

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE NOS PROCESSOS TANATOQUÍMICOS EM RATOS MACHOS E FÊMEAS NO INTERVALO PÓS-MORTE

KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE¹; ANITA AVILA DE SOUZA²;
RAPHELA CASSOL PICCOLI³; SOLANGE VEGA CUSTÓDIO⁴; WILLIAM SANABRIA SIMÕES⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas - kelenqf@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas - anita_a_avila@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas - raphaelacassol@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas - solangevegacustodio@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas - williamsimoes@gmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas - rspanevello@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O intervalo pós-morte (IPM) é o tempo entre o momento da morte até o momento em que o cadáver é encontrado e possui uma importância fundamental no âmbito jurídico (BUCHAN, 2001). Os métodos mais utilizados para estimar o IPM são embasados na observação de fenômenos cadavéricos que ocorrem após a morte, entretanto, embora esses métodos sejam certificados e confiáveis, eles ainda apresentam certas limitações quanto à estimativa do IPM (MARHOFF-BEARD; FORBES; GREEN, 2018).

A tanatoquímica ou bioquímica pós-morte (MADEA, 2005), é uma área que tem por finalidade, investigar marcadores bioquímicos capazes de determinar o momento aproximado do óbito, minimizando a ação externa e interna de interferentes tais como: idade, gênero, estilo de vida, causa da morte, uso de medicamentos, grau de autólise, putrefação e temperatura (HENSSGE; MADEA, 2007; ZHOU; BYARD, 2011). Desta forma, nos últimos anos tem sido crescente o número de estudos na literatura avaliando parâmetros bioquímicos em diferentes tecidos e fluidos corporais com o objetivo encontrar marcadores que possam auxiliar no IPM bem como na causa da morte (BELSEY; FLANAGAN, 2016; DA FONSECA *et al.*, 2019; GIRARD *et al.*, 2017; HEIMER *et al.*, 2022)

Neste contexto, o músculo esquelético tem se mostrado como modelo de tecido forense, uma vez que está presente em grandes quantidades no organismo e encontra-se disponível em estágios mais avançados de decomposição do corpo (CHOI *et al.*, 2019; DA FONSECA *et al.*, 2019; EHRENFELLNER *et al.*, 2017; FODITSCH; SAENGER; MONTICELLI, 2020; PITTLER *et al.*, 2016; ZISSLER *et al.*, 2020). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima encontrada no músculo, cuja função está associada a terminação da transmissão colinérgica na junção neuromuscular pela rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (RANG, 2001). A AChE tem sido amplamente avaliada em diversas condições patológicas, porém estudos relacionando essa enzima com IPM tem sido pouco relatado na literatura.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da AChE em amostras de músculo gastrocnêmio de ratos machos e fêmeas (jovens e adultos) em diferentes IPM.

METODOLOGIA

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas de diferentes idades (30 e 90 dias). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEUA 038617/2021-99).

Os animais foram submetidos a eutanásia e divididos em cinco grupos ($n = 6$ animais / grupo) de acordo com o tempo decorrido desde a eutanásia: Grupo 1: 0h; Grupo 2: 6h; Grupo 3: 12h; Grupo 4: 24h; Grupo 5: 48h. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e o músculo esquelético (gastrocnêmio) foi coletado de acordo com o IPM estimado para cada grupo. Para o ensaio da AChE amostras de músculo foram homogeneizadas em uma solução de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e centrifugados a 1800 rpm durante 10 min a 4°C . O ensaio enzimático da AChE foi determinado de acordo com ELLMAN (1961) o qual baseia-se na formação do ânion amarelo, 4,4-ditio-bis-ácido-nitrobenzóico medido em um espectrofotômetro a 412 nm durante 2 minutos com intervalo de 30 segundos a 27°C . Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ de proteína.

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism 9.3.0 (San Diego, CA, U.S.A.), pelo teste de ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e foram considerados significativos para $P < 0,05$.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os resultados ilustrados na figura 1A e 1C, houve uma diminuição significativa na atividade da AChE no músculo esquelético de ratos machos e fêmeas jovens nos intervalos de 12, 24 e 48 horas pós-morte (HPM), quando comparado ao grupo controle (0 HPM). No entanto, em relação aos resultados ilustrados na figura 1D, foi possível observar uma diminuição significativa na atividade da AChE no músculo esquelético de ratos fêmeas adultas apenas nos intervalos de 12 e 24 HPM, quando comparado ao grupo controle (0 HPM). Por outro lado, em relação a atividade da AChE no músculo esquelético de ratos machos adultos, não houve diferença significativa em nenhum intervalo HPM, quando comparado ao grupo controle (figura 1B).

Resultados referentes a atividade da AChE na literatura são controversos quando relacionado ao IPM. Além disso, cabe ressaltar que a atividade da AChE em relação ao IPM tem sido avaliada principalmente em amostras cerebrais. Desta forma, um aumento na atividade da AChE em cérebro total de camundongos machos têm sido observado após o tempo de 24 horas pós morte, não sendo observada alterações significativas no tempo de 6 e 48 horas quando comparado ao tempo 0 (FONSECA et al., 2019). Nossos resultados demonstram que em relação aos animais jovens, o perfil de atividade da enzima em diferentes IPM são similares entre machos e fêmeas em tecido muscular. Entretanto, o mesmo não é observado em relação aos animais adultos, uma vez que somente as fêmeas apresentam alterações na atividade da AChE muscular em diferentes IPM.

Embora ainda não seja possível elucidar o exato mecanismo envolvido nessas diferenças, dados da literatura tem demonstrado que a distribuição da AChE no músculo esquelético pode apresentar diferenças em relação ao estágio de desenvolvimento e a espécie (DREWS; MENGIS, 1990; OETTLING *et al.*, 1988; MAS-SOULIÉ *et al.*, 1993).

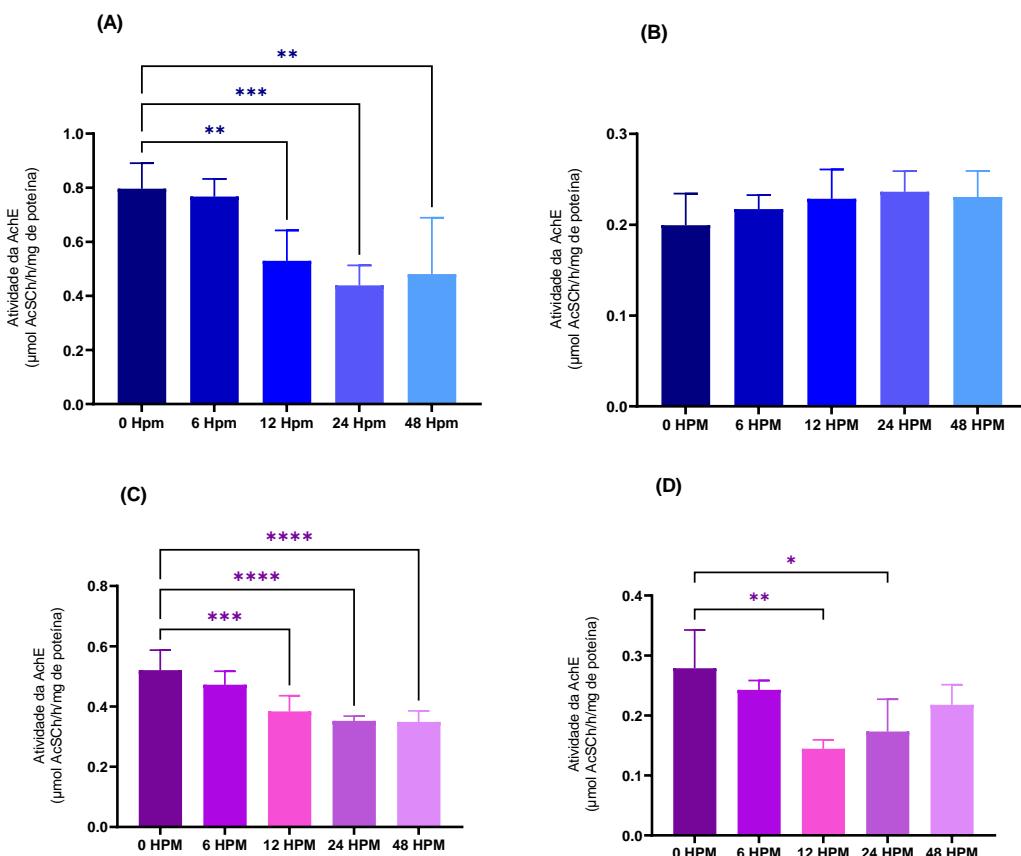


Figura 1. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em músculo esquelético de ratos (A) machos jovens, (B) machos adultos (C) fêmeas jovens e (D) fêmeas adultas nos intervalos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós morte (HPM). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$ e (****) $P < 0,0001$ denotam níveis de significância quando comparados com o grupo controle.

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados neste estudo, a AChE pode se tornar um potencial biomarcador na estimativa do IPM, entretanto, mais estudos são necessários para compreender os parâmetros envolvidos na atividade da AChE no tecido muscular esquelético em relação a idade e sexo. Ainda, cabe ressaltar que a determinação da atividade desta enzima consiste em um teste simples, prático e acessível e assim poderia contribuir no arsenal de métodos utilizados para a estimativa do IPM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- atual dos métodos usados no intervalo pós-morte posterior. **Society of Forensic Science Journal**, Canadá, 2001.
- BELSEY, S. L.; FLANAGAN, R. J. Postmortem biochemistry: Current applications. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, [s. l.], v. 41, p. 49–57, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2016.04.011>.
- CHOI, K. M. et al. Postmortem proteomics to discover biomarkers for forensic PMI estimation. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 133, n. 3, p. 899–908, 2019.
- DA FONSECA, C. A. R. et al. Na⁺/K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities as new markers of postmortem interval in Swiss mice. **Legal Medicine**, [s. l.], v. 36, n. November 2018, p. 67–72, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.11.003>.
- DREWS, U.; MENGIS, W. Contraction wave in the chick blastoderm induced by muscarinic stimulation. **Anatomy and embryology**, [s. l.], v. 182, n. 5, p. 447–454, 1990.
- EHRENFELLNER, B. et al. Are animal models predictive for human postmortem muscle protein degradation?. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 1615–1621, 2017.
- ELLMAN, George L. et al. Uma nova e rápida determinação colorimétrica da actividade da acetilcolinesterase. **Farmacologia bioquímica**, v. 7, n. 2, pág. 88-95, 1961.
- FODITSCH, E. E.; SAENGER, A. M.; MONTICELLI, F. C. Proteínas musculares esqueléticas : uma nova abordagem para delimitar o tempo desde a morte. [s. l.], n. 2016, p. 1–7, 2020.
- GIRARD, C. et al. Postmortem evaluation of cholesterol, triglyceride, and apolipoprotein levels. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 1777–1782, 2017.
- HEIMER, J. et al. Fundamentals of in situ postmortem magnetic resonance spectroscopy of the brain in the forensic framework - a review and outlook. **Forensic Imaging**, [s. l.], v. 29, 2022.
- OETTLING, G. et al. Expression of the Ca²⁺ mobilizing muscarinic system in the chick embryo correlates with morphogenesis. **Cell differentiation**, [s. l.], v. 23, n. 1–2, p. 77–86, 1988.
- PITTNER, S. et al. Postmortem degradation of skeletal muscle proteins: a novel approach to determine the time since death. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 421–431, 2016.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Drogas que Inibem a Cholinesterase. 4a edição. 2001.
- ZISSLER, A. et al. **Postmortem protein degradation as a tool to estimate the PMI: A systematic review**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: www.mdpi.com/journal/diagnostics.