

ATIVIDADE DAS ENZIMAS Ca^{2+} -ATPASE E Na^+/K^+ -ATPASE EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS EM DIFERENTES INTERVALOS PÓS-MORTE

KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE¹; ANITA AVILA DE SOUZA²;
RAPHAELA CASSOL PICCOLI³; SOLANGE VEGA CUSTÓDIO⁴; MAYARA
SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR⁵; 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 - mspereirasoares@gmail.com*

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

1. INTRODUÇÃO

A estimativa do intervalo pós-morte (IPM) é crucial para a reconstrução de eventos e a validação de evidências criminais, no entanto é um dos maiores desafios da medicina legal. Os métodos clássicos, como o *algor mortis*, *rigor mortis* e *livor mortis*, possuem aplicabilidade limitada devido à sua alta sensibilidade a variáveis ambientais e fisiológicas (NAIA, 2014). Para superar essa limitação, a ciência forense tem focado na busca por biomarcadores mais objetivos e menos suscetíveis a fatores externos. Uma abordagem promissora explora a cascata previsível de degradação celular que se inicia após a morte, quando a falência do metabolismo energético e dos sistemas de regulação iônica causa o comprometimento estrutural das células (DONALDSON; LAMONT, 2014).

Nesse contexto, as enzimas Ca^{2+} -ATPase e a Na^+/K^+ -ATPase destacam-se como possíveis biomarcadores, uma vez que são essenciais para a manutenção da homeostase iônica e da integridade celular. A progressiva perda da atividade dessas enzimas após a cessação do suprimento de ATP pode contribuir para a estimativa do tempo de morte(CAMPOS, 2014). No entanto, a aplicação prática desses marcadores requer a consideração de fatores biológicos individuais, como idade e sexo, que podem influenciar o ritmo fisiológico da degradação enzimática e, consequentemente, a precisão do método.

Diante desse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da Ca^{2+} -ATPase e Na^+/K^+ -ATPase em tecido cerebral de ratos machos e fêmeas em diferentes IPM. Espera-se que os resultados contribuam para o desenvolvimento de um modelo mais preciso e robusto, fortalecendo a base científica da perícia forense.

2. METODOLOGIA

Neste estudo, foram utilizados 60 ratos (30 machos e 30 fêmeas) distribuídos igualmente em dois grupos etários (1 e 3 meses), conforme protocolo aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA 038617/2021-99). Após a eutanásia, os animais foram mantidos a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e divididos em cinco grupos temporais ($n=5$ animais/grupo) de acordo com o IPM: 0h (controle), 6h, 12h, 24h e 48h. Após esses períodos o córtex cerebral foi coletado e armazenado a -80°C para as análises da atividade da Ca^{2+} -ATPase e Na^+/K^+ -ATPase conforme descrito por Chan *et al.* (1986) e Wyse *et al.* (2004). Os resultados foram expressos em nmol Pi liberado por min por mg de proteína. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, com $p<0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade enzimática da Ca^{2+} - ATPase e da Na^+/K^+ - ATPase no córtex cerebral de ratos apresentou variações significativas em função do sexo, da idade e do IPM. No caso da Ca^{2+} -ATPase, observou-se que, em fêmeas com 1 mês de idade, ocorreu um aumento significativo apenas com IPM de 24 horas quando comparado ao grupo controle (0 IPM). Por outro lado, nas fêmeas com 3 meses, esse aumento foi observado no IPM de 12, 24 e 48 horas quando comparado ao grupo controle (Tabela 1). Em machos com 1 mês de idade a atividade da Ca^{2+} -ATPase foi aumentada no IPM de 6 e 12 horas seguido por um declínio significativo no IPM de 24 e 48 horas. Nos animais machos com 3 meses ocorreu uma diminuição significativa na atividade desta enzima no IPM de 12, 24 e 48 horas (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade enzimática da Ca^{2+} -ATPase em córtex cerebral de ratos machos e fêmeas de diferentes idades.

| Sexo | Idade | Intervalo post-mortem (IPM) | | | | |
|--------|---------|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | 0 IPM | 6 IPM | 12 IPM | 24 IPM | 48 IPM |
| Fêmeas | 1 mês | 22,61 \pm 0,54 | 23,01 \pm 1,22 | 29,67 \pm 3,23 | 41,88 \pm 9,27**** | 26,25 \pm 4,52 |
| | 3 meses | 14,25 \pm 2,80 | 20,06 \pm 3,40 | 22,27 \pm 1,10** | 25,28 \pm 3,94*** | 20,90 \pm 3,41* |
| Machos | 1 mês | 27,14 \pm 2,53 | 37,92 \pm 2,02**** | 38,89 \pm 2,80**** | 15,69 \pm 1,42**** | 13,15 \pm 2,99**** |
| | 3 meses | 49,26 \pm 2,06 | 52,93 \pm 9,60 | 32,55 \pm 3,82** | 36,58 \pm 6,15* | 38,24 \pm 6,49* |

Valores expressos em média \pm desvio-padrão * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ e **** $P<0,0001$ denotam diferença significativa em relação ao grupo controle (hpm)

A atividade da Na^+/K^+ -ATPase no córtex cerebral de fêmeas com 1 mês de idade apresentou aumento apenas no IPM de 48 horas, enquanto em fêmeas com 3 meses esse aumento foi observado no IPM de 6, 24 e 48 horas. Nos machos de 1 mês de idade observou - se um aumento significativo apenas no IPM de 24 horas, já

nos animais de 3 meses o aumento na atividade desta enzima ocorreu no IPM de 6, 12 e 24hpm. Esses resultados evidenciam padrões distintos e complexos de resposta enzimática, que são específicos para cada enzima e variam significativamente entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade enzimática da Na⁺/K⁺-ATPase em córtex cerebral de ratos machos e fêmeas de diferentes idades

| Sexo | Idade | Intervalo post-mortem (IPM) | | | | |
|--------|---------|-----------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| | | 0 IPM | 6 IPM | 12 IPM | 24 IPM | 48 IPM |
| Fêmeas | 1 mês | 4,93 ± 0,58 | 4,81 ± 1,03 | 5,79 ± 0,66 | 4,35 ± 0,33 | 6,372 ± 0,45* |
| | 3 meses | 1,26 ± 0,46 | 4,05 ± 0,34* | 2,69 ± 0,67 | 6,22 ± 1,48**** | 10,56 ± 1,37**** |
| Machos | 1 mês | 4,58 ± 0,75 | 5,02 ± 0,92 | 5,67 ± 0,63 | 7,87 ± 1,02**** | 5,17 ± 0,65 |
| | 3 meses | 9,82 ± 0,36 | 15,09 ± 1,96**** | 16,62 ± 0,56**** | 13,39 ± 1,84** | 9,21 ± 1,38 |

Valores expressos em média ± desvio-padrão *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001 denotam diferença significativa em relação ao grupo controle (hpm)

O tecido cerebral tem se mostrado um material de grande relevância para a investigação forense, uma vez que concentra neurotransmissores, enzimas e outras moléculas biologicamente ativas capazes de refletir o estado fisiológico do indivíduo no momento da morte, fornecendo pistas valiosas sobre o IPM (NUSAIR *et al.*, 2022). Além disso, a relativa proteção conferida pelo crânio e a menor suscetibilidade do cérebro à autólise, quando comparado a outros órgãos, contribuem para a preservação de biomarcadores cruciais (ROHRIG; HICKS, 2015).

Nossos resultados demonstraram alterações na atividade das enzimas Ca²⁺-ATPase e a Na⁺/K⁺-ATPase no córtex cerebral de ratos em diferentes IPM. Estes achados estão em consonância com o modelo de morte celular necrótica, que descreve uma cascata de eventos iniciada pela depleção de ATP (DA FONSECA *et al.*, 2019). Estudos prévios relatam que a primeira etapa da necrose é a falha bioenergética (KRAMER; MYERS, 2013). A Na⁺/K⁺-ATPase, essencial para a manutenção do equilíbrio iônico, perde sua funcionalidade com o tempo, ocasionando influxo de sódio e água para o interior celular promovendo edema (TRUMP *et al.*, 1997). Em paralelo, a Ca²⁺-ATPase, responsável por remover o cálcio citosólico, também sofre comprometimento. Embora haja um aumento inicial da atividade dessa enzima como mecanismo compensatório, a contínua sobrecarga de cálcio ultrapassa sua capacidade de regulação. O excesso de cálcio intracelular, por sua vez, atua como “segundo mensageiro da morte”, ativando enzimas que aceleram a degradação celular (KRASSNER *et al.*, 2023).

Nossos resultados indicam que a inativação progressiva da Na⁺/K⁺-ATPase e a consequente perda do controle da homeostase do cálcio no IPM configuram eventos

iniciais da cascata necrótica. Nesse contexto, o cérebro se mostra um tecido estratégico para a estimativa do IPM, dado seu potencial em preservar informações metabólicas pós-morte e sua aplicabilidade em cenários forenses complexos.

4. CONCLUSÕES

O IPM altera a atividade das enzimas Ca^{2+} -ATPase e Na^+/K^+ -ATPase em córtex cerebral. Os resultados ressaltam ainda que idade e sexo biológico são variáveis cruciais que devem ser consideradas na avaliação de biomarcadores para a estimativa do IPM. A Ca^{2+} -ATPase parece atuar como um marcador de resposta inicial à morte celular e à falência energética, enquanto a Na^+/K^+ -ATPase pode indicar processos de degradação mais tardios. A combinação da análise de ambas as enzimas, levando em conta as particularidades de cada grupo (idade e sexo), pode fornecer uma ferramenta mais precisa e robusta para a ciência forense, com potencial para refinar a precisão da estimativa do IPM e auxiliar em investigações criminais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, C. M. O. Estimating the post mortem interval by clinical chemistry. [s. l.], p. 70, 2014.
- CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 157, n. 2, p. 375–380, 1986.
- 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>.
- DONALDSON, A. E.; LAMONT, I. L. Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. **Australian Journal of Forensic Sciences**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 8–26, 2014.
- KRAMER, E. M.; MYERS, D. R. Osmosis is not driven by water dilution. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 195–197, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.12.001>.
- KRASSNER, M. M. et al. Postmortem changes in brain cell structure: a review. **Free Neuropathology**, [s. l.], v. 4, p. 1–53, 2023.
- 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.
- NUSAIR, S. D. et al. Postmortem sampling time effect on toxicity biomarkers in rats exposed to an acute lethal methomyl dose. **Toxicology reports**, Ireland, v. 9, p. 1674–1680, 2022.
- ROHRIG, T. P.; HICKS, C. A. Brain tissue: a viable postmortem toxicological specimen. **Journal of analytical toxicology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 137–139, 2015.
- TRUMP, B. E. et al. Pathways Oncosis , Apoptosis , and Necrosis. **Toxicologic pathology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 82–88, 1997.