

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS E ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATAS EM DIFERENTES INTERVALOS POST MORTEM

KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE¹; ANITA AVILA DE SOUZA²;
RAPHAELA 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

A determinação da estimativa do Intervalo Post Mortem (IPM) é crucial nas investigações de óbitos suspeitos e na identificação de vítimas, mas sua precisão pode ser afetada devido a diversos fatores, como idade, sexo e localização do corpo (PEYRON *et al.*, 2021; SANGWAN *et al.*, 2021). Os métodos convencionais baseiam-se em dados cadavéricos imediatos, como *algor mortis*, *livor mortis*, *rigor mortis* e putrefação, apresentando uma margem de erro específica (NAIA, 2014; TARONE; SANFORD, 2017).

Diante disso, os pesquisadores têm se dedicado a aprimorar a estimativa do IPM, com diferentes marcadores bioquímicos, como metabólitos, lipídeos, íons, proteínas e enzimas, sendo avaliados em diversos tecidos e fluidos corporais, demonstrando resultados promissores em relação a essa área forense (DA FONSECA *et al.*, 2019; HEIMER *et al.*, 2022; PITTNER *et al.*, 2022). Dentro dessa perspectiva, uma possibilidade de estudo interessante é a investigação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e das enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD).

As EROs desempenham papéis importantes nas funções celulares, como sinalização e defesa imunológica, originando-se de processos metabólicos normais. Contudo, quando presentes em excesso, as EROs podem ocasionar danos oxidativos em carboidratos, DNA e proteínas (DE MELLO *et al.*, 2023; DOS SANTOS *et al.*, 2023). Em um organismo saudável, as EROs podem ser neutralizadas por ação de compostos antioxidantes de origem enzimática ou não enzimática. A SOD é uma enzima antioxidante que tem a função de converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (BJELAKOVIC *et al.*, 2007).

O tecido cerebral tem sido considerado uma amostra importante para avaliação de aspectos toxicológicos nos *post mortem*. Além disso, estudos prévios já relataram que este tecido contém moléculas que podem ser promissores biomarcadores para diferentes estágios do IPM (DA FONSECA *et al.*, 2019). Entretanto, existem poucos dados na literatura avaliando parâmetros de estresse oxidativo cerebral no IPM, bem como, diferenças relacionadas ao sexo e a idade quanto ao uso deste tecido em análises forenses.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de espécies reativas e a atividade da SOD em diferentes IPM em córtex cerebral de ratas jovens, adultas e velhas.

2. METODOLOGIA

Neste protocolo, foram utilizadas 90 ratas Wistar de diferentes idades: 30 animais com 01 mês, 30 animais com 03 meses e 30 animais com 10 meses. Todos os procedimentos com os animais 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 córtex cerebral foi coletado e homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4) contendo KCl 140 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min a 4°C . O pellet foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para as análises.

Os níveis de EROs foi determinado de acordo com o método de Ali *et al.* (1992) e expressos em μmol diclorofluoresceina (DCF)/mg de proteína. A atividade da SOD foi medida usando o método descrito por Misra e Fridovich (1972) e foi expressa como unidades/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 considerados significativos para $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os níveis de EROs em córtex cerebral variam de acordo com a idade e o tempo após a morte. A figura 1A demonstra um aumento significativo nos níveis de EROs em fêmeas jovens no intervalo de 48 horas *post mortem* (HPM), quando comparado ao grupo controle (0 HPM). No entanto, nos resultados ilustrados na figura 1B e 1C, é possível observar uma diminuição significativa nos níveis de EROs em fêmeas adultas e velhas nos intervalos de 6, 12, 24 e 48 HPM, quando comparado ao grupo controle (0 HPM).

Em relação a atividade da SOD, nas fêmeas jovens (figura 2D) houve um aumento significativo na atividade desta enzima nos intervalos de 12, 24 e 48 HPM. Nas fêmeas adultas e velhas não houve diferença significativa em nenhum dos IPM avaliados quando comparado ao grupo controle (figura 2E e 2F).

A cadeia respiratória mitocondrial é umas das principais fontes de produção de espécies reativas no organismo. Barksdale *et al.* (2010) demonstrou que mitocôndrias isoladas de tecido cerebral de camundongos são capazes de continuar sintetizando ATP, mas essa produção de energia diminui em IPM mais longos, sendo o complexo I o mais afetado. Ainda, tem sido demonstrado que a mitocôndria de cérebro humano *post mortem* permanece ativa por pelo menos 8,5 horas após a morte do indivíduo (BARKSDALE *et al.*, 2010). Desta forma, essas questões envolvendo a mitocôndria poderiam estar associadas ao aumento nos níveis de EROS observado no córtex de fêmeas jovens. Já o aumento da SOD em animais jovens pode estar relacionado a tentativa de combater o aumento dos níveis de EROS, uma vez que a SOD é uma enzima antioxidante. Ainda, é importante destacar que a idade influencia o status redox o que poderia explicar as diferenças observadas entre fêmeas jovens, adultas e velhas (KOWALSKA; MILENEROWICZ, 2016).

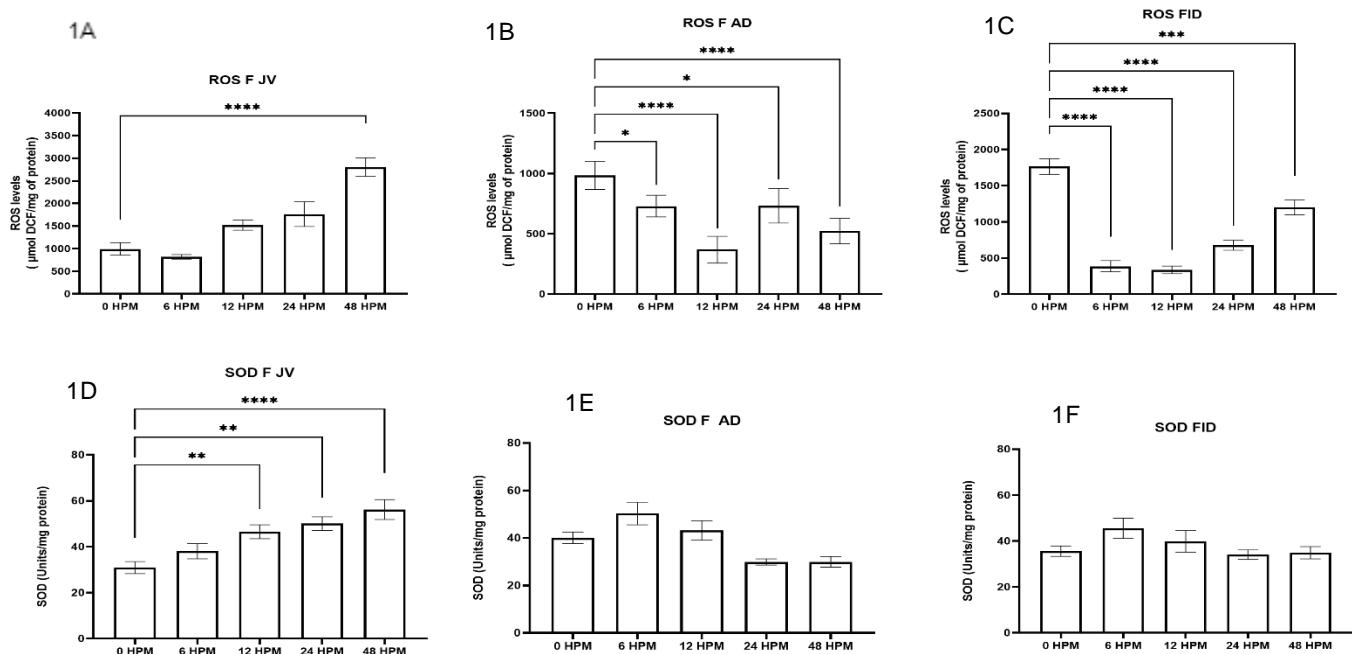


Figura 1. Níveis de espécies reativas de oxigénio (EROs) em córtex cerebral de ratas (A) jovens, (B) adultas e (C) velhas e a atividade da enzima da superóxido dismutase (SOD) em (A) jovens (B) adultas e (C) velhas nos intervalos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas *post mortem* (HPM). A análise estatística foi 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

Com base nos resultados pode-se concluir que EROS e SOD apresentam alterações de acordo com IPM e com a idade. Estes dados sugerem que estes parâmetros, especialmente EROS, podem ser promissores no auxílio da estimativa do IPM, juntamente com outros métodos já existentes. Entretanto, mais estudos são ainda necessários para elucidar como estes marcadores poderão ser usados no âmbito forense.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, Netherlands, v. 13, n. 3, p. 637–648, 1992.
- BARKSDALE, K. A. et al. Mitochondrial viability in mouse and human postmortem brain. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 3590–3599, 2010.
- BJELAKOVIC, G. et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. **Jama**, [s. l.], v. 297, n. 8, p. 842–857, 2007.
- 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>.
- DE MELLO, J. E. et al. Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with amnesia. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 1261–1272, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01175-w>.

- DOS SANTOS, A. *et al.* Thiazolidin-4-one prevents against memory deficits, increase in phosphorylated tau protein, oxidative damage and cholinergic dysfunction in Alzheimer disease model: Comparison with donepezil drug. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 193, n. 2022, p. 1–10, 2023.
- 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.
- KOWALSKA, K.; MILNEROWICZ, H. The Influence of Age and Gender on the Pro/Antioxidant Status in Young Healthy People. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, vo. 46, n. 5, 2016.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.
- NAIA, M. J. T. Determinação do Intervalo Postmortem através do decréscimo de citrato e DNA em ossos: Influência das condições tropicais. [s. l.], p. 80, 2014.
- PEYRON, P.-A. *et al.* Tau protein in cerebrospinal fluid: a novel biomarker of the time of death?. **International Journal of Legal Medicine**, Germany, v. 135, n. 5, p. 2081–2089, 2021.
- PITTNER, S. *et al.* A standard protocol for the analysis of postmortem muscle protein degradation: process optimization and considerations for the application in forensic PMI estimation. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 136, n. 6, p. 1913–1923, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02849-3>.
- SANGWAN, A. *et al.* Role of molecular techniques in PMI estimation: An update. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, [s. l.], v. 83, 2021.
- TARONE, A. M.; SANFORD, M. R. Is PMI the hypothesis or the null hypothesis?. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 1109–1115, 2017.