL, G.; JOHANSSON, I.; ZANGER, U. M. & L., BERTILSSON — The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine. *Br J Clin Pharmacol.* 44 (1997) 439-446.
- ESTABROOK, R. W. — The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. (1998) 202-204.
- FAIRCHILD, A., LEE, M. D. & J. J., MAURER — **PCR Basics.** In: MAURER, John. PCR Methods in Foods. The University of Georgia, USA: Springer, 2006. ISBN: 13:978-0387-28264-0. p. 1-25.
- FERRARI, M.; BOLLA, E.; BORTOLASO, P.; CALLEGARI, C.; POLONI, N.; LECCHINI, S.; VENDER, S.; MARINO, F. & M., COSENTINO — Association between CYP1A2 polymorphisms and clozapine-induced adverse reactions in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research.* 200 (2012) 1014-1017.
- GHOTBI, R.; CHRISTENSEN, M.; ROH, H-K.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; AKLILLU, E. & L., BERTILSSON — Comparisons of *CYP1A2* genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol.* 63 (2007) 537-546.
- GLANTZ, S. A. — Primer of Biostatistics: the program. Version 3.01. New York. McGraw Hill, 1992.

- GONZALEZ, F. J. — The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture CYP2E1. *Drug Metabolism and Disposition*. 35(1) (2007) 1-8.
- GROVES, J. T. — **Models and Mechanisms of Cytochrome P450 action**. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R., *Cytochrome P450, structure, mechanism and biochemistry*, New York: Kluwer Academic, 2005, ISBN: 0-306-48324-6. p. 1-43.
- HASLER, J. A.; ESTABROOK, R.; MURRAY, M.; PIKULEVA, I.; WATERMAN, M.; CAPDEVILA, J.; HOLLA, V.; HELVIG, C.; FALCK, J. R.; FARRELL, G.; KAMINSKY, L. S.; SPIVACK, S. D.; BOITIER, E. & P., BEAUNE — Human cytochromes P450. *Molecular aspects of medicine*. 20 (1999) 1-137.
- HAWTON, K. & K., VAN HEERINGEN — Suicide. *Lancet*. 379 (2009) 1372-81.
- HAYASHI, S. —; WATANABE, J. & K., KAWAJIRI — Genetic polymorphisms in the 5'-Flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P45011E1 gene. *J Biochem*. 110(4) (1991) 559-565.
- HIPÓLITO, L.; SÁNCHEZ-CATALÁN, M. J.; POLACHE, A. & L., GRANERO — *Drug and Alcohol Dependence*. 100 (2009) 83-90.
- HÖFER, P.; SCHOSSER, A.; CALATI, R.; SERRETI, A.; MASSAT, I.; KOCABAS, N. A.; KONSTANTINIDIS, A.; LINOTTE, S.; MENDLEWICZ, J.; SOUERY, D.; ZOHAR, J.; JUVEN-WETZLER, A.; MONTGOMERY, S. & S., KASPER — The impact of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 genes on suicide attempt and suicide risk — a European multicenter study on treatment-resistant major depressive disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 263 (2013) 385-391.
- HOWARD, L. A.; MICU, A. L.; SELLERS, E. M. & R. F., TYNDALE — Low doses of nicotine and ethanol induce CYP2E1 and chlorzoxazone metabolism in rat liver. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 299(2) (2001) 542-550.
- HUGHES, J. R. — Smoking and Suicide: A brief overview. *Drug Alcohol Depend*. 98(3) (2008) 169-178.
- HUNTER, D. J. — Gene-Environment interactions in human diseases. *Nature Reviews*. 6(2005) 287-298.
- HUO, R.; TANG, K.; WEI, Z.; SHEN, L.; XIONG, Y.; WU, X.; NIU, J.; HAN, X.; TIAN, Z.; YANG, L.; FENG, G.; HE, L. & S., QIN — Genetic polymorphisms in CYP2E1: association with schizophrenia susceptibility and risperidone response in the Chinese Han population. *Plos One*. 7(5) (2012) 1-10.
- IKEYA, K.; JAISWAL, A. K.; OWENS, R. A.; JONES, J. E.; NEBERT, D. W. & S., KIMURA — Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous gene, and differences in liver IA2 mRNA expression. *Molecular Endocrinology*. 3(9) (1989) 1399-1408.
- INGELMAN-SUNDBERG, M. — Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci*. 25(4) (2004) 193-200.

- INGELMAN-SUNDBERG, M.; SIM, S. C.; GOMEZ, A. & C., RODRIGUEZ-ANTONA — Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacology and Therapeutics*. 116 (2007) 496-526.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM — Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431 (2004) 931-945.
- ISHII, T.; HASHIMOTO, E.; UKAI, W.; KAKUTANI, Y.; SASAKI, R. & T., SAITO — Characteristics of attempted suicide by patients with schizophrenia compared with those with mood disorders: a case-controlled study in northern Japan. *PLOS ONE*. 9(5) (2014).
- KINGSMORE, S. F.; LINDQUIST, I. E., MUDGE, J.; GESSIER, D. D. & W. D., BEAVIS — Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. *Nature Reviews*. 7 (2008) 221-230.
- KIRCHHEINER, J.; NICKCHEN, K.; BAUER, M.; WONG, M-L.; LICINIO, J.; ROOTS, I. & J., BROCKMÖLLER — Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Molecular Psychiatry*. 9 (2004) 442-473.
- LAJE, G.; PADDOCK, S.; MANJI, H.; RUSH, A. J.; WILSON, A. F.; CHARNEY, D. & F. J., MCMAHON — Genetic markers of suicidal ideation emerging during citalopram treatment of major depression. *Am J Psychiatry*. 164 (2007) 1530-1538.
- LEON, A. C.; SOLOMON, D. A.; FIEDOROWICZ, J. G.; CORYELL, W. H.; ENDICOTT, J. & M. B., KELLER — Antidepressants and risks of suicide and suicide attempts: a 27-year observational study. *J Clin Psychiatry*. 72(5) (2011) 580-586.
- LICINIO, J. & M. L., WONG — Pharmacogenomics of antidepressant treatment effects. *Dialogues Clin Neurosci*. 13(1) (2011) 63-71.
- LIEBER, C. S. — Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOs): The first 30 years (1968-1998) — A review. *Alcoholism: clinical and experimental research*. 23(6) (1999) 991-1007.
- LOUS, J. A. E.; van TROOSTWIJK, D.; KOOPMANS, R. P.; VERMEULEN, H. D. B. & GUCHELAAR, H.-J. — CYP1A2 activity is an important determinant of clozapine dosage in schizophrenic patients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 20 (2003) 451-457.
- LU, Y. & A. I., CEDERBUAM — CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med*. 44(5) (2008) 723-738.
- MALONE, K. M.; WATERNAUX, C.; HAAS, G. L.; COOPER, T. B.; LI, S. & J. J., MANN — Cigarette smoking, suicidal behavior, and serotonin function in major psychiatric disorders. *Am J Psychiatry*. 160 (2003) 773-779.

- MANN, J. J. — Neurobiology of suicidal behavior. *Nat Rev Neurosci.* 4 (2003) 819-828.
- MCGUFFIN, P.; PERROUD, N.; UHER, R.; BUTLER, A.; AITCHISON, K. J.; CRAIG, I.; LEWIS, C. & A., FARMER — The genetics of affective disorder and suicide. *European Psychiatric.* 25 (2010) 275-277.
- MELTZER, H. Y.; ALPHS, L.; GREEN, A. I.; ALTAMURA, A. C.; ANAND, R.; BERTOLDI, A.; BOURGEOIS, M.; CHOUINARD, G.; ISLAM, Z.; KANE, J.; KRISHNAN, R.; LINDENMAYER, J.-P. & S., POTKIN — Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 60 (2003) 82-91.
- MELTZER, H. Y. — Update on typical and atypical antipsychotic drugs. *Annu Rev Med.* 64 (2013) 393-406.
- MIKSYS, S. & R. F., TYNDALE — Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *J Psychiatry Neurosci.* 38(3) (2013) 152-163.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D. & H. F., POLESKY — A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 16(3) (1988) 1215.
- MILLER, A. H.; MALETIC, V. & C. L., RAISON — Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry.* 65(9) (2009) 732-741.
- MONTOLIU, C.; SANCHO-TELLO, M.; AZORIN, I.; BURGAL, M.; VALLES, S.; RENAUI-PIQUERAS, J. & C., GUERRI — Ethanol induces cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem.* 65 (1995) 2561-2570.
- MULLIS, K. B. — The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* 26(4) (1990) 56-65.
- NAKAJIMA, M.; YOKOI, T.; MIZUTANI, M.; KINOSHITA, M.; FURAYAMA, M. & T., KAMATAKI — Genetic polymorphism in the 5'-Flanking region of human *CYP1A2* gene: Effect on the *CYP1A2* inducibility in humans. *J Biochem.* 125(4) (1999) 803-808.
- NEBERT, D. W.; WIKWALL, K. & W. L., MILTER — Human cytochromes P450 in health an disease. *Phil Trans R Soc B.* 368 (2013).
- NICKLAS, J. A. & E., BUEL — Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 376 (2003) 1160-1167.
- OGONY, J.; MATTHEWS, R.; ANNI, H.; SHANNON, K. & N., ERCAL — The mechanism of elevated toxicity in HepG2 cells due to combined exposure to ethanol and ionizing radiation. *Journal of Applied toxicology.* 28 (2008) 345-355.
- OMURA, T. E. & R., SATO — A new cytochrome in liver microsomes. 237(4) (1962) 1375-1376.

- OWEN-REECE, H., SMITH, M., ELWELL, C. E. & J. C., GOLDSTONE — Near infrared spectroscopy. *British Journal of Anaesthesia*. 82(3) (1999) 418-26.
- PALMER, B. A.; PANKRATZ, S. & J. M., BOSTWICK — The lifetime risk of suicide in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 62 (2005) 247-253.
- PEAKE, I. — The polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 42 (1989) 673-676.
- PERLIS, R. H.; PURCELL, S.; FAVA, M.; FAGERNES, J.; RUSH, J.; TRIVEDI, M. H. & J. W., SMOLLER — Association between treatment-emergent suicidal ideation with citalopram and polymorphisms near cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the STAR\*D study. *Arch Gen Psychiatry*. 64 (2007) 689-697.
- POMPILI, M.; AMADOR, X. F.; GIRARDI, P.; FRIEDMAN, J. H.; HARROW, M.; KAPLAN, K.; KRAUSZ, M.; LESTER, M.; MELTZER, H. Y.; MODESTIN, J.; MONTROSS, L.; MORTENSEN, P. B.; MUNK-JORGENSEN, P.; NIELSEN, J.; NORDENTOFT, M.; SAARINEN, P. I.; ZISOOK, S.; WILSON, S. T. & R., TATARELLI — Suicide risk in schizophrenia: learning from the past to change the future. *Annals of General Psychiatry*. 6(10) (2007) 1-22.
- PORCELLI, S.; FABBRI, C.; DRAGO, A.; GIBIINO, S.; DE RONCHI, D. & A., SERRETI — Genetics and antidepressant: where we are. *Clinical Neuropsychiatry*. 8(2) (2011) 99-150.
- RAISON, C. L.; CAPURON, L. & A. H., MILLER — Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*. 27(1) (2006) 24-31.
- REUTFORS, J.; BAHMANYAR, S.; JÖNSSON, E. G.; BRANDT, L.; BODÉN, R.; EKBOM, A. & U., ÖSBY — Medication and suicide risk in schizophrenia: a nested case-control study. *Schizophrenia Research*. 150 (2013) 416-420.
- SACHSE, P.; BROCKMÖLLER, J.; BAUER, S. & I., ROOTS — Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 *CYP1A2* gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 47 (1999) 445-449.
- SACHSE, P.; BHAMBRA, U.; SMITH, G.; LIGHTFOOT, T. J.; BARRET, J. H.; SCOLLAY, J.; GARNER, R. C.; BOOBIS, A. R.; WOLF, C. R. & N. J., GOODERHAM — Polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP1A2* gene (*CYP1A2*) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 55 (2003) 68-76.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & H. A., ERLICH — Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839) (1988) 487-491.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & T., MANIATIS — **Molecular cloning, A Laboratory Manual**. Second Edition. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. ISBN 0-87969-309-6.

- SANCHEZ-GISTAU, V.; BAEZA, I.; ARANGO, C.; GONZÁLEZ-PINTO, A.; de la SERNA, E.; PARELLADA, M.; GRAELL, M.; PAYA, B.; LLORENTE, C. & J., CASTRO-FORNIELES — Predictors of suicide attempt in early-onset, first-episode psychoses: a longitudinal 24-month follow-up study. *J Clin Psychiatry*. 74(1) (2013) 59-66.
- SCHULZ, J. B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J. & J., DICHGANS — Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*. 267 (2000) 4904-4911.
- SCHULZE, T. G.; SCHUMACHER, J.; MÜLLER, D. J.; KRAUSS, H.; ALFTER, D.; MAROLDT, A.; AHLE, G.; MAROLDT, A-O.; FERNÁNDEZ, A. N.; WEBER, T.; HELD, T.; PROPPING, P.; MAIER, W.; NÖTHEN, M. M. & M., RIETCHEL — Lack of association between a functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics*. 105 (2001) 498-501.
- SERAFINI, G.; POMPILI, M.; INNAMORATI, M.; GENTILE, G.; BORRO, M.; LALA, N.; NEGRO, A.; SIMMACO, M.; GIRARDI, P. & P., MARTELLETTI — Gene variants with suicidal risk in a sample of subjects with chronic migraine and affective temperamental dysregulation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 16 (2012) 1389-1398.
- SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; INUI, Y. & F. P., GUENGERICH — Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 270(1) (1994) 414-423.
- SIM, S. C.; KACEVSKA, M. & M., INGELMAN-SUNDBERG — Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *The Pharmacogenomics Journal*. 13 (2013) 1-11.
- TAN, S. C. & B. C., YIAP — DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. (2009) doi:10.1155/2009/574398.
- TANSKANEN, A.; VIINAMÄKI, H.; HINTIKKA, J.; KOIVUMAA-HONKANEN, H.-T & J., LEHTONEN — Smoking and Suicidality among psychiatric patients. *Am J Psychiatry*. 155(1) (1998) 129-130.
- TAY, J. K. X.; TAN, C. H.; CHONG, S.-A. & E.-C., TAN — Functional polymorphisms of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene and prolonged QTc interval in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 32 (2007) 1297-1302.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM — A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 449 (2007) 851-862.
- THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM — A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 467 (2011) 1061-1073.

- THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM — An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 491 (2012) 56-65.
- TIIHONEN, J.; SUOKAS, J. T.; SUVISAARI, J. M.; HAUKKA, J. & P., KORHONEN — Polypharmacy with antipsychotics, antidepressants, or benzodiazepines and mortality in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 69(5) (2012) 476-483.
- TIWARI, A. K.; DESHPANDE, S. N.; RAO, A. R.; BHATIA, T.; MUKIT, S. R.; SHRIHARSH, V.; LERER, B.; NIMAGAONKAR, V. L. & B. K., THELMA — Genetic susceptibility to tardive dyskinesia in chronic schizophrenia subjects: I. association of CYP1A2 gene polymorphism. *The Pharmacogenomics Journal*. 5 (2005) 60-69.
- UEMATSU, F.; KIKUCHI, H.; OHMACHI, T.; SAGAMI, I.; MOTOMIYA, M.; KAMATAKI, T.; KOMORI, M. & M., WATANABE — Two common RFLPs of the human CYP2E1 gene. *Nucleic Acids Research*. 19(10) (1991) 2803.
- UMENO, M.; MCBRIDE, O. W.; YANG, C. S.; GELBOIN, H. V. & F. J., GONZALEZ — Human ethanol-inducible P450IIE1: Complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *American Chemical Society*. 27(25) (1988) 9006-9013.
- UPADHYA, S. C.; TIRUMALAI, P. S.; BOYD, M. R.; MORI, T. & V., RAVINDRANATH — Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence *in situ* hybridization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 373(1) (2000) 23-34.
- VIDEIRA, A. — **Engenharia Genética, Princípios e Aplicações**. 2ª Edição. Local: Lisboa Lidel, 2011. ISBN: 978-972-757-743-9.
- VIKKI, M.; KAMPMAN, O.; SEPPÄLÄ, N.; MONONEN, N.; LEHTIMÄKI, T. & E., LEINONEN — CYP1A2 polymorphism -1545C>T (rs2470890) is associated with increased side effects to clozapine. *BMC Psychiatry*. 14:50 (2014).
- WANG, S. L.; LEE, H.; CHEN, K. W.; TSAI, K. J.; CHEN, C. Y. & P., LIN — Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer*. 26(1) (1999) 27-34.
- WATANABE, J.; HAYASHI, S. —I & K., KAWAJURI — Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the *RsaI* polymorphism in the 5'-Flanking region. *J Biochem*. 116 (1994) 321-326.
- WEITOF, G. R.; BERGLUND, M.; LINDSTRÖM, E. A.; NILSSON, M.; SALMI, P. & M., ROSÉN — Mortality, attempted suicide, re-hospitalisation and prescription refill for clozapine and other antipsychotics in Sweden — a register-based study. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 23 (2014) 290-298.
- WERCK-REICHHART, D. & R., FEYEREISEN — Cytochromes P450: a success story. *Genome biology*. 1(6) (2000).

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – World Suicide Prevention Day, International Association for suicide prevention. (2012).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – World Suicide Prevention Day, Stigma: A major barrier to suicide prevention. (2013).
- YIM, E. –Y; KANG, H. –R; JUNG, J. –W, SOHN, S. –W & S. –H, CHO – CYP1A2 polymorphism and theophylline clearance in Korean non-smoking asthmatics. *Asia Pac Allergy*. 3 (2013) 231-240.
- ZHOU, S.-F; YANG, L.-P; ZHOU, Z.-W; LIU, Y.-H & E., CHAN – Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. *The AAPS Journal*. 11(3) (2009) 481-494.
- ZIMA, T.; FIALOVÁ, L.; MESTEK, O.; JANEBOVÁ, M.; CRKOVSKÁ, J.; MALBOHAN, I.; STÍPEK, S. & L., MIKULÍKOVÁ – Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci*. 8 (2001) 59-70.
- ZOBEL, A. & W., MAIER – Pharmacogenetics of antidepressive treatment. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 260(5) (2010) 407-417.

