

Ana Rita Gomes de Paiva

Farmacogenética em Toxicologia Forense

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Ana Rita Gomes de Paiva

Farmacogenética em Toxicologia Forense

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Ana Rita Gomes de Paiva

Farmacogenética em Toxicologia Forense

Atesto a originalidade do trabalho:

(Ana Rita Gomes de Paiva)

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho

Porto, 2014

Resumo

A farmacogenética é a ciência que estuda a influência da componente genética nas respostas a tratamentos farmacológicos. Estas podem variar entre indivíduos devido a vários fatores, sendo um deles a ocorrência de polimorfismos em genes que codifiquem proteínas envolvidas no metabolismo, transporte do fármaco ou que sejam o alvo da ação farmacológica. Os estudos farmacogenéticos têm desempenhado um importante papel na área da toxicologia forense uma vez que acrescentam informações que podem auxiliar na identificação da causa e circunstância da morte, especialmente nos casos em que as concentrações de fármacos encontradas nas análises toxicológicas *post mortem* são difíceis de interpretar. Estas informações adicionais servem essencialmente para determinar se a morte foi intencional ou acidental, tendo sido publicados vários casos que o demonstram. No entanto, estes estudos apresentam ainda bastantes limitações e são necessárias mais evidências científicas para que sejam implementados na rotina médico-legal e possam ser usados como evidência em tribunal. Apesar deste facto, é amplamente reconhecido que os polimorfismos genéticos podem desempenhar um relevante papel nas mortes e isto alerta para a necessidade da realização de estudos farmacogenéticos aquando da prescrição médica de forma a evitar que tal aconteça.

Abstract

Pharmacogenetics is the science that studies the influence of genetic component in responses to pharmacological treatments. These can vary between individuals due to various factors, one being the occurrence of polymorphisms in genes encoding proteins involved in metabolism, transport of the drug or are the target of pharmacological action. The pharmacogenetics studies have played an important role in the field of forensic toxicology since it adds information that can help to conclude about the cause and manner of death in cases where drugs are found in certain concentrations and thus toxicological results are not clear. This additional information should primarily serve to distinguish intentional and accidental causes and there are several published cases that show that. However, these studies still have many limitations and are needed more scientific evidence before can be implemented in forensic routine and can be used as evidence in court. Despite this fact, there is evidence that genetic polymorphisms may play a role in the deaths and this points to the need of conducting pharmacogenetics studies on prescription to avoid that.

Agradecimentos

Aproveito este espaço para agradecer àqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a execução desta dissertação.

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Prof. Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho, por toda a disponibilidade e pelos bons conselhos dados ao longo deste percurso.

A toda a minha família e amigos, mas principalmente à minha mãe, um obrigado pelo apoio, amor e carinho prestados

Por fim, um agradecimento especial ao Nuno Lima por todo o apoio e paciência nos momentos de maior stress.

Índice

I.	Introdução.....	1
II.	Farmacogenética.....	3
2.1.	Polimorfismos genéticos do metabolismo de fármacos.....	4
2.1.1.	Reações metabólicas de fase I.....	5
2.1.2.	Reações metabólicas de fase II.....	8
2.2.	Polimorfismos genéticos dos transportadores de fármacos.....	9
2.3.	Polimorfismos genéticos de alvos farmacológicos.....	11
2.4.	Etnia e polimorfismos genéticos.....	12
2.5.	Técnicas e métodos de genotipagem.....	12
III.	Toxicologia forense.....	16
IV.	Aplicação da farmacogenética em toxicologia forense.....	20
4.1.	Opióides.....	20
4.1.1.	Codeína.....	20
4.1.2.	Tramadol.....	22
4.1.3.	Oxicodona.....	24
4.1.4.	Metadona.....	27
4.1.5.	Etilmorfina.....	29
4.1.6.	Fentanilo.....	30
4.2.	Antidepressivos.....	32
4.2.1.	Amitriptilina.....	32

4.2.2. Venlafaxina.....	33
4.2.3. Fluoxetina.....	36
4.2.4. Doxepina.....	37
4.3. Outros.....	39
4.3.1. Digoxina.....	39
4.3.2. Diazepam.....	40
V. Limitações e perspectivas futuras.....	44
VI. Conclusão.....	46
VII. Referências bibliográficas.....	47

Índice de Figuras

Figura 1 - Possíveis respostas ao tratamento com o mesmo fármaco numa população de doentes.....	3
Figura 2 - Esquema do metabolismo geral de fármacos.....	5
Figura 3 - Representação esquemática dos genótipos dos diferentes perfis metabólicos que podem ser encontrados na população.....	7
Figura 4 - Representação esquemática da distribuição e função da P-gp no organismo humano.....	10
Figura 5 – Representação esquemática do método de amplificação alelo-oligonucleotídeo específica.....	14
Figura 6 - Representação esquemática do método PCR em tempo real com sonda TaqMan®.....	14
Figura 7 - Representação dos padrões de hibridização de diferentes genótipos obtidos pelo método que recorre à tecnologia de DNA microarray.....	15
Figura 8 - Representação esquemática das reações bioquímicas e enzimas envolvidas na produção do sinal luminoso na pirosequenciação.....	15
Figura 9 - Algoritmo para a aplicação da farmacogenética em toxicologia forense.....	19
Figura 10 - Representação esquemática do metabolismo da codeína.....	21
Figura 11 - Representação esquemática do metabolismo do tramadol.....	23
Figura 12 - Representação esquemática do metabolismo da oxicodona.....	24
Figura 13 - Representação esquemática da conversão da metadona a 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno.....	27
Figura 14 – Representação esquemática do metabolismo da etilmorfina.....	29

Figura 15 - Representação esquemática do metabolismo do fentanilo.....	31
Figura 16 - Representação esquemática do metabolismo da amitriptilina.....	33
Figura 17 - Representação esquemática do metabolismo da venlafaxina.....	34
Figura 18 - Representação esquemática do metabolismo da fluoxetina.....	36
Figura 19 - Representação esquemática do metabolismo da doxepina.....	37
Figura 20 - Distribuição mundial da frequência dos alelos mutantes para os três SNPs.....	40
Figura 21 - Frequência dos alelos mutantes para os três SNPs na totalidade de acordo com o gênero e a concentração de digoxina no grupo de estudo em comparação com o grupo controle.....	40
Figura 22 - Representação esquemática do metabolismo do diazepam.....	41

Índice de Tabelas

Tabela I - Alelos principais das principais enzimas metabólicas de fase I e consequente efeito na sua atividade.....8

Tabela II - Farmacogenética das enzimas metabólicas de fase II.....9

Tabela III - Descrição das técnicas de genotipagem mais utilizadas em farmacogenética.....13

Abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato

CYP – Citocromo P450 (*Cytochrome P450*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

C_f/C_m – Concentração de fármaco pai/Concentração dos seus metabolitos

MDR 1 – Resistência a múltiplos fármacos (*Multidrug resistance 1*)

NAT – N-acetiltransferase

OATP – Polipéptido transportador de aniões orgânicos (*Organic anion transporting polipeptide*)

P-gp – Glicoproteína P (*P glycoprotein*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

RAM – Reações adversas ao medicamento

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction fragment length polymorphism*)

SLC – Transportadores de solutos (*Solute carriers*)

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*)

TPMT – Tiopurina S-metiltransferase

I. Introdução

Existe uma grande variedade interindividual na resposta aos fármacos, bem como na sua toxicidade. Ao administrar uma mesma dose padrão de um determinado fármaco a um grupo de doentes é possível que, em alguns dos casos, ocorram respostas que não são as desejadas: o fármaco pode não ter qualquer ação, o fármaco pode apenas ter ação parcial ou o fármaco pode provocar uma reação adversa (RAM) (Wilkinson, 2012).

Esta diferença na resposta aos fármacos pode ser devida a fatores fisiológicos (idade, género, estado nutricional), patológicos (por exemplo, doenças hepáticas e renais), ambientais, interações entre fármacos ou mesmo devido a determinados hábitos de vida, como a ingestão de álcool e o consumo de tabaco (Evans e Relling, 2004). No entanto, fatores genéticos podem também estar relacionados com a alteração da eficácia dos fármacos e desencadeamento de reações adversas (Kallow *et al.*, 2001). Desta forma, considerando que os fatores genéticos podem contribuir para a eficácia e a segurança de um medicamento (Metzger *et al.*, 2006), a área de Farmacogenética e/ou Farmacogenómica tem sido desenvolvida e é, atualmente, de grande interesse tanto na clínica como na toxicologia forense (Neuvonen *et al.*, 2011).

A Farmacogenética e/ou Farmacogenómica pode então ser definida como a ciência que estuda as bases genéticas das respostas interindividuais a tratamentos farmacológicos (Shi *et al.*, 2001), estando a Farmacogenética direcionada para o estudo dos efeitos de gene isolados e a Farmacogenómica para o estudo simultâneo de todos os genes e das suas interações. A diferença entre os dois conceitos é muito ténue e, desta forma, são normalmente utilizados indistintamente (Evans e Relling, 1999).

Estima-se que 99,99% do genoma humano seja idêntico em todos os indivíduos, sendo que as diferenças encontradas podem ser mutações, quando a sua incidência na população é inferior a 1%, ou polimorfismos, quando estas ocorrem com mais frequência e, por isso, é comum a sua presença na população. O tipo de polimorfismo mais prevalente envolve apenas a variação de um único par de bases na sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA), sendo denominado de polimorfismo de nucleótido único ou SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) (Cooper *et al.*, 2005). Mais de 1,4

milhões de SNP foram identificados no genoma humano sendo 60,000 deles na região codificadora dos genes (Evans e Johnson, 2001).

A maioria dos efeitos dos fármacos é determinada pela interação destes com diversos produtos da expressão genética, tais como enzimas, transportadores e alvos farmacológicos. Polimorfismos nestes produtos da expressão genética podem resultar em alterações na farmacocinética - absorção, distribuição, metabolização e excreção – e na farmacodinâmica - interação do fármaco com os alvos de ação (Wilkinson, 2012). Tal pode levar a efeitos não desejados e à necessidade da individualização terapêutica consoante os SNP encontrados (Evans e Relling, 2004).

As RAM constituem um importante problema de saúde pública uma vez que são causas significativas de hospitalização, aumento do tempo de permanência hospitalar e até mesmo de óbito. Em Portugal, segundo dados do Sistema Nacional de Farmacovigilância, as RAM foram responsáveis por 333 mortes, no período de 2009 a 2011 (Infarmed, 2012a).

A autópsia médico-legal é o primeiro método utilizado para determinar a causa da morte quando se suspeita que esta não foi de causa natural. Em alguns casos, mesmo após autópsia completa, recorrendo a observação histológica e ao despiste toxicológico, a causa da morte continua a ser ambígua (Ackerman *et al.*, 2001). As mortes relacionadas com fármacos estão incluídas neste grupo (Koski *et al.*, 2007) e, nestes casos, pode ser de extrema importância a genotipagem *post mortem* e a análise da proporção de metabolitos no sangue de forma a verificar se os fatores genéticos podem ter estado na origem da morte, possibilitando, assim, descartar outras causas (Druid *et al.*, 1999).

O objetivo do presente trabalho é estabelecer uma relação entre a farmacogenética e a toxicologia forense, recorrendo à apresentação de alguns casos reais que ilustram a aplicação da farmacogenética no contexto médico-legal.

II. Farmacogenética

A uma população de doentes com o mesmo diagnóstico e aos quais foi administrado o mesmo tratamento podem ser verificadas diferentes respostas terapêuticas (figura 1). Excluindo outros fatores influenciadores, tais resultados podem ser estudados e explicados pela Farmacogenética/Farmacogenómica (Kallow *et al.*, 2001; Evans e Relling, 2004).

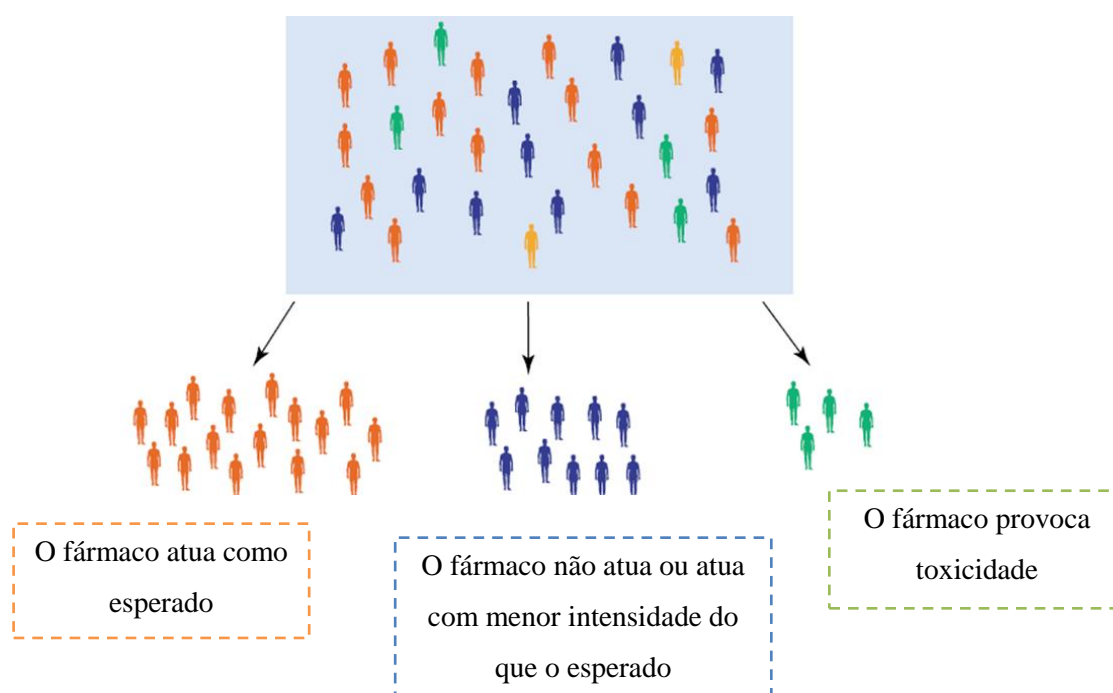


Figura 1 – Possíveis respostas ao tratamento com o mesmo fármaco numa população de doentes.

Os primeiros relatos farmacogenéticos documentados datam na década de 50 em que se constatou que a primaquina e outros fármacos antimaláricos quimicamente relacionados causavam uma crise hemolítica aguda em cerca de 10% dos afro-americanos e que tal raramente acontecia nos caucasianos. Mais tarde soube-se que esta diferença devia-se à deficiência na enzima glucose-6-fosfato desidrogenase. A variação genética entre populações foi observada também através da toxicidade de alguns fármacos, nomeadamente succinilcolina e isoniazida. No primeiro caso observou-se que em alguns indivíduos ocorria um prolongamento da paralisia muscular induzida pelo fármaco e

consequente aumento do risco de apneia. Em relação à isoniazida, o seu metabolismo depende essencialmente da acetilação e as diferenças observadas entre as diferentes populações permitiram classificar os pacientes como acetiladores rápidos ou lentos (Pessôa *et al.*, 2006; Sajantila *et al.*, 2010).

Estas e outras situações documentadas, juntamente com a teoria de que a genética seria a base das RAM observadas, foram sumarizadas em 1957 e pouco tempo mais tarde surgiu então o termo “farmacogenética”. Ao longo das décadas seguintes os mecanismos moleculares foram sendo descobertos e na década de 80 o gene *CYP2D6* foi o primeiro a ser clonado e caracterizado (Gonzalez *et al.*, 1988).

Através dos conhecimentos de farmacogenética que foram adquiridos ao longo dos anos, atualmente sabe-se que a resposta terapêutica a um fármaco pode então ser alterada por polimorfismos a nível das enzimas metabolizadoras, transportadores ou alvos farmacológicos (Wilkinson, 2012).

2.1. Polimorfismos genéticos do metabolismo de fármacos

Os fármacos, outros químicos e até compostos endógenos aos quais o organismo está exposto são, na sua maioria, compostos lipófilos. Assim, para serem excretados, necessitam de sofrer alterações, de forma a tornarem-se mais hidrossolúveis e, conseqüentemente, mais facilmente excretados. O metabolismo é responsável por essas modificações, que podem ocorrer por reações de fase I, como por exemplo, oxidações, reduções e hidrólises e/ou reações de fase II, que incluem reações de conjugação com ião sulfato, ácido glucorónico, grupo acetilo, grupo metilo e glutatona (figura 2).

É também importante referir que o metabolismo, além de ser responsável pela destoxificação de compostos, pode converter pró-fármacos nos seus compostos farmacologicamente ativos (Evans e Relling, 1999; Wilkinson, 2012). As enzimas que intervêm nestes processos demonstram ter variações interindividuais na sua expressão e atividade, o que resulta em diferentes fenótipos. Tal pode ser resultado de causas transitórias como inibição ou indução das enzimas por outros fármacos ou de causas

permanentes, que é o caso de polimorfismos nos genes que codificam a expressão dessas enzimas (Ma *et al.*, 2002).

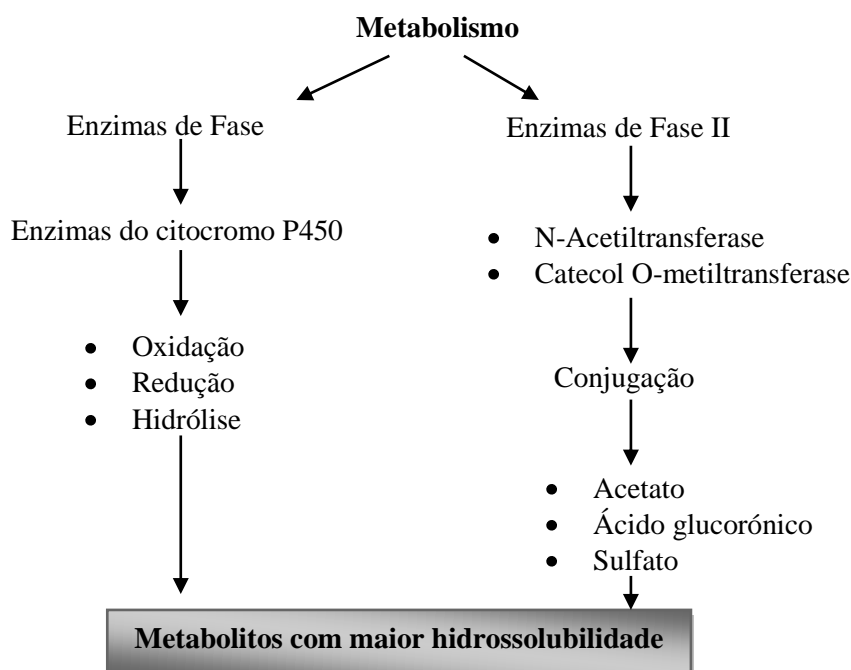


Figura 2 – Esquema do metabolismo geral de fármacos.

Em seguida apresentam-se as enzimas envolvidas nas reações já referidas e as alterações que nelas podem ocorrer que levam a modificações na farmacocinética de fármacos por elas metabolizados e, por conseguinte, a modificações na resposta farmacológica dos mesmos.

2.1.1. Reações metabólicas de fase I

As enzimas do citocromo P450 (CYP) têm um papel fundamental nas reações metabólicas de fase I. Existem cerca de mais de 30 famílias e diversas subfamílias de CYP, sendo que as principais na metabolização de fármacos são as famílias de 1 a 3 e as restantes intervêm essencialmente na biossíntese e metabolismo de compostos endógenos (Singh *et al.*, 2011). O genoma humano contém cerca de 115 genes codificadores de enzimas CYP, 57 dos quais são funcionais e os restantes pseudogenes.

Dentro das famílias de 1 a 3 existem 22 isoformas diferentes, sendo que estas são altamente polimórficas em comparação com o que se verifica nas restantes famílias (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006).

Consoante o seu grau de polimorfismo e a respetiva influência na suscetibilidade interindividual aos xenobióticos, as enzimas CYP são distribuídas em duas classes distintas (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006):

Classe I constituída pelas CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 e CYP3A4, que são caracterizadas por estarem envolvidas tanto no metabolismo de fármacos como de pró-carcinogénios e por terem um baixo grau de polimorfismos funcionais;

Classe II constituída pelas CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6, que são caracterizadas por estarem envolvidas apenas no metabolismo de fármacos e serem altamente polimórficas, podendo levar a perturbações colossais no metabolismo e efeito dos mesmos.

Tais polimorfismos podem levar a que o perfil metabólico dos indivíduos seja alterado, o que se traduz em diferentes fenótipos (Ingelman-Sundberg, 2004; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007) (figura 3), nomeadamente:

Metabolizadores pobres são indivíduos com ausência da enzima funcional, o que pode decorrer de deleção do gene ou da homozigotia para alelos responsáveis por metabolismo deficiente;

Metabolizadores intermédios são indivíduos heterozigóticos para um alelo funcional e um não funcional ou deficiente, o que resulta numa atividade diminuída da enzima metabolizadora;

Metabolizadores extensivos são indivíduos homozigóticos para os alelos funcionais e é o fenótipo mais comum na população;

Metabolizadores ultra-rápidos são indivíduos que têm múltiplas duplicações do gene que codifica a enzima, o que se traduz num aumento de produção da mesma.

Farmacogenética em Toxicologia Forense

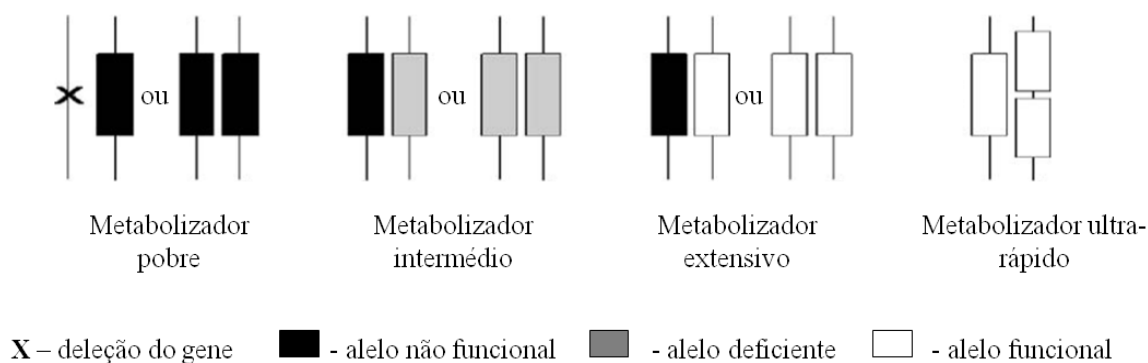


Figura 3 - Representação esquemática dos genótipos dos diferentes perfis metabólicos que podem ser encontrados na população (adaptado de (Sajantila *et al.*, 2010).

Por serem responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos, as enzimas do CYP têm sido o alvo preferencial de estudo em farmacogenética. A identificação dos polimorfismos pode então ser utilizada para prever a resposta a um determinado fármaco e os avanços tecnológicos permitiram que tal fosse possível (Jortani *et al.*, 2012). A genotipagem e o consequente aperfeiçoamento dos métodos utilizados revolucionaram o campo da farmacogenética. A enzima CYP2D6 foi a primeira a ser caracterizada a nível molecular e atualmente conhecem-se cerca de 90 variações alélicas. Contudo, também foram identificadas variações alélicas para outras enzimas importantes – 21 e 29 para a CYP2C9 e CYP2C19, respetivamente. Para as enzimas CYP3A4 e CYP3A5 estão também descritas algumas mas uma vez que estas enzimas são pouco polimórficas e os alelos variantes aparecem normalmente em heterozigotia com o alelo funcional, não são tão relevantes. Na tabela I estão representados os principais alelos das enzimas referidas anteriormente e a forma como estes afetam a atividade das mesmas. O alelo funcional é representado por *1 e as variantes por *seguido do número correspondente (Johansson *et al.*, 1993; Pelotti e Bini, 2011).

Tabela I – Alelos principais das principais enzimas metabólicas de fase I e consequente efeito na sua atividade (Pelotti e Bini, 2011; Jortani *et al.*, 2012).

	Alelos			
	Funcionais	Não funcionais	Função reduzida	Atividade aumentada
CYP2D6	*1; *2	*3; *4; *5; *6	* 9; *10; *17; *29; *41	Duplicação dos alelos funcionais
CYP2C19	*1	*2; *3		
CYP2C9	*1		*2; *3	
CYP3A4	*1		*1B	
CYP3A5	*1		*3	

2.1.2. Reações metabólicas de fase II

Os exemplos mais importantes de enzimas de fase II são a N-acetiltransferase (NAT) e a tiopurina S-metiltransferase (TPMT). Existem dois genes da NAT – *NAT1* e *NAT2* (Blum *et al.*, 1990), sendo que os polimorfismos que levam a alterações no metabolismo dos fármacos envolvem o *NAT2* e estão normalmente associados a reações adversas no tratamento com isoniazida, dapsona e sulfoniazida (Ingelman-Sundberg, 2001).

Os fármacos tiopurínicos, tais como a mercaptopurina e a azatiopurina (pró-fármaco que *in vivo* é convertido em mercaptopurina), são usados na clínica como imunossuppressores e no tratamento de neoplasias. A metabolização destes fármacos é, em parte, catalisada pela TPMT. Esta enzima pode ter variações genéticas e sabe-se que cerca de 90% dos indivíduos têm a sua atividade aumentada (Evans, 2003). O resumo do que foi anteriormente referido, bem como outros exemplos de variações farmacogenéticas que envolvem as enzimas metabólicas de fase II, são descritos na tabela II.

Tabela II - Farmacogenética das enzimas metabólicas de fase II (adaptada de (Guttmacher e Collins, 2003).

Enzima	Frequência do fenótipo metabolizador pobre	Fármacos metabolizados	Efeito do polimorfismo
N-Acetiltransferase 2	52% dos americanos brancos 17 % dos japoneses	Isoniazida Hidralazina Procainamida	Efeito aumentado do fármaco, podendo levar a toxicidade
Uridina difosfato-glucuronosiltransferase 1A1	10,9% dos caucasianos 4% dos chineses 1% dos japoneses	Irinotecano	
Tiopurina S-metiltransferase	1 em cada 300 caucasianos 1 em cada 2500 asiáticos	Mercaptopurina Azatiopurna	
Catecol O-metiltransferase	25% dos caucasianos	Levodopa	

2.2. Polimorfismos genéticos dos transportadores de fármacos

Algumas proteínas funcionam como transportadores e são fundamentais para os processos de absorção, distribuição, toxicidade e eficácia dos fármacos, uma vez que auxiliam a transposição de barreiras fisiológicas. A inibição ou indução destes transportadores devido a polimorfismos apenas são significativas ao nível da eficácia do fármaco se a eliminação deste ou a sua distribuição no tecido alvo é efetuada principalmente pelo transportador, afetando assim a sua concentração na corrente sanguínea e no local de ação (Shitara *et al.*, 2006; Maeda e Sugiyama, 2008). Pode ser apresentada como exemplo a glicoproteína P (P-gp), produto da expressão do gene de resistência a múltiplos fármacos (MDR1 ou ABCB1). Este transportador é dependente de adenosina trifosfato (ATP) e está presente na superfície luminal dos tecidos que funcionam como barreiras biológicas, tais como, intestino e cérebro, assim como nos órgãos com funções excretoras que é o caso do fígado e rins (figura 4). A distribuição

da P-gp indica que esta protege o organismo dos efeitos tóxicos de alguns xenobióticos pois limita a sua absorção a partir do lúmen intestinal, favorece a excreção renal e biliar e reduz a sua acumulação nos tecidos mais vulneráveis, tais como o cérebro e os testículos (Higgins, 2007; Hodges *et al.*, 2011).

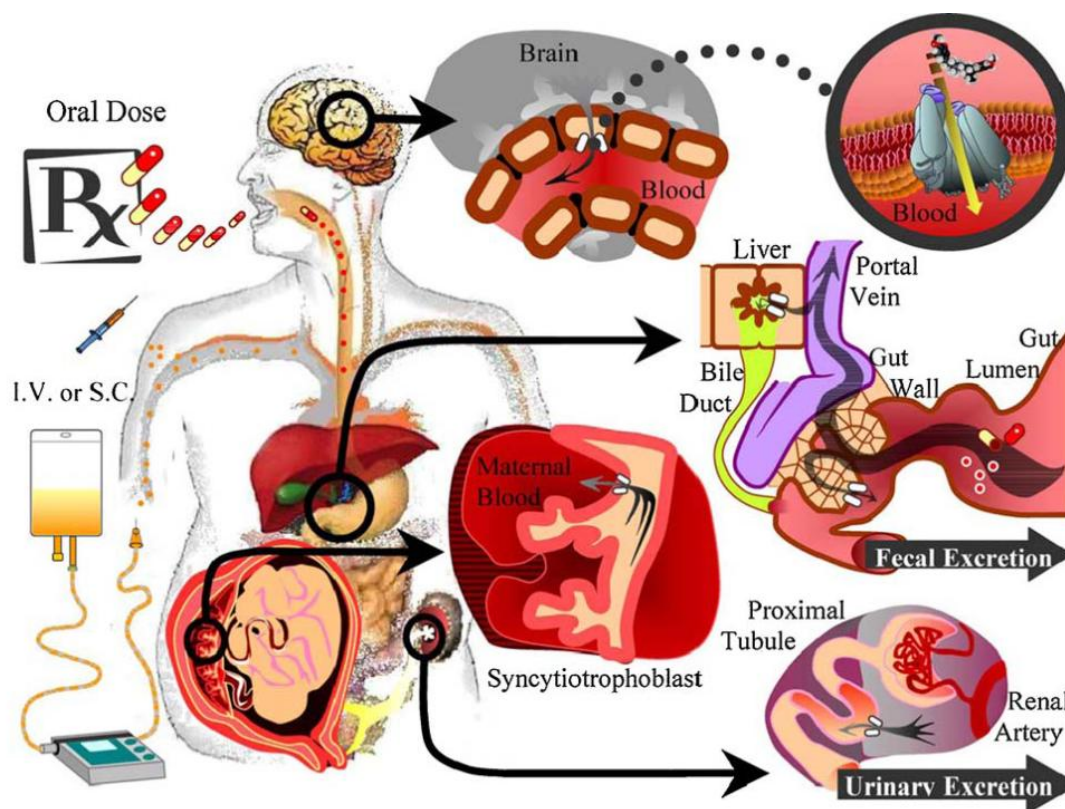


Figura 4 – Representação esquemática da distribuição e função da P-gp no organismo humano (Fonte: Endres, C. J., *et al.* (2006). The role of transporters in drug interactions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, pp. 501-517).

A expressão aumentada de P-gp foi descoberta pela primeira vez em células tumorais resistentes e pensa-se que estes transportadores são responsáveis pelo fenómeno de resistência mediante o efluxo de antineoplásicos do espaço intracelular. Assim, pode-se correlacionar variações na expressão genética da P-gp a variações interindividuais na suscetibilidade a determinados fármacos (Song *et al.*, 2002; Hodges *et al.*, 2011). A P-gp intervém no transporte da digoxina, alguns antineoplásicos, morfina, metadona, fentanilo, entre outros (Lotsch *et al.*, 2004).

Importa ainda referir aqui os transportadores de aniões orgânicos (OATPs) que são codificados pela família de genes transportadores de solutos (SLC). Estes OATPs são proteínas transmembranares expressas na membrana basolateral (sinosoidal) dos hepatócitos, funcionando como transportadores de influxo de uma vasta gama de compostos endógenos, assim como de fármacos (Niemi, 2009).

2.3. Polimorfismos genéticos dos alvos farmacológicos

Os fármacos exercem a sua atividade farmacológica por ligação e subsequente modulação da atividade de alvos específicos do organismo que podem ser proteínas, ácidos nucleicos ou outros alvos moleculares (Wilkinson, 2012). Nestes estão incluídos os recetores β_2 -adrenérgicos, recetores da insulina, enzima conversora da angiotensina, entre outros (Evans, 2003).

As interações entre fármacos, bem como os polimorfismos nos genes que codificam a expressão dos alvos farmacológicos, podem influenciar a sensibilidade dos alvos a determinados fármacos, modificando assim a resposta terapêutica dos mesmos. Os polimorfismos apenas são significativos quando se observa que as variações interindividuais são mínimas no que respeita a concentração do fármaco na corrente sanguínea mas bastante perceptíveis ao nível da farmacodinâmica (Evans, 2003).

Num estudo realizado por (Holloway *et al.*, 2000) verificou-se que nos indivíduos que possuem uma ou mais cópias do alelo variante que contenha o aminoácido glicina no lugar da arginina, na posição 16, o recetor β_2 -adrenérgico oferece maior resistência ao tratamento com broncodilatadores, estando desta forma mais suscetíveis aos riscos da asma. Outro exemplo, é a enzima timidilato sintase que tem um papel fundamental na síntese e reparação do DNA, sendo desta forma alvo de inibição por parte do fármaco antineoplásico 5-fluorouracilo. Os níveis de expressão da timidilato sintase, *in vivo*, aparentam ser regulados pelo número de polimorfismos encontrados na região potenciadora do DNA. Observou-se que a expressão e atividade da enzima aumenta com um aumento do número de polimorfismos, sendo que a resistência à ação deste fármaco e de outros antimetabolitos aparenta estar associada a uma superexpressão da timidilato sintase (Lee *et al.*, 2005).

2.4. Etnia e polimorfismos genéticos

O fenótipo metabólico de um indivíduo é determinado, em parte, pela hereditariedade de um conjunto de alelos que codificam enzimas, transportadores e recetores. Existem polimorfismos nestes alelos característicos dos diferentes grupos étnicos e, desta forma, pode ser relevante considerar a etnia dos indivíduos durante os estudos clínicos ou forenses. Por exemplo, a frequência do fenótipo metabolizador pobre para a enzima CYP2D6 é maior na população caucasiana (5-10%) do que na população do extremo oriente e asiática (2-4%). Pelo contrário, a frequência do fenótipo metabolizador pobre para a enzima CYP2C9 é mais baixa nos caucasianos (2-4%) em comparação com o que se verifica nos orientais (15-25%) (Yasuda *et al.*, 2008).

2.5. Técnicas e métodos de genotipagem

A viabilidade dos resultados obtidos em farmacogenética depende em grande parte das tecnologias disponíveis e a sua correta utilização. As técnicas devem ser capazes de identificar todos as mutações que tenham um impacto significativo na expressão e/ou função das enzimas metabólicas, transportadores ou recetores. Atualmente existem diversas metodologias e kits disponíveis para a genotipagem de enzimas metabólicas e em todas elas ocorrem extração e isolamento do DNA da amostra de sangue ou tecido, amplificação do DNA e deteção dos polimorfismos (Jannetto *et al.*, 2004). Para a análise dos genes pode-se recorrer à deteção de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) que é uma técnica considerada mais tradicional, necessitando de amplificação prévia recorrendo à reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta baseia-se na digestão de DNA com endonucleases de restrição e posterior separação dos fragmentos obtidos por eletroforese em gel de agarose, originando padrões de restrição. A sua principal limitação reside no facto de que os polimorfismos para serem detetados têm de criar alterações no material genético que levem à criação de novos locais de restrição, uma vez que são estes que determinam o padrão de fragmentação do DNA (Jortani *et al.*, 2012). Na tabela III são sumarizadas algumas das técnicas de genotipagem e as respetivas vantagens e desvantagens.

Tabela III – Descrição das técnicas de genotipagem mais utilizadas em farmacogenética (Jannetto *et al.*, 2004; Verrecas *et al.*, 2004; Hirata *et al.*, 2006).

	Princípio	Modo de detecção	Vantagens	Limitações
Amplificação alelo-oligonucleotídeo específica	É utilizado um par de oligonucleotídeos com uma sequência complementar a cada alelo presente no locus. O PCR é realizado para cada par de nucleótidos e o produto é apenas gerado se existir 100% de complementaridade entre os oligonucleotídeos e os alelos (figura 5)	Eletroforese em gel de agarose	Método simples e menos dispendioso do que RFLP	Possibilidade de falsos-negativos e falsos-positivos
PCR em tempo real	Um segmento de DNA alvo de tamanho delimitado por dois primers oligonucleotídicos específicos é amplificado pela ação de uma DNA polimerase termoestável e o produto resultante é simultaneamente detetado (figura 6)	Para detetar o produto amplificado, é incorporado na mistura de reação um marcador fluorescente que se liga ao DNA durante a amplificação	Método simples, rápido e evita os erros de manipulação	Elevado custo do equipamento e elevadas exigências técnicas
Técnica de <i>microarray</i>	Os segmentos de genes que contêm mutações conhecidas são fixados numa lâmina de vidro (<i>microarray</i>). O DNA obtido na amostra é amplificado por PCR e os produtos resultantes marcados com fluorcromos são hibridizados com o <i>microarray</i> . O grau de hibridização dá indicação do genótipo (figura 7)	Sistema de detecção de fluorescência	Possibilidade de se colocar milhares de sequências num único arranjo, o que permite obter informações de um genoma inteiro num único ensaio	Requer equipamento especializado, sendo muito dispendioso

Pirosequência	<p>A síntese de DNA ocorre através de um conjunto de reações que inclui várias enzimas (ATP sulfúrilase e luciferase) e substratos (adenosina 5' fosfossulfato e luciferina). Quando um nucleótido é incorporado, é detetado imediatamente pela libertação e transformação do pirofosfato em ATP pela ATP sulfúrilase. Este por sua vez fornece energia à luciferase para oxidar a luciferina, emitindo luz (figura 8)</p>	<p>Deteção da luz, sendo que a sua intensidade é proporcional ao número de nucleótidos incorporados. A sequência final de um fragmento é obtida a partir de cada incorporação relativamente a uma coordenada na placa de fibra ótica (figura 8)</p>	<p>Precisão, flexibilidade, processamento paralelo e pode ser facilmente automatizada</p>	<p>Sequenciamento só pode ser realizado unidirecionalmente</p>
----------------------	--	---	---	--

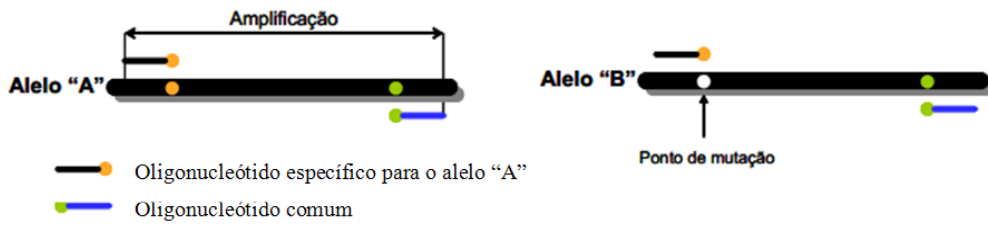


Figura 5 – Representação esquemática do método de amplificação alelo-oligonucleotídica (adaptado de (Hirata *et al.*, 2006).

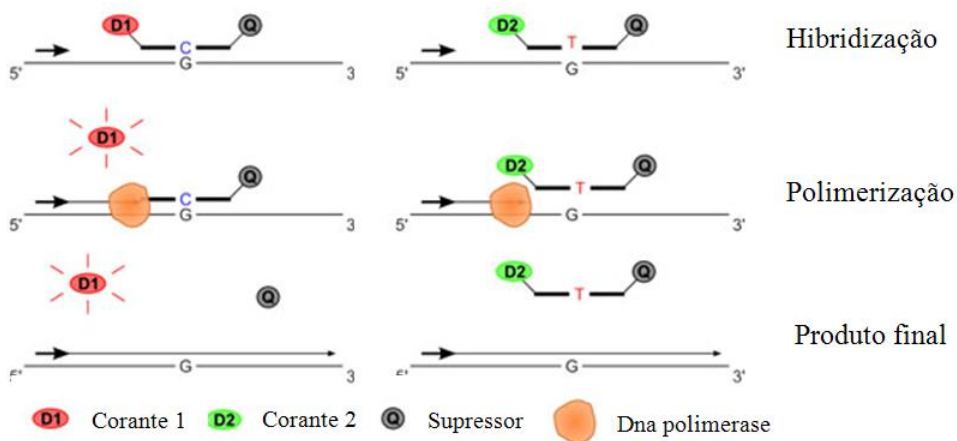


Figura 6 – Representação esquemática do método PCR em tempo real com sonda TaqMan®. Durante a PCR em tempo real a sonda hibridiza com a sequência de DNA complementar e no processo de amplificação a sonda é degradada devido à atividade da

DNA polimerase. O supressor é separado da molécula fluorescente e esta separação resulta num aumento da fluorescência; tal não ocorre quando a sonda não hibridiza (adaptado de (Maths, 2010).

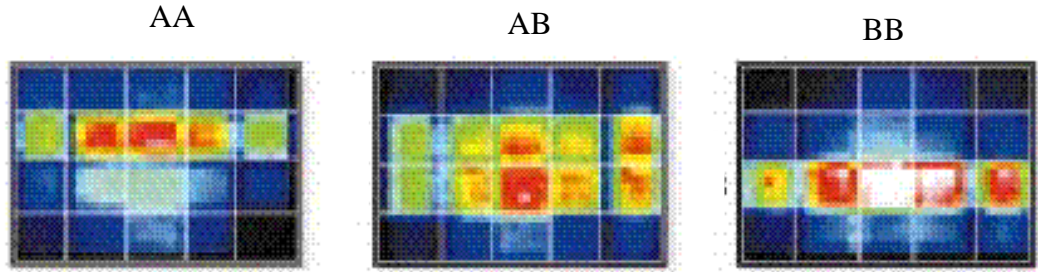


Figura 7 – Representação dos padrões de hibridização de diferentes genótipos obtidos pelo método que recorre à tecnologia de DNA microarray (adaptado de (Smith, 2000).

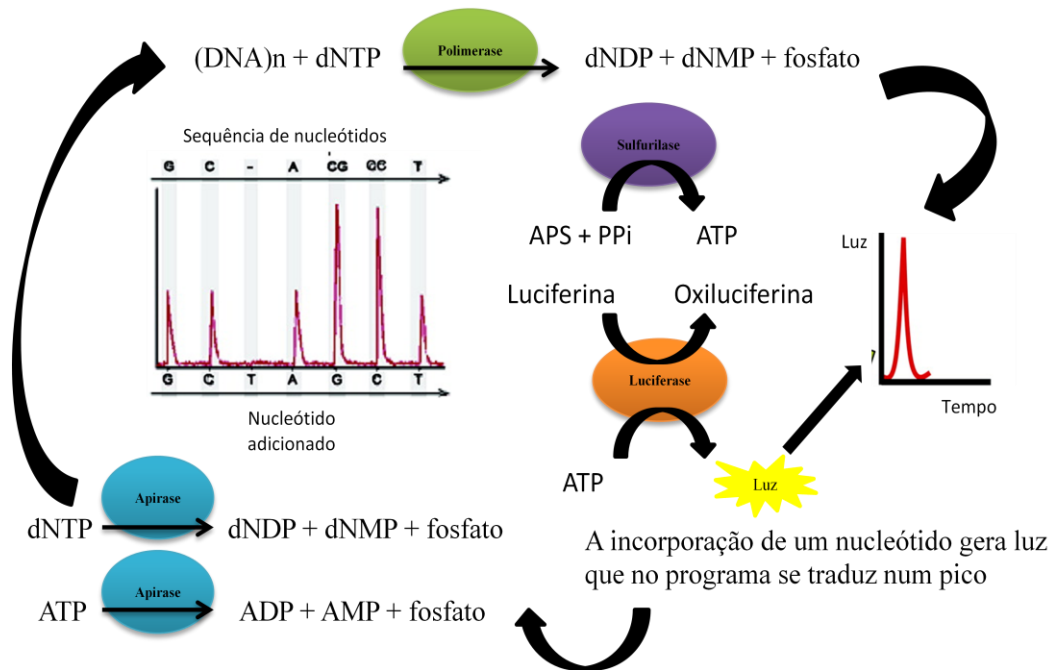


Figura 8 – Representação esquemática das reações bioquímicas e enzimas envolvidas na produção do sinal luminoso na pirosequenciação (adaptado de (Petrosino *et al.*, 2009).

Como se pode verificar existem muitas possibilidades de escolha nos métodos de genotipagem e a decisão depende de vários fatores, entre os quais, o nível prévio de conhecimento da mutação/polimorfismo, sensibilidade e especificidade do método, requisitos da amostra e custo (Jannetto *et al.*, 2004).

III. Toxicologia forense

A Toxicologia Forense é uma ciência multidisciplinar que engloba conhecimentos de toxicologia analítica, bem como de farmacocinética e farmacodinamia, e é responsável pela detecção e identificação de xenobióticos no organismo humano, usualmente, no seguimento de solicitações processuais de investigação criminal (Holmgren e Ahlner, 2006). Desta forma, é uma ferramenta essencial na interpretação de dados toxicológicos *post mortem* e normalmente tem um papel crítico na determinação da causa e circunstância da morte (Druid e Holmgren, 1997). É importante fazer aqui a distinção destes dois conceitos, sendo que o primeiro refere-se à doença ou trauma que iniciou uma série de acontecimentos patológicos que conduziram diretamente à morte, ou às circunstâncias do acidente ou violência que produziram a lesão fatal. O segundo conceito refere-se à forma ou circunstância que levou à causa de morte, podendo ser classificada como natural ou não natural e dentro desta pode ser ainda classificada como ocupacional, acidental, suicídio, homicídio ou indeterminada (ICMEA, 2007).

Para melhor compreensão do tema é útil o conhecimento de alguns princípios e procedimentos a serem seguidos em toxicologia forense. É importante ter em conta que nenhum aspeto decorrente da investigação da causa da morte é considerado isoladamente e que existe comunicação entre os vários membros da equipa no que diz respeito à história do caso, registos médico-farmacêuticos e circunstâncias da morte. Portanto, os resultados toxicológicos não têm qualquer significado se não forem interpretados no contexto de todas as evidências encontradas. Quanto a procedimentos, podem existir evidências encontradas no exame externo ao cadáver que justifiquem a realização dos testes toxicológicos. Nestas estão incluídas comprimidos encontrados nos bolsos da roupa; fragmentos de fármacos na boca ou nariz; pó nas narinas e adesivos transdérmicos no corpo. Na análise dos casos, outros fatores devem ser considerados para além da concentração do fármaco, tais como interações entre fármacos, data da colheita, local utilizado para a colheita, via pela qual o fármaco foi administrado e o período de tempo a que o indivíduo esteve exposto a este (Wyman, 2012).

Em determinados casos onde não existe patologia ou trauma evidente e os resultados toxicológicos e bioquímicos não são conclusivos ou são difíceis de interpretar, a causa

e/ou circunstância da morte continuam a ser ambíguas. Tal pode acontecer nas mortes induzidas por fármacos uma vez que quando os resultados toxicológicos *post mortem* revelam concentrações fatais de determinado fármaco pode ser complicado determinar se a morte foi acidental ou intencional se não existirem testemunhas ou evidências que ajudem na conclusão do caso. Em alguns casos, a execução de testes farmacogenéticos pode demonstrar, por exemplo, que uma sobredosagem acidental de determinado fármaco possa ter sido devida a características intrínsecas do indivíduo em relação à capacidade de metabolizar esse mesmo fármaco (Ackerman *et al.*, 2001; Koski *et al.*, 2007).

De uma forma geral, o objetivo dos estudos farmacogenéticos é a individualização da terapia com base em informação genética, facilitando deste modo a escolha dos fármacos disponíveis e a adoção da dosagem adequada a cada indivíduo. A aplicação de tais conhecimentos permite a redução das falhas e custos dos tratamentos e das RAM e, conseqüentemente, as mortes provocadas por estas, em casos mais extremos (Koo e Lee, 2006). No entanto, a farmacogenética pode e deve ser utilizada no contexto médico-legal, sendo que os resultados também podem contribuir para determinar a segurança dos fármacos na clínica. Deste modo, a genética, juntamente com a patologia e a toxicologia, têm um papel importante na determinação da causa e circunstância da morte (Neuvonen *et al.*, 2011).

Na clínica, para se obter informações acerca do fenótipo de metabolização de um indivíduo recorre-se tradicionalmente à determinação do rácio entre a concentração do fármaco pai e a concentração dos seus metabolitos (C_f/C_m), as quais são obtidas através de amostras de urina. A interpretação dos resultados permite estipular a capacidade metabólica do indivíduo para o fármaco em questão (Dahl *et al.*, 1995). Porém, o rácio C_f/C_m pode ser influenciado por interações entre fármacos e pelas variações genéticas anteriormente descritas. Por essa razão, a genotipagem tornou-se uma ferramenta importante para prever os fenótipos de metabolização (Holmgren e Ahlner, 2006). A análise do genoma de *loci* farmacologicamente relevantes tem como vantagem o fato de os resultados não serem influenciados por fatores fisiológicos nem por interações medicamentosas e para se obter os resultados não é necessário que os indivíduos sejam submetidos aos fármacos e aos seus potenciais efeitos adversos, como acontece com o

método tradicional. Por fim, a genotipagem permite que, com uma única amostra, se consiga prever o perfil metabólico para vários fármacos (Maron *et al.*, 1996; Ensom *et al.*, 2001).

A interpretação de resultados em toxicologia forense é uma tarefa complexa devido às extrapolações que necessitam de ser realizadas quanto à concentração de fármacos *post mortem* e *ante mortem* (Skopp, 2010). As concentrações de fármacos encontradas têm de ser comparadas com valores de referência pré-existentes, de modo a verificar se estas se encontram no intervalo terapêutico ou tóxico (Wyman, 2012). Durante alguns anos na maioria das sobredosagens fatais por fármacos pressupunha-se que tivesse sido suicídio mas verificou-se, mais tarde, que o consumo crónico de dosagens elevadas de fármacos poderia estar na origem da morte e, atualmente, é uma possibilidade relevante. Com efeito, de forma a diferenciar uma sobredosagem aguda e uma intoxicação crónica, pode-se analisar a distribuição do fármaco em diferentes amostras uma vez que no primeiro caso normalmente não se encontram níveis elevados de fármaco nas seguintes amostras: humor vítreo, líquido cefalorraquidiano e cabelo. Por outro lado, o rácio C_f/C_m pode ser útil para distinguir se a morte foi devida a uma ingestão aguda (rácio elevado) ou resultado do uso crónico (Druid *et al.*, 1999). Todavia, como acontece na clínica, estes métodos podem levar a conclusões erradas uma vez que um elevado rácio pode ser também consequência de um metabolismo ineficiente quer por interações entre fármacos quer por polimorfismos. Nas situações de dúvida, descritas no esquema da figura 9, a genotipagem é a alternativa a ser adotada e a sua contribuição tem ganho notoriedade na toxicologia forense (Holmgren e Ahlner, 2006; Andresen *et al.*, 2013).

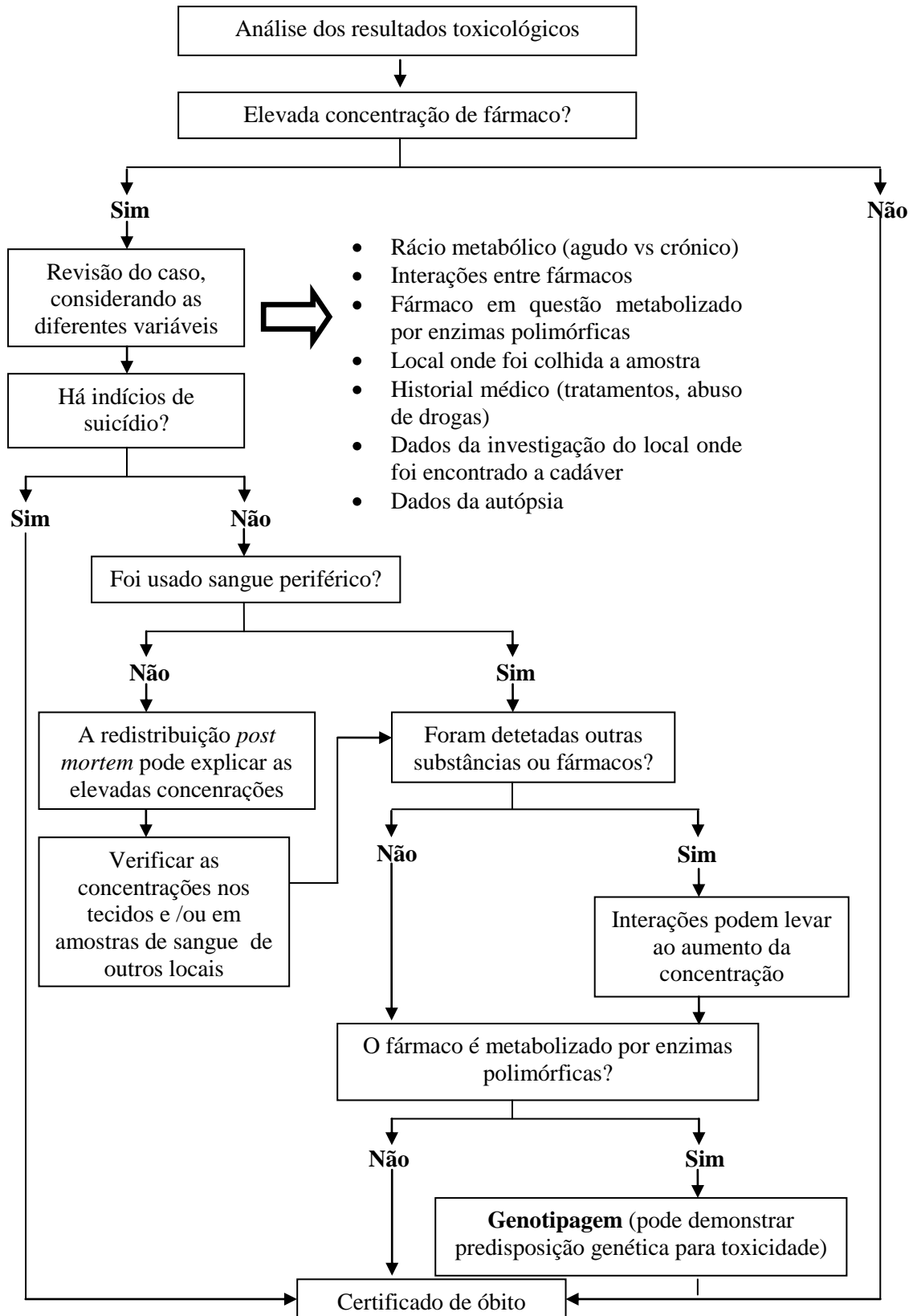


Figura 9 – Algoritmo para a aplicação da farmacogenética em toxicologia forense (adaptado de (Wong *et al.*, 2006).

IV. Aplicação da farmacogenética em toxicologia forense

Neste capítulo serão referidos os fármacos mais frequentemente associados à área da toxicologia forense, bem como exemplos de casos que envolvem esses mesmos fármacos e demonstram a relevância da aplicação da farmacogenética em contexto médico-legal.

4.1. Opióides

A maioria dos opióides são agonistas dos recetores μ e são geralmente utilizados para o alívio da dor aguda e crónica, podendo também ser usados como antitússicos. São caracterizados por apresentarem uma estreita janela terapêutica e estão associados a graves efeitos adversos/tóxicos (tolerância, dependência, hipotensão, choque circulatório, apneia e depressão respiratória) quando administrados em doses excessivas. Assim, a dosagem correta dos fármacos deve assegurar o controlo da dor sem a ocorrência de efeitos tóxicos (Somogyi *et al.*, 2007). A CYP2D6 é a principal responsável pela metabolização de um grande número de opióides, tais como, codeína, tramadol, dihidrocodeína, etilmorfina, oxicodona e metadona. Os diferentes perfis de metabolização para esta enzima fazem com que a ação analgésica seja afetada em diferentes formas que vão ser descritas em seguida fármaco a fármaco (Lotsch *et al.*, 2004).

4.1.1. Codeína

A codeína é metabolizada principalmente no fígado por uma das três vias representadas na figura 10. A glucoronidação com conseqüente formação de codeína-6-glucoronídeo é responsável por cerca de 50-70% da metabolização da codeína que é administrada, enquanto que 10-15% desta sofre N-desmetilação por ação do CYP3A4, convertendo-se em norcodeína. Esta por sua vez, por conjugação com ácido glucorónico, dá origem à norcodeína-6-glucoronídeo ou uma pequena fração pode sofrer O-desmetilação por ação da CYP2D6, convertendo-se em normorfina. Por último, uma pequena percentagem (<15%) da dose de codeína administrada pode sofrer O-desmetilação, convertendo-se em morfina que, após glucoronidação, dá origem a dois metabolitos: um inativo

(morfina-3-glucoronídeo) e outro ativo (morfina-6-glucoronídeo). Uma pequena percentagem da morfina pode ser N-desmetilada a normorfina (Thorn *et al.*, 2009).

A morfina e a morfina-6-glucoronídeo têm grande afinidade para os recetores μ , o que não se verifica para a codeína e restantes metabolitos (Chen *et al.*, 1991). Desta forma, a O-desmetilação da codeína a morfina é fundamental para a ação analgésica desejada e o genótipo da CYP2D6 influencia diretamente a eficácia e efeitos adversos do fármaco em questão. De facto, indivíduos metabolizadores pobres para a CYP2D6 apresentam um efeito analgésico muito reduzido e os que são metabolizadores ultra-rápidos estão mais sujeitos à toxicidade associada aos opióides (Lotsch *et al.*, 2004).

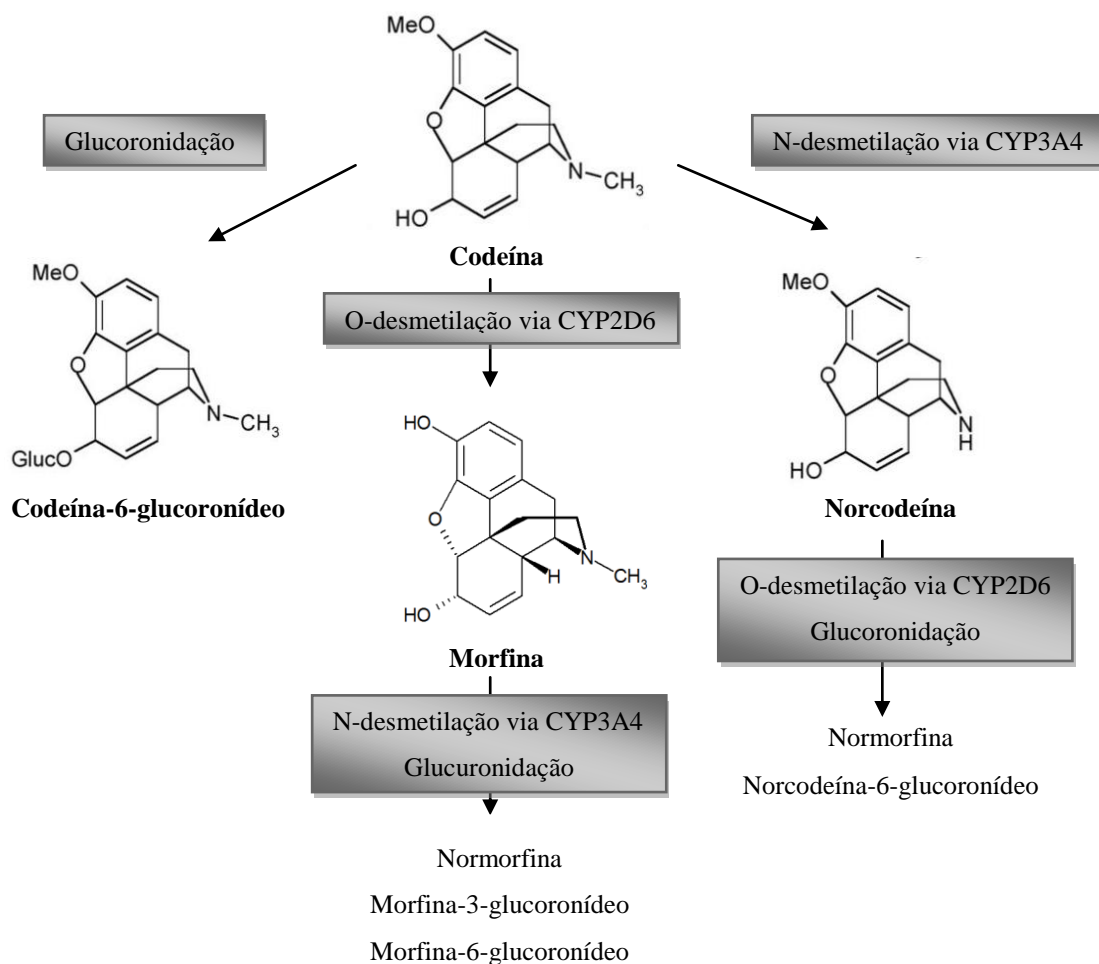


Figura 10 – Representação esquemática do metabolismo da codeína.

A sobredosagem de codeína provoca depressão do sistema nervoso central e risco de morte por depressão respiratória. Segundo (Baselt, 2008) estima-se que para um adulto

a dose letal mínima por via oral seja de 0,5-1 g, o que equivale a 17-34 comprimidos, contendo 30 mg de codeína cada. Por outro lado, a Associação Internacional de Toxicologistas Forenses estima que concentrações plasmáticas de codeína acima de 0,3 mg/L estão associadas a toxicidade e acima de 1,6 mg/L são possivelmente letais (T.I.A.F.T, 2004).

Caso 1

Um recém-nascido de 13 dias de idade foi encontrado morto em sua casa e a autópsia revelou intoxicação por morfina como a causa da morte. A investigação permitiu apurar que a mãe foi medicada no pós-parto com codeína (30 mg) e paracetamol (500 mg) de forma a aliviar as dores devido a episiotomia. A genotipagem realizada posteriormente revelou que a mãe possui fenótipo de metabolizador ultra-rápido para CYP2D6, o que veio a justificar a concentração elevada de morfina encontrada no leite da mãe e no sangue do recém-nascido. Foi então possível concluir que a elevada atividade da CYP2D6 resultou num aumento da O-desmetilação da codeína a morfina, sendo que esta foi transferida para o recém-nascido através do leite materno e resultou numa acumulação que foi fatal (Koren *et al.*, 2006). A morte foi acidental, porém, sem a realização dos testes farmacogenéticos, o caso poderia ter sido interpretado como infanticídio ou negligência médica.

O caso apresentado demonstra a importância da realização da genotipagem em mães que estejam a amamentar antes de se iniciar o tratamento com codeína. No entanto, os testes genéticos são caros e não fazem parte do procedimento habitual e, por essa razão, sem conhecimento do fenótipo em questão, a melhor alternativa é não prescrever codeína ou outros opióides que sejam metabolizados em grande extensão pela CYP2D6 (Sajantila, 2012; Matich, 2013).

4.1.2. Tramadol

O tramadol é comercializado sob a forma de uma mistura racémica e a O-desmetilação por ação da CYP2D6 é a principal via de metabolização (figura 11), dando origem ao metabolito O-desmetiltramadol que tem cerca de 200 vezes mais afinidade para os

recetores μ . Este é então responsável pela analgesia mediada pelos recetores opióides enquanto que os enantiómeros (+)- e (-)-tramadol contribuem para o efeito por inibição da recaptação da serotonina e noradrenalina. Apesar da N-desmetilação contribuir apenas para uma pequena parte da metabolização do tramadol e desta via ainda não estar completamente caracterizada, é importante referir que o N-desmetiltramadol é outro metabolito que pode ser encontrado no organismo aquando o consumo de tramadol (figura 11) (Elkalioubie *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013).

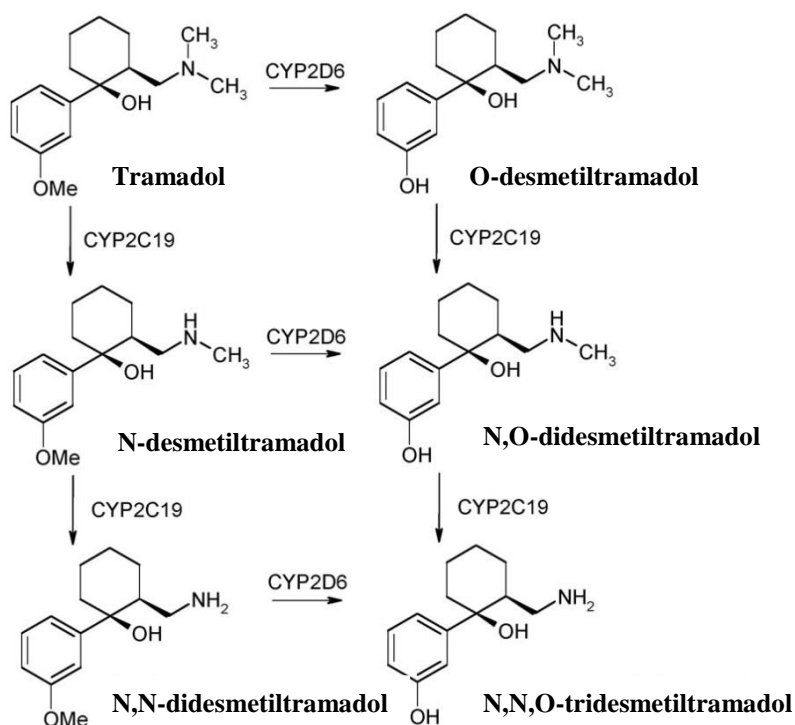


Figura 11 – Representação esquemática do metabolismo do tramadol (adaptado de (Musshoff *et al.*, 2010).

Num estudo realizado por (Levo *et al.*, 2003) procedeu-se à determinação do genótipo da *CYP2D6* e da concentração de tramadol e dos seus metabolitos (O- e N-desmetiltramadol) em 33 casos onde este fármaco estava presente nas análises toxicológicas *post mortem*. A genotipagem permitiu agrupar os indivíduos em quatro grupos distintos segundo o número de alelos funcionais dos seus genes correspondentes à *CYP2D6*. Os resultados demonstraram uma correlação entre o número de alelos funcionais e os rácios da $C_{\text{tramadol}}/C_{\text{O-desmetiltramadol}}$ e da $C_{\text{tramadol}}/C_{\text{N-desmetiltramadol}}$, sendo que

à medida que o número de alelos aumentava os valores do primeiro rácio diminuíam e o do segundo aumentavam. Tal comprovou o efeito dos polimorfismos da *CYP2D6* no metabolismo do tramadol e evidenciou que a N-desmetilação pode prevenir a acumulação deste fármaco nos indivíduos metabolizadores pobres. Apesar de em nenhum dos casos se ter verificado que os polimorfismos poderiam estar diretamente associados à causa da morte, este estudo foi um dos pioneiros a evidenciar que a análise genética *post mortem* das várias etapas da farmacocinética é possível e relevante para a avaliação dos efeitos adversos dos fármacos, assim como para a interpretação de casos de intoxicações a nível forense.

4.1.3. Oxycodona

A oxycodona é metabolizada no fígado a noroxicodona e oximorfona (figura 12), sendo que o primeiro metabolito é o encontrado em maior quantidade na circulação sanguínea enquanto que o segundo corresponde ao metabolito ativo e que é formado com intervenção da *CYP2D6* (Mushoff *et al.*, 2010). Em ingestões agudas em adultos as concentrações deste fármaco variam entre 0,4 e 0,7 mg/L mas em combinação com outros fármacos, como por exemplo os antidepressivos, a ingestão de apenas 0,1 mg/L pode ser fatal.

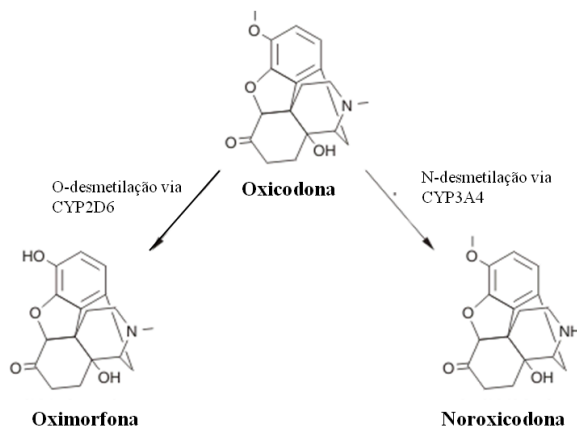


Figura 12 - Representação esquemática do metabolismo da oxycodona (adaptado de (Lalovic *et al.*, 2004).

Quando prescrita, a oxycodona, muitas vezes, é consumida indevidamente e o abuso da sua utilização pode ser fatal. Porém, o fenótipo deficiente da *CYP2D6*, resultando numa

metabolização ineficiente dos fármacos, pode ter também um papel significativo na toxicidade da oxicodona. As hipóteses referidas anteriormente levaram à realização de um estudo em 15 casos onde as mortes foram repentinas, inesperadas e onde a oxicodona estava implicada na causa da mesma (Jannetto *et al.*, 2002). Em cada caso determinou-se o genótipo da *CYP2D6* de forma a inferir o fenótipo de cada indivíduo. Os resultados foram os seguintes 2 indivíduos eram homocigóticos para a *CYP2D6**4 apresentando o fenótipo metabolizadores pobres (casos 1 e 2); 4 eram heterocigóticos para a *CYP2D6**4 e por isso apresentavam o fenótipo de metabolizadores intermédios (casos 3 a 6) e os restantes 9 eram metabolizadores extensivos (casos 7 a 15). Estes resultados foram comparados com os obtidos num grupo controlo de 26 indivíduos. Quanto às concentrações séricas de oxicodona encontradas, nos dois metabolizadores pobres os valores foram 0,437 e 0,450 mg/L, sendo a média 0,444 mg/L; nos quatro metabolizadores intermédios variaram entre 0,773 e 2,000 mg/L, sendo a média 1,268 mg/L e nos nove metabolizadores extensivos variaram entre 0,150 e 2,070 mg/L, sendo a média 0,598 mg/L. Os resultados não foram significativamente diferentes nos três grupos.

Uma vez que se pretende compreender a relevância da genotipagem para a determinação/confirmação da causa e circunstância da morte, os casos mais importantes para abordar a questão são os 6 primeiros dado que representam os metabolizadores pobres e intermédios. No entanto, nos casos 4 e 6 já estava comprovado que se tratavam de suicídios e, por não terem relevância para o que se pretende, apenas serão analisados pormenorizadamente os restantes 4 (Jannetto *et al.*, 2002):

Caso 1

Um homem caucasiano com 45 anos foi encontrado morto na sua cama pelo colega com o qual morava. Foram também encontrados no local 12 comprimidos dos 60 que lhe foram prescritos para a sua dor de costas crónica. O indivíduo tinha um historial médico de abuso de fármacos, depressão e tentativa de suicídio. No entanto, pelas informações recolhidas, recentemente não tinha demonstrado qualquer ideação suicida. Tinha ainda um historial de alcoolismo. Nas análises toxicológicas apenas a oxicodona estava presente mas a autópsia revelou a existência de cirrose hepática. Concluiu-se então que a sua reduzida capacidade hepática devido à cirrose, juntamente com a deficiência em

CYP2D6, podem ter contribuído para atingir a concentração fatal de oxicodona. A causa da morte foi então sobredosagem por oxicodona e a morte foi acidental.

Caso 2

Um homem caucasiano com 48 anos e com historial médico de abuso de fármacos, bem como de cocaína e álcool, foi encontrado morto após ter tomado uma dose superior de oxicodona, que lhe foi prescrita para o controlo das dores de costas. No certificado de óbito vinha descrito que a causa da morte foi sobredosagem por oxicodona e conclui-se que esta foi acidental, possivelmente resultante do facto do indivíduo ter excedido a dose do fármaco e simultaneamente ser metabolizador pobre.

Caso 3

Uma mulher caucasina com 43 anos e com historial médico de colocação de banda gástrica e várias cirurgias a hérnias foi encontrada morta 6 dias após a sua última cirurgia. Segundo as informações obtidas a cirurgia ocorrera sem nenhuma complicação mas após a alta a senhora queixara-se com muita dor. Após revisão da medicação que estava a tomar verificou-se que havia um défice nos comprimidos de oxicodona. Na autópsia ficou comprovada a ingestão de uma dose excessiva, tendo sido encontrados 9 comprimidos no estômago. A senhora estava a tomar simultaneamente outros fármacos analgésicos e um deles que estava também presente nas análises toxicológicas – a miperidina – é igualmente substrato da CYP2D6 e por isso pode ter interferido na metabolização da oxicodona. Reunindo todas as informações conclui-se que a morte foi acidental e devida ao abuso de medicamentos para o alívio da dor. Apesar disso, a atividade reduzida da CYP2D6 devido ao fenótipo de metabolizador intermédio pode também ter contribuído para o aumento da concentração sérica de oxicodona.

Caso 5

Um homem caucasiano com 43 anos e com historial médico de abuso de drogas e álcool foi encontrado morto na manhã seguinte a uma festa na qual tinha participado. As análises toxicológicas revelaram a presença de concentrações elevadas de oxicodona e ainda de metadona. Sabendo que o metabolismo pela CYP2D6 é deficiente neste indivíduo e que a metadona compete com a oxicodona para esta isoenzima, tal explica

as concentrações elevadas de oxicodona e permite concluir que, possivelmente, a morte foi resultado da sobredosagem por combinação de fármacos.

Este estudo demonstrou uma elevada prevalência de metabolizadores pobres e intermédios nos casos estudados em comparação com o grupo controlo. Embora os resultados não sejam estatisticamente significativos pela amostra reduzida, é incontestável que a genotipagem da *CYP2D6* forneceu informações adicionais úteis para se estabelecer a causa da morte.

4.1.4. Metadona

A metadona é principalmente utilizada como tratamento de substituição em caso de toxicod dependência major de opiáceos (Infarmed, 2010a) e ao longo dos anos tem-se verificado uma elevada prevalência deste fármaco nas mortes relacionadas com medicamentos (Wolf *et al.*, 2004). Esta existe no mercado maioritariamente sob a forma de uma mistura racémica dos enantiómeros R- e S-metadona, sendo que o primeiro é responsável pela ativação dos recetores opióides μ e o segundo inibe o canal de potássio cardíaco, sendo assim responsável pelos efeitos indesejados que ocorrem ao nível cardíaco aquando o tratamento com metadona. A metadona é metabolizada por N-desmetilação a um metabolito inativo, o 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno (EDDP) (figura 13).

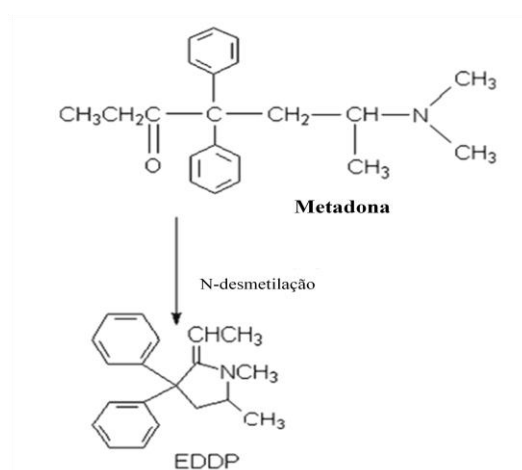


Figura 13 – Representação esquemática da conversão da metadona a 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno (adaptado de (George *et al.*, 2012)).

Várias isoenzimas da família do citocromo P450 estão envolvidas na metabolização da metadona a EDDP, principalmente, CYP3A4, CYP2B6 e CYP2C19, e, em menor extensão, a CYP2D6 e a CYP2C9 (Eap *et al.*, 2007). No entanto, pensava-se que a toxicidade associada a este fármaco fosse devida essencialmente aos alelos polimórficos CYP2D6*3,*4 e *5 que dão origem ao fenótipo metabolizador pobre. Todavia, essa hipótese não foi comprovada no estudo realizado por Wong *et alli* (2003) onde foram analisados 21 casos fatais relacionados com a metadona. A genotipagem realizada revelou: um heterozigótico para o alelo CYP2D6*3, dois homozigóticos para CYP2D6*4 e cinco heterozigóticos para CYP2D6*4. A todos estes indivíduos correspondiam o fenótipo metabolizador pobre ou intermédio, porém, apesar da prevalência ser superior à do grupo de controlo, essa diferença não era estatisticamente significativa. Por essa razão, não foi possível concluir que os polimorfismos genéticos da CYP2D6 estavam diretamente associados à toxicidade da metadona, sendo que a maioria das causas de morte estavam relacionadas a interações entre fármacos administrados concomitantemente com a metadona e que competem para as mesmas enzimas metabólicas, levando ao aumento da sua concentração plasmática. Apesar destas conclusões, os investigadores reconheceram que a farmacogenética ajudou a complementar outras descobertas dos casos e a interpretar melhor a toxicidade da metadona nos metabolizadores pobres e intermédios (Wong *et al.*, 2003).

É igualmente importante referir as conclusões retiradas num estudo realizado por (Eap *et al.*, 2007) no qual se verificou que o decréscimo na atividade da CYP2B6 devido a polimorfismos genéticos estava associado somente ao aumento da concentração plasmática do enantiómero S-metadona, com conseqüente aumento do risco cardíaco e morte. Assim, os polimorfismos da CYP2B6 têm um grande impacto na toxicidade da metadona e a genotipagem *post mortem* desta enzima pode ser igualmente de extrema relevância na interpretação das mortes relacionadas a este fármaco, como comprovado num estudo mais recente efetuado em 40 casos fatais onde a metadona estava envolvida na causa da morte (Bunten *et al.*, 2010).

4.1.5. Etilmorfina

A etilmorfina está presente essencialmente em preparações líquidas como agente antitússico. A sua estrutura molecular é muito semelhante à da morfina, diferindo apenas pelo facto de ter um grupo etilo na posição 3. Quanto à sua afinidade para os recetores opióides é 1/300 vezes menor do que a da morfina mas assume-se que os seus efeitos farmacológicos se devam à dose que é metabolizada a morfina pela enzima CYP2D6 (figura 14), a qual pode variar de 5 a 20% (Somogyi *et al.*, 2007).

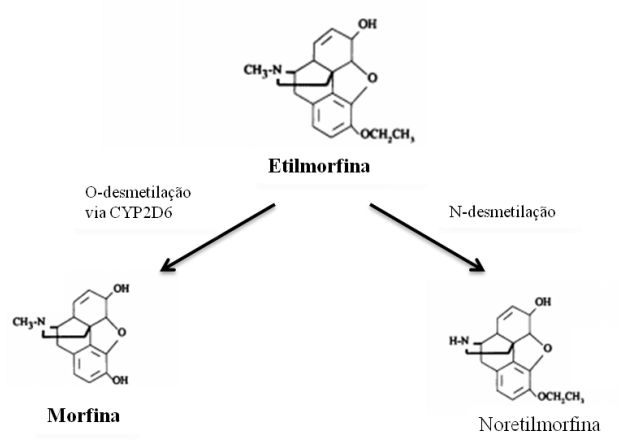


Figura 14 – Representação esquemática do metabolismo da etilmorfina (adaptado de (Aasmundstad *et al.*, 1995).

Caso

Um lactente do sexo masculino e com 10 meses de idade foi encontrado morto, na sua cama, em decúbito ventral. Foram recolhidas informações dos familiares e verificou-se que o bebé tinha sintomas de infeção nas vias respiratórias há já algum tempo, apresentando tosse, febre e secreções aumentadas. A irmã mais velha declarou ainda que, na noite anterior ao incidente, tinha dado ao bebé uma colher de chá de xarope para a tosse. Este medicamento não foi prescrito para o bebé, tendo sido adquirido pela mãe numa situação anterior. As análises toxicológicas *post mortem* detetaram a presença de etilmorfina e morfina, em concentrações de $0,17 \mu\text{M}$ ($0,054 \text{ mg/L}$) e $0,090 \mu\text{M}$ ($0,026 \text{ mg/L}$), respetivamente. O rácio morfina/etilmorfina foi de 0,53, sendo este valor superior ao esperado após ingestão exclusiva de etilmorfina. Uma possível explicação

para isso seria um metabolismo ultra-rápido, porém, a genotipagem revelou que o bebê era um metabolizador extensivo, excluindo esta hipótese. Após autópsia completa concluiu-se que a morte foi causada pela combinação de três fatores: infecção respiratória com obstrução parcial das vias aéreas, sedação e depressão respiratória induzida pelo opióide e pela posição em que o bebê estava a dormir pois poderia ter dificultado a respiração. Este foi o primeiro caso em que a morte de uma criança foi associada à ingestão de etilmorfina, alertando para os possíveis efeitos letais que uma pequena dose de opióides pode exercer nas crianças, principalmente na presença de infecções ou outras patologias que comprometam o funcionamento do sistema respiratório (Helland *et al.*, 2010).

4.1.6. Fentanilo

O fentanilo é usado como componente analgésico da anestesia geral e no controlo da dor crónica, essencialmente nos pacientes com cancro uma vez que é 50 a 100 vezes mais potente do que a morfina. Este fármaco é administrado principalmente por via intravenosa e transdérmica, sendo que determinadas características do fármaco, como a lipofilia e baixo peso molecular fazem com que a absorção pela pele seja facilitada e, por essa razão e devido à sua comodidade, os adesivos transdérmicos são preferencialmente utilizados (Palmer, 2010). No entanto, desde que surgiram foram reportadas várias mortes relacionadas com a má utilização ou com o abuso deste fármaco (Jumbelic, 2010).

O metabolismo do fentanilo inclui a N-desalquilação do anel piperidínico que dá origem ao norfentanilo, a hidrólise do grupo amida que dá origem ao despropionilfentanilo e a hidroxilação do grupo metilo que dá origem o hidroxifentanilo. Por sua vez, o norfentanilo ou o hidroxifentanilo podem originar o hidroxinorfetanilo (figura 15).

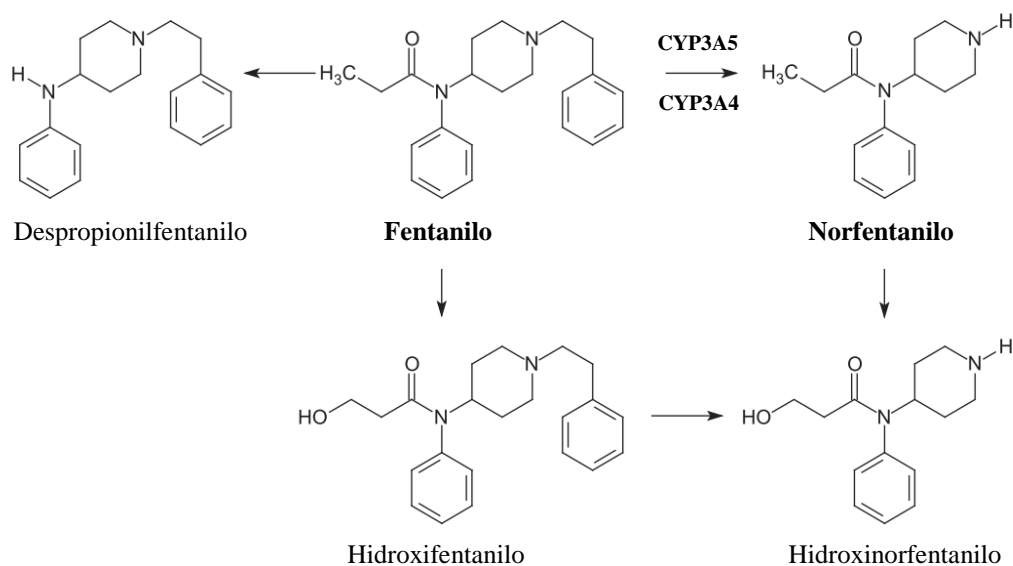


Figura 15 - Representação esquemática do metabolismo do fentanilo (adaptado de (Palmer, 2010)).

O norfentanilo, formado por ação da CYP3A4, é o principal metabolito do fentanilo. No entanto, é importante referir que este e os restantes metabolitos não são farmacologicamente ativos (Palmer, 2010; Infarmed, 2012b). Assim, a toxicidade do fentanilo pode ser parcialmente devida à variante *CYP3A4*1B*, bem como à *CYP3A5*3* como foi evidenciado pelo estudo de 25 casos em que a morte estava relacionada com a ingestão de fentanilo. Nestes foram recolhidas amostras de sangue, através das quais se determinou as concentrações de fentanilo e norfentanilo e procedeu-se à genotipagem das enzimas CYP3A4 e CYP3A5. Dos 25 indivíduos, 1 era homozigótico para *CYP3A4*1B* e heterozigótico para *CYP3A5*3*, 1 era heterozigótico para ambas, 22 eram homozigóticos para *CYP3A4*1* e homozigóticos para *CYP3A5*3* e 1 era homozigótico para *CYP3A4*1* e homozigótico para *CYP3A5*1* (Jin *et al.*, 2005).

Os resultados permitiram verificar que a homozigotia para *CYP3A5*3* associada à presença do alelo *CYP3A4*1B*, principalmente se este também estiver em homozigotia, acarreta um metabolismo deficiente do fentanilo. No entanto, como a maior parte da

população caucasiana carrega o alelo *CYP3A5*3*, com uma frequência que varia entre 0,85 a 0,95, a genotipagem desta enzima poderá ser de maior utilidade nos indivíduos de raça negra e nos asiáticos, em que a frequência é menor - 0,35 a 0,67 e 0,27 a 0,55, respetivamente. Por sua vez, a genotipagem da *CYP3A4* é relevante em todos os casos, com destaque para os caucasianos uma vez que, como referido, na sua maioria a enzima *CYP3A5* não existe ou tem uma atividade muito diminuída e assim os indivíduos que possuam o alelo *CYP3A4*1B*, sobretudo em homozigotia podem não metabolizar eficazmente o fentanilo, resultando num aumento da sua concentração plasmática e toxicidade (Jin *et al.*, 2005).

4.2. Antidepressivos

4.2.1. Amitriptilina

A amitriptilina pertence à classe dos antidepressivos tricíclicos e apesar de apresentar uma janela terapêutica estreita e existirem outros antidepressivos mais recentes no mercado, continua a ser prescrita com elevada frequência para o tratamento de estados depressivos. A amitriptilina é metabolizada por três processos diferentes, nomeadamente, N-oxidação, oxidação do anel alicíclico em C10 e do anel aromático em C12, e N-desalquilação do grupo dialquilamino (figura 16). Em todos os processos intervêm as enzimas do citocromo P450, sendo que a *CYP2D6* está associada aos dois primeiros e a *CYP2C19* ao último e mais importante para o efeito clínico pretendido pois o metabolito resultante, a nortriptilina, é ativo. A toxicidade deste fármaco está associada aos efeitos anticolinérgicos exacerbados, podendo também dar origem a problemas cardiovasculares (Koski *et al.*, 2006; Infarmed, 2010b).

A correlação entre as variações genéticas das enzimas envolvidas no metabolismo da amitriptilina, nomeadamente a *CYP2D6* e a *CYP2C19*, e o rácio amitriptilina/metabolitos encontrado em amostras de sangue colhidas *post mortem*, assim como a forma como esta variabilidade genética pode contribuir para intoxicações acidentais foram os objetivos do estudo realizado por (Koski *et al.*, 2006). Neste estudo foram analisados 202 casos, nos quais a amitriptilina estava presente nas análises toxicológicas, numa concentração de pelo menos 0,2 mg/L. Com as amostras de sangue

de origem femoral procedeu-se à genotipagem e à determinação da concentração de amitriptilina e dos seus metabolitos de forma a calcular os rácios pretendidos. Os resultados obtidos demonstraram que existia uma correlação positiva entre o número de alelos funcionais da *CYP2D6* e da *CYP2C19* e os rácios dos metabolitos resultantes da ação destas. No entanto, os resultados são mais claros e significativos no caso da *CYP2D6* e pensa-se que tal deve-se ao fato de possivelmente outras enzimas participarem na N-desalquilação da amitriptilina, principalmente quando esta se encontra em elevadas concentrações. Desta forma, naturalmente as alterações na *CYP2C19* não têm um impacto tão acentuado no seu metabolismo. Dos casos estudados, em nenhum deles a morte esteve diretamente relacionada com a combinação da toma de amitriptilina e da existência do fenótipo metabolizador pobre em relação às enzimas referidas. A maioria das causas foi suicídio ou morte acidental devido à ingestão simultânea de várias substâncias.

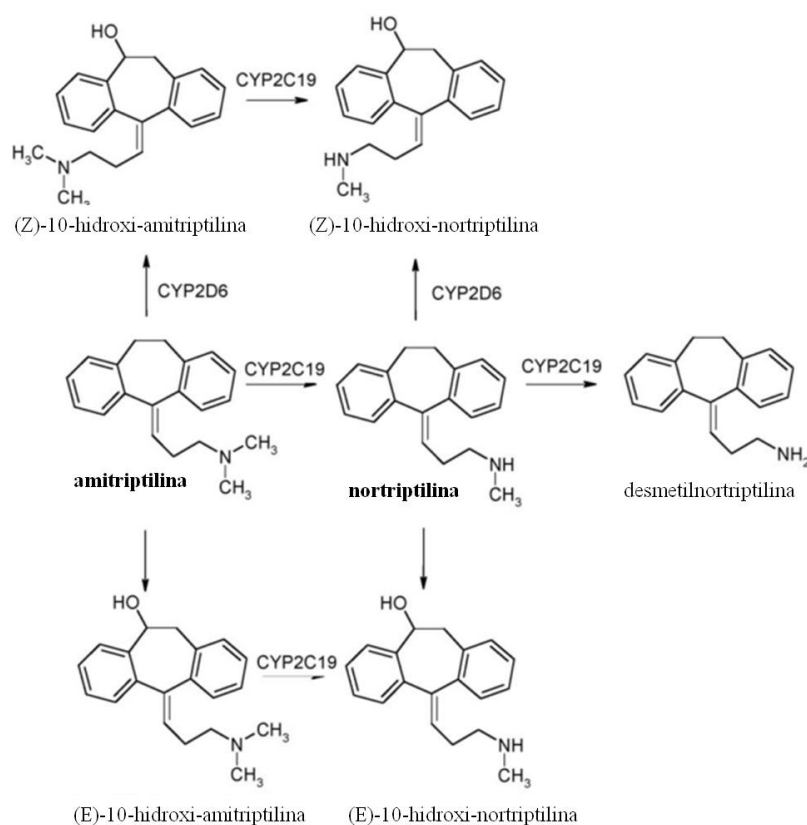


Figura 16 – Representação esquemática do metabolismo da amitriptilina (adaptado de (Musshoff *et al.*, 2010)).

4.2.2. Venlafaxina

A venlafaxina é um antidepressivo da classe dos inibidores da recaptação da serotonina e noradrenalina, sendo administrada sob a forma de mistura racémica de S- e R-enantiómeros. Ambos são farmacologicamente ativos, no entanto, o S-enantiómero inibe apenas a recaptação da serotonina e o R-enantiómero inibe a recaptação dos dois neurotransmissores. A CYP2D6, CYP3A4 e CYP2C19 são as enzimas responsáveis pelas principais vias de metabolização da venlafaxina (figura 17), sendo que a primeira é responsável pela formação do seu principal metabolito – O-desmetilvenlafaxina – e a segunda pela formação do N-desmetilvenlafaxina, tendo a enzima estereosseletividade para o R-enantiómero. Ambos os metabolitos referidos podem dar origem à N,O-didesmetilvenlafaxina. A classe de antidepressivos na qual a venlafaxina se integra é considerada mais segura do que a classe de antidepressivos tricíclicos mas mais tóxica do que a classe dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina. A toxicidade deste fármaco manifesta-se sob a forma de sedação, taquicardia, convulsões, hipotensão/hipertensão e síndrome serotoninérgica. A sobredosagem está também associada a casos fatais (Henry, 1997; Kingbäck *et al.*, 2012).

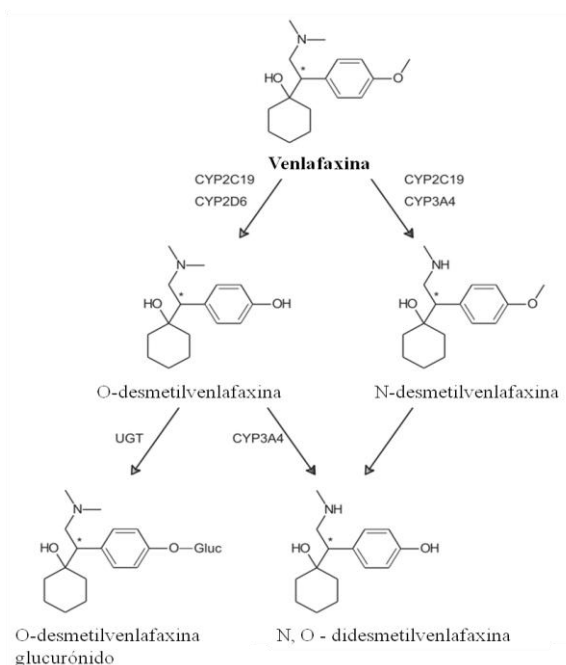


Figura 17 - Representação esquemática do metabolismo da venlafaxina (adaptado de (Jornil *et al.*, 2013). UGT: UDP-glucuronosiltransferase.

Uma vez que a O-desmetilvenlafaxina é farmacologicamente ativa, as concentrações terapêuticas e tóxicas de venlafaxina são estimadas como a soma das concentrações de venlafaxina e deste metabolito. Para concentrações entre 1 a 1,5 mg/L a toxicidade manifesta-se e entre 3 e 7 mg/L já é potencialmente fatal.

Caso

Um indivíduo do sexo masculino, com 34 anos de idade foi encontrado morto na sua cama pela namorada. No local, não havia indícios de crime nem suicídio. Uma vez que a morte foi inesperada e a causa e circunstância da morte eram desconhecidas foi realizada uma autópsia. Nas análises toxicológicas foram identificadas várias substâncias que correspondiam à medicação que o indivíduo estava a tomar. Uma vez que a concentração de venlafaxina encontrada era potencialmente fatal – 4,5 mg/kg – e que o rácio O-desmetilvenlafaxina/venlafaxina era anormalmente baixo levantou-se a hipótese de a morte ter resultado de uma intoxicação por venlafaxina devido a uma metabolização ineficaz por parte das enzimas CYP2D6 e CYP2C19. Para a CYP2D6, o genótipo encontrado (*4/*5) correspondia a uma atividade nula da enzima, ou seja, um fenótipo de metabolizador pobre e o mesmo se verificou para a CYP2C19 (*2/*2). Devido à baixa concentração de N-desmetilvenlafaxina e elevada concentração de outros fármacos encontrados (ex: quetiapina) que são metabolizados principalmente pela CYP3A4, pensa-se que esta enzima também tinha uma atividade reduzida. Porém, como não foi efetuada a genotipagem tal afirmação não passa de uma especulação. Após análise dos registos médicos, da autópsia e das análises toxicológicas concluiu-se que a morte foi acidental e foi devida a intoxicação por fármacos, na qual contribuíram vários fatores, entre os mais importantes a combinação da venlafaxina, oxicodona e etanol, que foi agravada pelo fato de o indivíduo ser um metabolizador pobre para as enzimas metabolizadoras da venlafaxina, potenciando o seu efeito cardiotoxico. É importante referir que para o estudo deste caso foi utilizado, como auxiliar, um programa de simulação da farmacocinética da venlafaxina e O-desmetilvenlafaxina, de forma a determinar as concentrações e rácio destas em populações virtuais com diferentes fenótipos, permitindo a comparação com os resultados encontrados no caso em questão. O recurso a este tipo de programas tem ainda muitas limitações mas, como

demonstrado neste caso, pode ser uma aposta promissora no rastreio de causas prováveis para concentrações inesperadas de medicamentos em toxicologia forense (Jornil *et al.*, 2013).

4.2.3. Fluoxetina

A fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptação da serotonina e é primariamente metabolizada no fígado, através de desmetilação, originando o metabolito ativo norfluoxetina e a principal enzima interveniente neste processo é a CYP2D6 (figura 18).

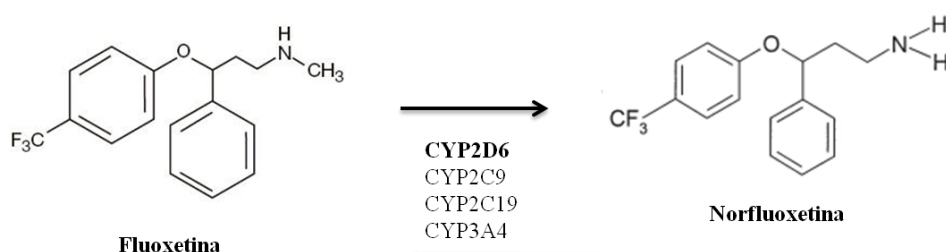


Figura 18 – Representação esquemática do metabolismo da fluoxetina (adaptado de (Hiemke e Hartter, 2000)).

Atualmente, esta classe de antidepressivos é a única indicada para o tratamento da depressão em crianças com idades perto dos oito anos e nas quais o acompanhamento psicológico não foi suficiente (Blazquez *et al.*, 2012).

Caso

Uma criança do sexo masculino com 9 anos de idade entrou em estado de mal epilético e teve uma paragem cardíaca que levou à sua morte. A criança sofria de défice de atenção e hiperatividade, tinha um distúrbio obsessivo-compulsivo e ainda apresentava síndrome de Tourette, sendo que, por estes motivos, estava a ser tratado com metilfenidato, fluoxetina e clonidina. Com base nos registos médicos e no depoimento dos pais, foi possível apurar que, durante aproximadamente 10 meses, a criança apresentou sintomatologia que indicava uma intoxicação metabólica. Os resultados toxicológicos *post mortem* demonstraram que as concentrações de fluoxetina e

norfluoxetina eram superiores às esperadas. A genotipagem para a enzima metabolizadora revelou um defeito genético no locus *CYP2D6*, o que resulta no fenótipo metabolizador pobre, explicando assim os elevados níveis encontrados. Foi então determinada que a causa da morte foi intoxicação por fluoxetina mas que esta foi acidental. O teste genético foi de extrema importância neste caso uma vez que, como os pais eram os responsáveis pelo controlo da medicação, estavam a ser incriminados pela morte da criança mas, perante a evidência genética encontrada, a investigação foi encerrada (Sallee *et al.*, 2000).

4.2.4. Doxepina

A doxepina é um antidepressivo tricíclico cujo metabolismo depende essencialmente da enzima *CYP2D6*. A doxepina sofre desmetilação por ação de um conjunto de enzimas (*CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP2C9* e *CYP2C19*) dando origem à nordoxepina que é farmacologicamente ativa. Por sua vez, os metabolitos inativos – hidroxidoxepina e hidroxinordoxepina – formam-se por ação da *CYP2D6* (figura 19) (Koski *et al.*, 2007).

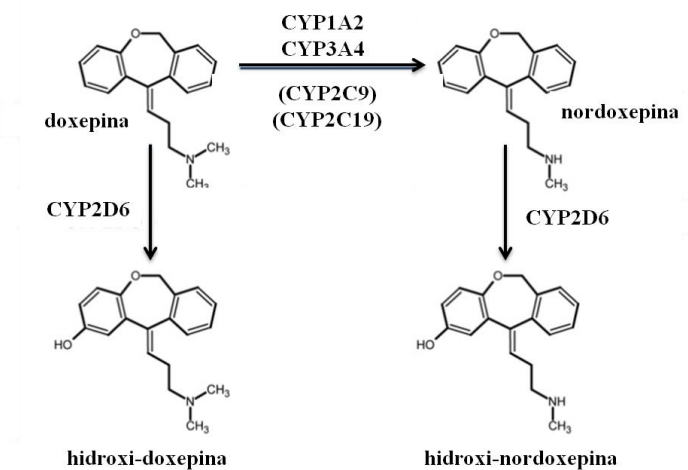


Figura 19 - Representação esquemática do metabolismo da doxepina (adaptado de (Neukamm *et al.*, 2013).

Caso

Uma mulher, com 52 anos de idade e com historial médico de tentativas de suicídio foi encontrada morta na sua cama. Segundo as informações obtidas ultimamente não havia

indícios desse tipo de pensamento. A paciente era polimedicada, tomando um total de 18 comprimidos por dia, sendo que dias antes da sua morte houve alterações nas dosagens de alguns fármacos, nomeadamente, da doxepina, que passou de 25 mg para 100mg e depois para 150 mg, a amlodipina foi administrada pela primeira vez neste período de tempo e a dosagem do protipendilo também foi duplicada. Os testes toxicológicos detetaram elevadas concentrações de doxepina e nordoxepina e o rácio entre estas também foi elevado, o que sugeriu que a morte foi devida a este fármaco. Relativamente à genotipagem, não se verificou quaisquer mutações nos genes que codificam a CYP2C9 e CYP2C19 mas encontrou-se uma no da CYP2D6 que se traduz numa reduzida produção da enzima no fígado, podendo levar ao fenótipo metabolizador intermédio. Com o auxílio do modelo farmacocinético e tendo em conta o fenótipo da paciente, estudou-se a hipótese do suicídio e a dose de doxepina que teria de ser ingerida numa só vez foi estimada, sendo que foi de 1500 mg, o que corresponde a cerca de 60 comprimidos. Uma vez que a toma da medicação era supervisionada, que o quarto da doente era frequentemente revistado e que na autópsia não foram encontrados resíduos de comprimidos no estômago, esta hipótese não é muito credível. Concluiu-se então que a morte foi acidental, provocada por uma intoxicação gradual e que a concentração letal da doxepina foi atingida devido a interações com os outros fármacos e a particularidades genéticas que diminuíram a capacidade metabólica da paciente (Neukamm *et al.*, 2013).

Todos os anos são cometidos suicídios por pessoas medicadas com antidepressivos. Embora possam existir variados motivos que levem os indivíduos a cometer esse ato, a ineficácia do tratamento pode estar associada ao agravamento do estado depressivo e levar, por fim, o indivíduo a pôr termo à vida. Num estudo efetuado por (Zackrisson *et al.*, 2010) pretendeu-se analisar casos de suicídio, recorrendo à genotipagem *post mortem* da CYP2D6. Verificou-se que a duplicação do gene que codifica a enzima era encontrada com grande frequência. Desta forma, particularmente para a classe dos antidepressivos, os metabolizadores ultra-rápidos podem estar mais suscetíveis a tendências suicidas uma vez que os fármacos não estão a ter o efeito terapêutico pretendido. A farmacogenética pode então representar um papel importante na prescrição destes fármacos, de modo a diminuir as fatalidades (Zackrisson *et al.*, 2010).

4.3. Outros

4.3.1. Digoxina

A digoxina é um cardiotónico e por essa razão é utilizada no tratamento de problemas cardíacos, tal como a fibrilação atrial. Este fármaco apresenta uma janela terapêutica estreita e os seus efeitos adversos estão estritamente relacionados com a sua concentração plasmática. Desta forma, uma metabolização/eliminação ineficaz com consequente acumulação de digoxina pode ser letal. Concentrações abaixo de 2,6 nmol/L são consideradas terapêuticas e acima de 7 nmol/L são consideradas tóxicas. Muitas vezes é detetada nas análises toxicológicas *post mortem* e quando se encontra dentro dos limites de toxicidade, dificulta a determinação da causa da morte. A glicoproteína P tem um papel importante na eliminação da digoxina e, por esta razão, alterações genéticas no gene MDR1 podem dificultar este processo. O 3435C>T, localizado no exão 26, o 1236C>T, localizado no exão 21 e o 2677G>T/A, localizado no exão 12, são os três SNPs mais estudados. A alteração nos dois primeiros SNPs não leva a modificações no aminoácido que é sintetizado mas no último a substituição da guanina por timina leva à formação de serina em vez da alanina. No entanto, o haplótipo TTT tem maior impacto no metabolismo da digoxina do que qualquer dos três separadamente (Neuvonen *et al.*, 2011; Wilkinson, 2012).

O efeito dos SNPs na concentração sérica de digoxina foi estudado na Finlândia num grupo de 112 casos fatais, nos quais este fármaco foi identificado nas análises toxicológicas. O grupo controlo foi constituído por 143 finlandeses e o grupo de estudo foi dividido consoante o sexo e subdividido em três, consoante a concentração de digoxina encontrada (<2,6, ≥2,6 e ≥7 nmol/L). Os resultados encontrados demonstraram que existe uma correlação positiva entre o número de alelos mutantes e a concentração plasmática de digoxina. Tal verificou-se tanto para os SNPs individualmente como para o haplótipo TTT. Este estudo permitiu também tirar outras conclusões importantes uma vez que se verificou que a proporção de alelos mutantes na população finlandesa é superior à encontrada nos outros países da Europa (figura 20) e que a proporção também é superior nas mulheres do que nos homens, principalmente no grupo com maior

concentração plasmática de digoxina (figura 21). Tal alerta para a vulnerabilidade destes dois grupos para os efeitos letais da digoxina, bem como, possivelmente, de outros fármacos uma vez que existe uma grande variabilidade de substratos da glicoproteína P. Por outro lado, esta pesquisa demonstra que a genotipagem pode ser de grande utilidade no esclarecimento da causa e circunstância da morte nos casos em que o fármaco se encontra no intervalo de toxicidade (Neuvonen *et al.*, 2011).

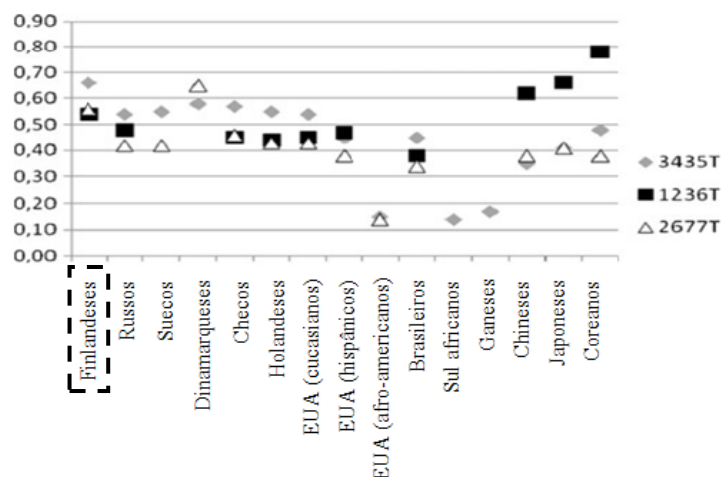


Figura 20 – Distribuição mundial da frequência dos alelos mutantes para os três SNPs (adaptado de (Neuvonen *et al.*, 2011)).

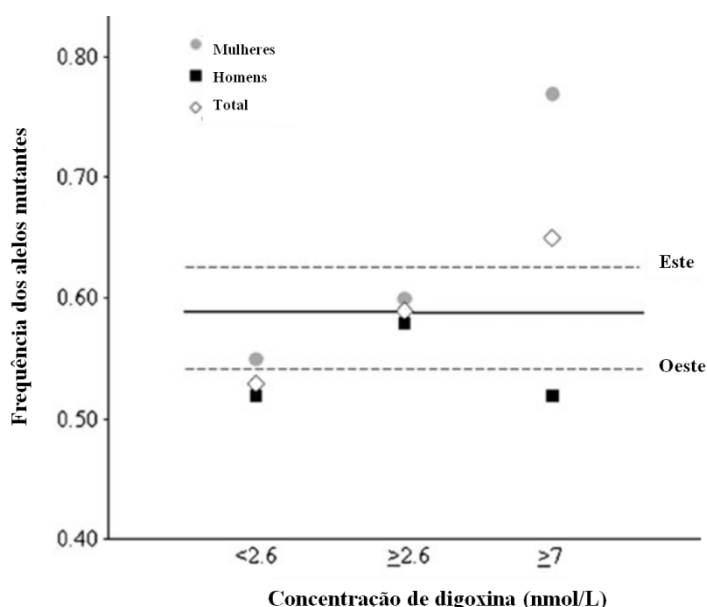


Figura 21 – Frequência dos alelos mutantes para os três SNPs na totalidade de acordo com o gênero e a concentração de digoxina no grupo de estudo em comparação com o grupo controle (linhas horizontais) (adaptado de (Neuvonen *et al.*, 2011)).

4.3.2. Diazepam

A farmacogenética em toxicologia forense não se resume apenas à aplicação de testes genéticos em casos de morte uma vez que estes podem ser uma ferramenta útil para esclarecer dúvidas noutros atos criminosos. Tome-se como exemplo um condutor que é apanhado a conduzir sob influência de substâncias medicamentosas. Neste caso a genotipagem pode ajudar a distinguir se o indivíduo tomou a medicação de acordo com as indicações médicas ou se abusou da dose (Jones *et al.*, 2007). Vão ser apresentados de seguida casos relacionados com o diazepam em que os resultados das análises não coincidiam com os depoimentos dos infratores, recorrendo-se a testes genéticos para verificar se estes adicionavam novas informações e auxiliavam a averiguar o sucedido. Desta forma, estes casos vêm demonstrar a aplicabilidade da farmacogenética neste campo da toxicologia forense.

O diazepam é uma benzodiazepina utilizada essencialmente como ansiolítico e indutor do sono. No seu metabolismo intervêm especialmente a CYP3A4 e a CYP2C19, sendo estas responsáveis pela hidroxilação e N-desmetilação, respetivamente (figura 22). O nordiazepam é o principal metabolito resultante (Infarmed, 2006).

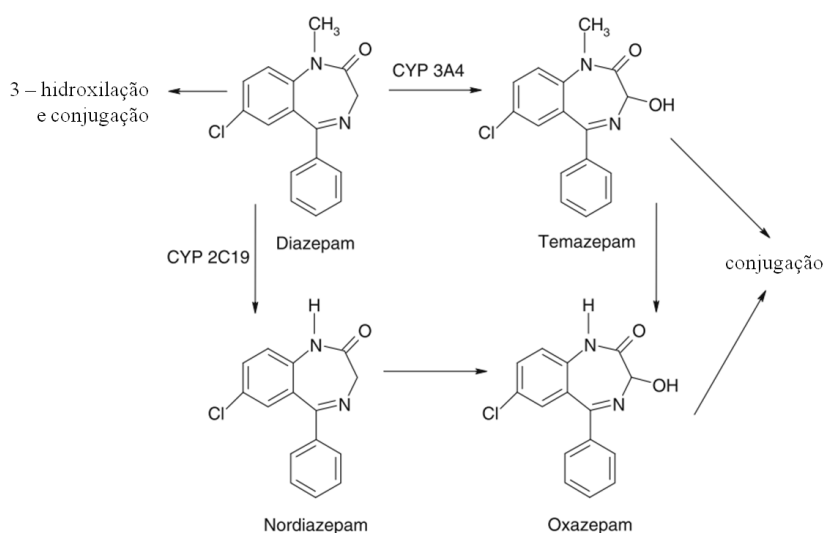


Figura 22 – Representação esquemática do metabolismo do diazepam (adaptado de (Andresen *et al.*, 2013)).

Caso 1

Um indivíduo foi detido por obstrução à autoridade e os resultados da análise efetuada ao sangue foram os seguintes: 1,23 g/Kg de álcool e 6,4 mg/L de diazepam. Dado que o nordiazepam e os outros metabolitos não foram detetados, poderiam não existir ou estar abaixo do limite de deteção (0,011 mg/L). Recorreu-se à genotipagem da *CYP2C19* de forma a clarificar se o indivíduo abusou do fármaco deliberadamente ou se este foi administrado com indicação médica e verificou-se que o genótipo correspondia a um metabolizador extensivo. Tal não justifica a elevada concentração de diazepam nem a ausência de metabolitos, sendo que outras hipóteses foram levantadas, tais como, a inibição das enzimas *CYP2C19* e *CYP3A4* por outras substâncias que não estavam a ser analisadas e/ou erros pré-analíticos que antecederam a colheita. Concluiu-se que, como o indivíduo estava muito agitado, provavelmente o diazepam foi-lhe administrado por profissionais de saúde antes da colheita da amostra de sangue, justificando assim os resultados obtidos (Andresen *et al.*, 2013).

Caso 2

Um indivíduo foi detido por tentativa de roubo e as análises toxicológicas efetuadas ao sangue revelaram a presença de diazepam numa concentração de 1,1 mg/L, nordiazepam numa concentração de 0,012 mg/L e álcool numa concentração de 1,36 g/Kg. Devido ao elevado rácio diazepam/nordiazepam suspeitava-se de abuso do fármaco mas recorreu-se à genotipagem da *CYP2C19* pois a dose ingerida poderia até ser a correta e o rácio encontrado poderia ser justificado por um genótipo que resultasse numa metabolização ineficaz. Contudo, verificou-se que o indivíduo era um metabolizador extensivo para a *CYP2C19*. O suspeito informou que tinha tomado metadona, buprenorfina e doxepina e estas interações poderiam ter resultado na inibição das enzimas metabólicas. No entanto, nenhum destes fármacos foi detetado nas análises toxicológicas (Andresen *et al.*, 2013).

A análise dos dois casos anteriores mostra que a farmacogenética não foi muito útil para explicar os resultados. No estudo em que os casos apresentados estão incluídos foram analisados outros em situações semelhantes mas relacionados com morfina/codeína e a conclusão foi a mesma, ou seja, de uma forma geral a aplicação da farmacogenética em

casos forenses tem uma relevância moderada, devendo por isso ser aplicada em casos muito concretos e não como procedimento de rotina (Andresen *et al.*, 2013).

V. Limitações e perspectivas futuras

Atualmente existem diversos métodos de genotipagem que fornecem informação valiosa quanto ao genótipo (Jannetto *et al.*, 2004). No entanto, a correta correlação do genótipo com o respectivo fenótipo é ainda um desafio para os profissionais uma vez que, segundo estudos fenotípicos, apenas em indivíduos que tenham ausência completa de uma determinada enzima é que se consegue prever com certeza o fenótipo correto. Dentro e entre as outras classes fenotípicas esta correlação já é mais ambígua pois verificam-se algumas sobreposições na atividade da enzima. Indivíduos com o genótipo semelhante podem apresentar diferentes fenótipos que podem ser explicados, por fatores não genéticos, como por exemplo a dieta, ou então por interações entre fármacos, que podem fazer com que um indivíduo com um genótipo correspondente a um metabolizador extensivo apresente resultados de um metabolizador pobre ou intermédio, caso a interação leve à inibição da enzima em estudo (Gaedigk *et al.*, 2008; Pelotti e Bini, 2011).

Sabe-se que existem alterações químicas e/ou estruturais na molécula de DNA que não afetam a sequência de nucleótidos mas afetam a expressão da informação nela contida. Tais alterações são transmitidas à descendência da célula em que ocorrem, tendo por isso um efeito hereditário. O ramo da genética que estuda este fenómeno designa-se de epigenética e espera-se que no futuro esta possa vir a ser incluída mais frequentemente nos estudos realizados de forma a melhorar a correlação genótipo-fenótipo (Pelotti e Bini, 2011).

Nos casos apresentados ao longo do trabalho pode-se verificar que, em alguns deles, os resultados auxiliaram na inimputabilidade de suspeitos. A possibilidade dos resultados farmacogenéticos serem usados como evidência nos tribunais é uma preocupação para alguns autores caso tal seja utilizado inadequadamente. Pode-se chegar ao extremo de utilizar as condições biológicas identificáveis que predis põem os indivíduos para atos criminosos para diminuir a sua culpabilidade. Desta forma, é necessário cautela na interpretação e utilização dos resultados farmacogenéticos (Wong *et al.*, 2010).

Apesar dos vários casos apresentados e da relevância crescente da farmacogenética em toxicologia forense, a comunidade médico-legal ainda não está muito convencida do

total potencial da genética como um fator determinante na causa de morte em parte devido ao fato de apenas se conseguir estabelecer uma forte correlação entre genótipo-fenótipo para um número limitado de fármacos. Serão necessárias mais evidências científicas para que esta realidade seja aceita. Porém, devido ao rápido desenvolvimento tecnológico espera-se que, num futuro próximo, as limitações apresentadas sejam resolvidas e a farmacogenética passe a estar incluída na rotina médico-legal.

VI. Conclusão

O campo da toxicologia forense enfrenta vários obstáculos na interpretação dos resultados uma vez que estabelecer a causa e circunstância da morte é um desafio, principalmente em casos de suicídio, acidente ou quando a causa é desconhecida. A comunicação entre os vários profissionais envolvidos nos casos forenses é essencial para determinar com maior fiabilidade estes parâmetros. A farmacogenética é uma ciência complexa que envolve simultaneamente conhecimentos de farmacologia e genética e a sua utilização na área da toxicologia forense pode revelar novos aspetos importantes para a resolução dos casos, tal como foi demonstrado com exemplos ao longo do trabalho. Verificou-se também que na maior parte dos casos apresentados as análises toxicológicas detetaram múltiplos fármacos. Assim, é muito importante ter conhecimento acerca do tipo de interações entre os vários fármacos de modo a que a interpretação de toda a informação seja correta.

Devido à sua relevância espera-se que no futuro a farmacogenética seja uma ferramenta de rotina médico-legal e que sejam desenvolvidos e/ou aperfeiçoados modelos informáticos que permitam ultrapassar a principal limitação da sua utilização, ou seja, a correlação entre genótipo-fenótipo. Por fim, é importante salientar que todos os casos apresentados alertam indiretamente para a necessidade da aplicação da farmacogenética na prática clínica de forma a individualizar a terapêutica e diminuir a ocorrência de mortes devido a polimorfismos e/ou interações.

VII. Referências bibliográficas

- Aasmundstad, T. A., *et al.* (1995). Biotransformation and pharmacokinetics of ethylmorphine after a single oral dose. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 39, pp. 611-620.
- Ackerman, M. J., Tester, D. J. e Driscoll, D. J. (2001). Molecular autopsy of sudden unexplained death in the young. *American journal of forensic medicine and pathology*, 22, pp. 105-111.
- Andresen, H., Augustin, C. e Streichert, T. (2013). Toxicogenetics--cytochrome P450 microarray analysis in forensic cases focusing on morphine/codeine and diazepam. *International Journal of Legal Medicine*, 127, pp. 395-404.
- Baselt, R. C. (2008). *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 8^o ed. Foster City, CA, Biomedical Publications.
- Blazquez, A., *et al.* (2012). Fluoxetine pharmacogenetics in child and adult populations. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 21, pp. 599-610.
- Blum, M., *et al.* (1990). Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA and Cell Biology*, 9, pp. 193-203.
- Bunten, H., *et al.* (2010). OPRM1 and CYP2B6 gene variants as risk factors in methadone-related deaths. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 88, pp. 383-389.
- Chen, Z. R., *et al.* (1991). Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sciences*, 48, pp. 2165-2171.
- Cooper, R. S., *et al.* (2005). An international comparative study of blood pressure in populations of European vs. African descent. *Biomed Central Medicine*, 3, pp. 80-89.
- Costa, I., *et al.* (2013). Postmortem redistribution of tramadol and O-desmethyltramadol. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, pp. 670-675.

Dahl, M. L., *et al.* (1995). Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis,. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274, pp. 516-520.

Druid, H. e Holmgren, P. (1997). A compilation of fatal and control concentrations of drugs in postmortem femoral blood. *Journal of Forensic Sciences*, 42, pp. 79-87.

Druid, H., *et al.* (1999). Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotyping on postmortem blood as a supplementary tool for interpretation of forensic toxicological results. *Forensic Science International*, 99, pp. 25-34.

Eap, C. B., *et al.* (2007). Stereoselective block of hERG channel by (S)-methadone and QT interval prolongation in CYP2B6 slow metabolizers. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 81, pp. 719-728.

Elkalioubie, A., *et al.* (2011). Near-fatal tramadol cardiotoxicity in a CYP2D6 ultrarapid metabolizer. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 67, pp. 855-858.

Endres, C. J., *et al.* (2006). The role of transporters in drug interactions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, pp. 501-517

Ensom, M. H., Chang, T. K. e Patel, P. (2001). Pharmacogenetics: the therapeutic drug monitoring of the future? *Clinical Pharmacokinetics*, 40, pp. 783-802.

Evans, W. E. (2003). Pharmacogenomics: marshalling the human genome to individualise drug therapy. *Gut*, 52 Suppl 2, pp. ii10-18.

Evans, W. E. e Johnson, J. A. (2001). Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual review of genomics and human genetics*, 2, pp. 9-39.

Evans, W. E. e Relling, M. V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics *Science*, 286, pp. 487-491.

Evans, W. E. e Relling, M. V. (2004). Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature*, 429, pp. 464-468.

- Gaedigk, A., *et al.* (2008). The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83, pp. 234-242.
- George, M., *et al.* (2012). Methadone toxicity and possible induction and enhanced elimination in a premature neonate. *Journal of medical toxicology* 8, pp. 432-435.
- Gonzalez, F., *et al.* (1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 331, pp. 442-446.
- Guttmacher, A. E. e Collins, F. S. (2003). Inheritance and Drug Response. *The new england journal of medicine*, 348, pp. 529-537.
- Helland, A., Isaksen, C. V. e Slordal, L. (2010). Death of a 10-month-old boy after exposure to ethylmorphine. *Journal of Forensic Sciences*, 55, pp. 551-553.
- Henry, J. A. (1997). Toxicity of newer versus older antidepressants. *Advances in Psychiatric Treatment*, 3, pp. 41-45.
- Hiemke, C. e Hartter, S. (2000). Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology and therapeutics*, 85, pp. 11-28.
- Higgins, C. F. (2007). Multiple molecular mechanisms formultidrug resistance transporters. *Nature*, 446, pp. 749-757.
- Hirata, M. H., Tavares, V. e Hirata, R. D. C. (2006). Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. *Medicina, Ribeirão Preto*, 39, pp. 522-534.
- Hodges, L. M., *et al.* (2011). Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenetics and Genomics*, 21, pp. 152-161.
- Holloway, J. W., *et al.* (2000). Association of beta2-adrenergic receptor polymorphisms with severe asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 30, pp. 1097-1103.

Holmgren, P. e Ahlner, J. (2006). Pharmacogenomics for forensic toxicology: Swedish experience. *In: S. H. Wong, M. Linder e R. Valdes (eds.) Pharmacogenomics and Proteomics*. Washington DC, AACCC Press, pp. 295–299.

ICMEA (2007). Guidelines for the determination of manner of death. [Em linha]. Disponível em <http://www.coronersillinois.org>. [Consultado em 13/01/2014].

Infarmed (2006). Resumo das características do medicamento - diazepam. [Em linha]. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4846&tipo_doc=rcm. [Consultado em 7/7/2014].

Infarmed (2010a). Resumo das características do medicamento. [Em linha]. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=19285&tipo_doc=rcm. [Consultado em 3/2/2014].

Infarmed (2010b). Resumo das características do medicamento - amitriptilina. [Em linha]. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=137&tipo_doc=rcm. [Consultado em 23/03/2014].

Infarmed (2012a). Reações Adversas a Medicamentos: Análise da base de dados do Sistema Nacional de Farmacovigilância (SVIG). [Em linha]. Disponível em http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/FARMACOVIGILANCIA/Relatorio_analise_dados_SVIG_2009_2011.pdf. [Consultado em 18/11/2013].

Infarmed (2012b). Resumo das características do medicamento - actiq. [Em linha]. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=31844&tipo_doc=rcm. [Consultado em 7/7/2014].

Ingelman-Sundberg, M. (2001). Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *Journal of Internal Medicine*, 250, pp. 186-200.

Ingelman-Sundberg, M. (2004). Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, pp. 193-200.

Ingelman-Sundberg, M., *et al.* (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacogenetic and clinical aspects. *Pharmacology and therapeutics*, 116, pp. 496-526.

Jannetto, P. J., Laleli-Sahin, E. e Wong, S. H. (2004). Pharmacogenomic genotyping methodologies. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42, pp. 1256-1264.

Jannetto, P. J., *et al.* (2002). Pharmacogenomics as molecular autopsy for postmortem forensic toxicology: genotyping cytochrome P450 2D6 for oxycodone cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 26, pp. 438-447.

Jin, M., *et al.* (2005). Pharmacogenomics as Molecular Autopsy for Forensic Toxicology: Genotyping Cytochrome P450 3A4*1B and 3A5*3 for 25 Fentanyl Cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 29, pp. 590-598.

Johansson, I., *et al.* (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D6 locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, pp. 11825–11829.

Jones, A. W., Holmgren, A. e Kugelberg, F. C. (2007). Concentrations of scheduled prescription drugs in blood of impaired drivers: considerations for interpreting the results. *Therapeutic Drug Monitoring*, 29, pp. 248-260.

Jornil, J., *et al.* (2013). A poor metabolizer of both CYP2C19 and CYP2D6 identified by mechanistic pharmacokinetic simulation in a fatal drug poisoning case involving venlafaxine. *Forensic Science International*, 226, pp. e26-e31.

Jortani, S. A., Stauble, E. e Wong, S. H. (2012). Pharmacogenetics in clinical and forensic toxicology: opioid overdoses and deaths. *In: A. Mozayani e L. Raymon (eds.) Handbook of drug interactions: a clinical and forensic guide.* 2^o ed. New York, Humana Press, pp.

- Jumbelic, M. I. (2010). Deaths with transdermal fentanyl patches. *American journal of forensic medicine and pathology*, 31, pp. 18-21.
- Kallow, W., Mayer, U. A. e Tyndale, R. F. (2001). Pharmacogenomics. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 113, pp. 111-115.
- Kingbäck, M., *et al.* (2012). Influence of CYP2D6 genotype on the disposition of the enantiomers of venlafaxine and its major metabolites in postmortem femoral blood. *Forensic Science International*, 214, pp. 124-134.
- Koo, S. H. e Lee, E. J. (2006). Pharmacogenetics approach to therapeutics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33, pp. 525-532.
- Koren, G., *et al.* (2006). Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *The Lancet*, 368, pp. 704.
- Koski, A., *et al.* (2007). A fatal doxepin poisoning associated with a defective CYP2D6 genotype. *American journal of forensic medicine and pathology*, 28, pp. 259-261.
- Koski, A., *et al.* (2006). CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and amitriptyline metabolite ratios in a series of medicolegal autopsies. *Forensic Science International*, 158, pp. 177-183.
- Lalovic, B., *et al.* (2004). Quantitative contribution of CYP2D6 and CYP3A to oxycodone metabolism in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, pp. 447-454.
- Lee, W., *et al.* (2005). Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *Oncologist*, 10, pp. 104-111.
- Levo, A., *et al.* (2003). Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. *Forensic Science International*, 135, pp. 9-15.
- Lotsch, J., *et al.* (2004). Genetic predictors of the clinical response to opioid analgesics: clinical utility and future perspectives. *Clin Pharmacokinet*, 43, pp. 983-1013.

- Ma, M. K., Woo, M. H. e L., M. H. (2002). Genetic basis of drug metabolism. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 59, pp. 2061-2069.
- Maeda, K. e Sugiyama, Y. (2008). Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23, pp. 223-235.
- Maron, B. J., *et al.* (1996). Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *Journal of the American Medical Association*, 276, pp. 199-204.
- Maths, A. (2010). Taqman-based SNP genotyping.[Em linha]. Disponível em <http://www.applied-maths.com/applications/taqman-based-snp-genotyping>. [Consultado em 08/06/2014].
- Matich, S. M. (2013). Just Pediatrics: Just Say “No” to Codeine: The Story of Kids, Ultrarapid Metabolizers, and the CYP2D6 System. *Journal of Radiology Nursing*, 32, pp. 97-98.
- Metzger, I. F., Souza-Costa, D. C. e Tanus-Santos, J. E. (2006). Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina, Ribeirão Preto*, 39 pp. 515-521.
- Musshoff, F., Stamer, U. M. e Madea, B. (2010). Pharmacogenetics and forensic toxicology. *Forensic Science International*, 203, pp. 53-62.
- Neukamm, M. A., *et al.* (2013). Fatal doxepin intoxication – Suicide or slow gradual intoxication? *Forensic Science International*, 227, pp. 82-84.
- Neuvonen, A. M., Palo, J. U. e Sajantila, A. (2011). Post-mortem ABCB1 genotyping reveals an elevated toxicity for female digoxin users. *International Journal of Legal Medicine*, 125, pp. 265-269.
- Niemi, M. (2009). Transporter pharmacogenetics and statin toxicity. *Nature*, 87, pp. 130-133.
- Palmer, R. B. (2010). Fentanyl in postmortem forensic toxicology. *Clinical Toxicology*, 48, pp. 771–784.

Pelotti, S. e Bini, C. (2011). Forensic Pharmacogenetics, Forensic Medicine - From Old Problems to New Challenges.[Em linha]. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/forensic-medicine-from-old-problems-to-new-challenges/forensicpharmacogenetics>. [Consultado em 25/05/2014].

Pessôa, R. F., Nácul, F. E. e Noell, F. (2006). Farmacogenética e Farmacogenômica. Evidências de como a genética pode influenciar a eficácia de fármacos e a busca por novos alvos farmacológicos. *Infarma*, 18, pp. 41-48.

Petrosino, J. F., *et al.* (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55, pp. 856-866.

Rodriguez-Antona, C. e Ingelman-Sundberg, M. (2006). Cytochrome P450: Pharmacogenetics and Cancer. *Oncogene*, 25, pp. 1679–1691.

Sajantila, A. (2012). Editors' pick: codeine toxicity prediction in young infants - genotype the mothers. *Investigative Genetics*, 3, pp. 24.

Sajantila, A., *et al.* (2010). Pharmacogenetics in medico-legal context. *Forensic Science International*, 203, pp. 44-52.

Sallee, F. R., DeVane, C. L. e Ferrell, R. E. (2000). Fluoxetine-related death in a child with cytochrome P-450 2D6 genetic deficiency. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 10, pp. 27-34.

Shi, M. M., Bleavins, M. R. e Iglesia, F. A. D. L. (2001). Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, pp. 591-595.

Shitara, Y., Horie, T. e Sugiyama, Y. (2006). Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, pp. 425-446.

Singh, D., *et al.* (2011). Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug Discovery Today*, 16, pp. 793-799.

Skopp, G. (2010). Postmortem toxicology. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 6, pp. 314–325.

Smith, D. (2000). Bioinformatics.[Em linha]. Disponível em <http://classes.biology.ucsd.edu/old.web.classes/bimm100.FA00/29.Bioinformatics.html>. [Consultado em 08/06/2014].

Somogyi, A. A., Barratt, D. T. e Coller, J. K. (2007). Pharmacogenetics of Opioids. *Clinical pharmacology and therapeutic*, 81, pp. 429-444.

Song, P., *et al.* (2002). Detection of MDR1 single nucleotide polymorphisms C3435T and G2677T using real-time polymerase chain reaction: MDR1 single nucleotide polymorphism genotyping assay. *American Association of Pharmaceutical Sciences*, 4, pp. 29-37.

T.I.A.F.T (2004). Reference blood level list of therapeutic and toxic substances.[Em linha]. Disponível em http://www.gtfc.org/cms/images/stories/Updated_TIAFT_list_202005.pdf. [Consultado em 22/01/2014].

Thorn, C. F., Klein, T. E. e Altman, R. B. (2009). Codeine and morphine pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19, pp. 556-558.

Verrecas, M., *et al.* (2004). Forensic toxicology: development of an SNP-assay for genotyping CYP2D6 and CYP2C19 variants. *International Congress Series*, 1261, pp. 583– 585.

Wilkinson, G. R. (2012). Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. *In*: J. G. Hardman, L. E. Limbird e A. G. Gilman (eds.) *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 12º ed. New York, McGraw-Hill, pp. 3-29.

Wolf, B. C., *et al.* (2004). Methadone-related deaths in Palm Beach County. *Journal of Forensic Sciences*, 49, pp. 375-378.

Wong, S. H., *et al.* (2010). From personalized medicine to personalized justice: the promises of translational pharmacogenomics in the justice system. *Pharmacogenomics*, 11, pp. 731-737.

Wong, S. H., *et al.* (2003). Pharmacogenomics as an aspect of molecular autopsy for forensic pathology/toxicology: does genotyping CYP 2D6 serve as an adjunct for certifying methadone toxicity? *Journal of Forensic Sciences*, 48, pp. 1406-1415.

Wong, S. H. Y., *et al.* (2006). Pharmacogenomics as an aspect of molecular autopsy for forensic pathology/toxicology. *In*: S. H. Y. Wong, M. W. Linder e R. Valdes (eds.) *Pharmacogenomics and Proteomics. Enabling the Practice of Personalized Medicine*. Washington, DC, AACCC Press, pp. 311-318.

Wyman, J. F. (2012). Principles and Procedures in Forensic Toxicology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 32 pp. 493–507.

Yasuda, S. U., Zhang, L. e Huang, S. M. (2008). The Role of Ethnicity in Variability in Response to Drugs: Focus on Clinical Pharmacology Studies. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 84, pp. 417-423.

Zackrisson, A. L., Lindblom, B. e Ahlner, J. (2010). High frequency of occurrence of CYP2D6 gene duplication/multiduplication indicating ultrarapid metabolism among suicide cases. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 88, pp. 354-359.