

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

KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE<sup>1</sup>; ANITA AVILA DE SOUZA<sup>2</sup>;  
RAPHAELA CASSOL PICCOLI<sup>3</sup>; SOLANGE VEGA CUSTÓDIO<sup>4</sup>; MAYARA  
SANDRIELLY SOARES DE AGUIAR<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - kelenqf@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - anita\_a\_avila@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - raphaelacassol@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - solangevegacustodio@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - mspereirasoes@gmail.com

<sup>6</sup>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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e a  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -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  $-80^\circ\text{C}$  para as análises da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral de ratos apresentou variações significativas em função do sexo, da idade e do IPM. No caso da  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase foi aumentada no IPM de 6 e 12 horas seguido por um declínio significativo no IPM de 24 e 4 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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
Femêas	1 mês	4,93 $\pm$ 0,58	4,81 $\pm$ 1,03	5,79 $\pm$ 0,66	4,35 $\pm$ 0,33	6,372 $\pm$ 0,45*
	3 meses	1,26 $\pm$ 0,46	4,05 $\pm$ 0,34*	2,69 $\pm$ 0,67	6,22 $\pm$ 1,48****	10,56 $\pm$ 1,37****
Machos	1 mês	4,58 $\pm$ 0,75	5,02 $\pm$ 0,92	5,67 $\pm$ 0,63	7,87 $\pm$ 1,02****	5,17 $\pm$ 0,65
	3 meses	9,82 $\pm$ 0,36	15,09 $\pm$ 1,96****	16,62 $\pm$ 0,56****	13,39 $\pm$ 1,84**	9,21 $\pm$ 1,38

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)

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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase parece atuar como um marcador de resposta inicial à morte celular e à falência energética, enquanto a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 157, n. 2, p. 375–380, 1986.
- DA FONSECA, C. A. R. *et al.*  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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.