

Ana Sofia Monteiro Tomé

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS *POST MORTEM* NO FÍGADO POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2017



Universidade de Coimbra

Ana Sofia Monteiro Tomé

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS *POST MORTEM* NO FÍGADO POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Professor Doutor Rui Manuel Pontes Meireles Ferreira de Brito

Setembro 2017

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Após terminar este projeto gostaria de agradecer a todas as pessoas que tornaram possível a sua realização e que ajudaram a ultrapassar todos os obstáculos que surgiram ao longo deste ano de trabalho.

Ao meu orientador, Professor Doutor António Cabrita, pela oportunidade de realizar uma parte deste projeto no Laboratório de Patologia Experimental e por toda a orientação.

Ao meu Co-orientador, Professor Doutor Rui Brito, pela orientação, dedicação e por todo o apoio disponibilizado no decorrer deste trabalho.

Ao Mestre Pedro Cruz, gostaria de agradecer a sua disponibilidade, o seu auxílio e todos os conselhos prestados.

À Doutora Cândida Silva, pelo tempo disponibilizado e toda a ajuda com a análise estatística.

Às pessoas que trabalham no Laboratório de Patologia Experimental presto um agradecimento especial por todo o apoio e amizade, nomeadamente ao Mestre Eduardo Costa pela sua disponibilidade e auxílio, à Dra. Catarina Talina por todo o auxílio, tempo e ensinamentos prestados e à Mestre Dra. Ana Rute Duarte por toda a ajuda com os animais.

Agradeço também ao Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina pela disponibilidade em armazenar as minhas amostras, particularmente à Adriana Carvalho e Beatriz Almeida pela sugestão e por todo o apoio e amizade.

Aos meus amigos, Inês, Adriana Mamede, Maria Inês, Ana Rita, André, Hugo, Filipe, Joana, Sara, Cátia e Mélanie por estarem sempre disponíveis em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, sempre prontos a dar apoio e conselhos.

Às minhas amigas da Guarda, Jéssica e Diana, por todo o apoio e saídas ao fim de semana nos últimos 8 anos.

Finalmente, um agradecimento especial aos meus pais e ao resto da minha família por estarem sempre presentes e pelo apoio e motivação essencial para terminar este projeto.

Índice

Lista de Figuras	i	ii
Lista de Tabelas		v
Abreviaturas	V	ii
Resumo	i	X
Abstract	,	ĸi
1. Introdução		1
1.1. Autópsia	as médico-legais	3
1.2. Intervalo	post mortem	4
1.2.1. Fenón	nenos post mortem	5
1.2.2. Métod	dos convencionais para a determinação do intervalo post mortem	6
1.2.3. Métod	dos bioquímicos para a determinação do intervalo post mortem	9
1.3. Metabol	ómica	9
1.3.1. Métod	dos de análise1	0
1.3.2. Abord	agem estatística para a análise de dados1	1
1.3.3. Aplica	ções da metabolómica1	2
1.4. Espectro	scopia de Ressonância Magnética Nuclear1	4
1.4.1. RMN (de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico1	5
1.5. Fígado		6
1.5.1. Funçõ	es1	7
1.6. Objetivo		8
2. Materiais e m	nétodos1	9
2.1. Recolha	das amostras2	1
2.2. Análise p	oor HR-MAS NMR2	3
2.3. Processa	amento dos espectros obtidos e PCA2	5
2.4. Identifica	ação de metabolitos2	5
3. Resultados e	discussão2	7
3.1. Alteraçõ	es post mortem visíveis	9
3.2. Espectro	scopia HR-MAS NMR	0
3.3. Análise d	de Componentes Principais3	6
3.4. Possíveis	s biomarcadores post mortem5	9
4. Conclusão		3
5. Bibliografia		7
6. Apêndice	7	5

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Etapas envolvidas numa análise de um perfil metabólico	10
Figura 1.2 - Ilustração da rotação segundo o ângulo mágico	13
Figura 1.3 - Diferenças anatómicas entre fígado de murganho e humano	15
Figura 2.1 - Animal 1, espécie Mus Musculus, antes da necrópsia	21
Figura 2.2 - Dermótomo biopsy punch de 3 mm	22
Figura 2.3 - Animal 1 em decúbito dorsal com as vísceras expostas	22
Figura 2.4 - Preparação da amostra de fígado relativo ao animal 1	24
Figura 2.5 - Rotor $7rO_2$ de 4 mm à esquerda e ferramentas para a preparação do rotor à direita	24
Figura 3.1 - Registo fotográfico do animal 1 imediatamente após a necrópsia (0h), 24, 48 e 72	
horas depois	30
Figura 3.2 - Espectro CPMG RMN ¹ H (a 500 MHz) da amostra 1 recolhida a tempo zero (0h) após	
a morte do animal, com indicação das atribuições de sinais	31
Figura 3.3 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹ H (a 500 MHz) da amostra 1 recolhida a tempo	
zero (0h) após a morte do animal	33
Figura 3.4 – Estrutura química do lactato (A), da alanina (B) e do acetato (C)	33
Figura 3.5 – Espectros CPMG RMN ¹ H (a 500 MHz) relativos à amostra 9 para os diferentes	
intervalos post mortem	35
Figura 3.6 – Comparação dos espectros CPMG RMN ¹ H (a 500 MHz) relativos à amostra 6	
(fêmea) e à amostra 9 (macho) recolhidas a 0h e 24h após a morte do animal	36
Figura 3.7 – Score plot relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h e 24h em	38
murganhos machos	
Figura 3.8 – Scree plot relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h e 24h em	20
murganhos machos	39
Figura 3.9 – Teste de diagnostico de <i>outilers</i> baseado na distancia score relativo a comparação	20
Figure 2.10 Correct plots relatives à comparação des intervalos post mortem Ob a 24b em	39
murganhos machos anós a anlicação do PCA denois da eliminação do <i>outlier</i>	40
Figura 3.11 – Logding plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos nost mortem Ωh e	40
24h em murganhos machos	41
Figura 3.12 - <i>Scores plots</i> relativos à comparação dos intervalos <i>post mortem</i> 0h e 24h em	
murganhos fêmeas após a aplicação do PCA e verificação de <i>outliers</i>	42
Figura 3.13 - Loading plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos post mortem Oh e	
24h em murganhos fêmeas	43
Figura 3.14 - Scores plots relativos à comparação dos intervalos post mortem 24h, 48h e 72h em	
murganhos machos após a aplicação do PCA e eliminação de outliers	45
Figura 3.15 - Score plot relativo à comparação dos intervalos post mortem 24h, 48h e 72h em	
murganhos machos após a aplicação do PCA e verificação de <i>outliers:</i> representação 3D	
interativa	46
Figura 3.16 - Loading plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos post mortem 24h,	
48h e 72h em murganhos machos	47
Figura 3.17 - <i>Loading plot</i> do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos <i>post mortem</i> 24h,	
48h e /2h em murganhos machos	4/
Figura 3.18 - Scores plots relativos a comparação dos intervalos post mortem 24h, 48h e 72h em	40
murgannos temeas apos a aplicação do PCA e verificação de <i>outliers</i>	48

Figura 3.19 - Score plot relativo à comparação dos intervalos post mortem 24h, 48h e 72h em	
murganhos fêmeas após a aplicação do PCA e verificação de <i>outliers:</i> representação 3D	
interativa	48
Figura 3.20 - Loading plot do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos post mortem 24h,	
48h e 72h em murganhos fêmeas	49
Figura 3.21 - Loading plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos post mortem 24h,	
48h e 72h em murganhos fêmeas	49
Figura 3.22 - Scores plots relativos à comparação dos intervalos post mortem 0h, 24h e 48h após	
a aplicação do PCA e verificação de <i>outliers</i>	52
Figura 3.23 - Score plot relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h, 2h e 6h em	
murganhos machos	54
Figura 3.24 - Loading plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h,	
2h e 6h em murganhos machos	55
Figura 3.25 - Loading plot do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h,	
2h e 6h em murganhos machos	55
Figura 3.26 - Score plot relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h, 2h e 6h em	
murganhos fêmeas	56
Figura 3.27 - Loading plot do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos post mortem Oh,	
2h e 6h em murganhos fêmeas	57
Figura 3.28 - Loading plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h,	
2h e 6h em murganhos fêmeas	57
Figura 3.29 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹ H (a 500 MHz) da amostra 1, murganho macho,	
recolhida 0h, 6h, 24h e 48h após a morte, com a indicação das possíveis atribuições de sinais	
relativas aos lípidos, lactato, alanina e acetato	60
Figura 3.30 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹ H (500 MHz) da amostra 18, murganho fêmea,	
recolhida 0h, 6h, 24h e 48h após a morte, com a indicação das atribuições de sinais relativas aos	
lípidos, lactato, alanina e acetato	60
Figura 3.31 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹ H (a 500 MHz) da amostra 1, murganho macho,	
recolhida 0h, 6h, 24h e 48h após a morte, com indicação das atribuições de sinais relativos à	
glucose e glicogénio	62

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Exemplo da folha de registo onde foram anotados os tempos de recolha dosfragmentos, o sexo e o peso do animal	23
Tabela 3.1 - Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 0h e 24h com os respetivos valores de loading para cada componente principal	44
Tabela 3.2 - Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 24h, 48h e 72hcom os respetivos valores de loading para cada componente principal	50
Tabela 3.3 – Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 0h, 24h e 48h com os respetivos valores de <i>loading</i> para cada componente principal	53
Tabela 3.4 - Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 0h, 2h e 6h com os respetivos valores de loading para cada componente principal.	58

Abreviaturas

- 2D Duas dimensões
- **3D** Três dimensões
- ATP Adenosina trifosfato
 - **CE** Eletroforese capilar (do inglês *capillary electrophoresis*)
- **CPMG** Carr-Purcell-Meiboom-Gill
 - Da Dalton
 - FID Decaimento de indução livre (do inglês free induction decay)
 - **FTIR** Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*)
 - GC Cromatografia gasosa (do inglês Gas chromatography)
- GC-MS Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês Gas chromatography–mass spectrometry)
 h Horas
- HR-MAS NMR Ressonância Magnética Nuclear de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico (do inglês *High resolution-Magic Angle Spinning*

Nuclear Magnetic Resonance)

- **LC** Cromatografia líquida (do inglês *liquid chromatography*)
- **LC-MS** Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês Liquid chromatography–mass spectrometry)
 - MS Espectrometria de massa (do inglês mass spectrometry)
 - PBS Tampão fosfato salino (do inglês phosphate buffered saline)
 - PC1 Primeira componente principal (do inglês first principal component)
 - PC2 Segunda componente principal (do inglês second principal component)
 - PC3 Terceira componente principal (do inglês third principal component)
 - PCA Análise de componentes principais (do inglês Principal Component Analysis)
 - PCs Componentes principais (do inglês principal components)
 - ppm Partes por milhão
- **Q-TOF** Quadropolo tempo de voo (do inglês *Quadrupole time-of-flight*)
- **RMN** Ressonância magnética nuclear
- RMN¹H Ressonância magnética nuclear de protão
 - **TSP** Ácido trimetilsililpropanóico (do inglês *Trimethylsilylpropanoic acid*)
 - **UPLC** Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês *Ultra-Performance Liquid Chromatography*)

Resumo

A determinação do intervalo *post mortem* é um dos aspetos mais importantes numa investigação médico legal, tendo maior relevância em casos de homicídio, visto que possibilita a identificação ou eliminação de suspeitos. Os métodos convencionais para a determinação do tempo após a morte baseiam-se, maioritariamente, nas alterações físicas e nos fenómenos de decomposição do cadáver. Estes são bastante afetados tanto pelas condições internas como externas, o que faz com que a probabilidade de ocorrerem erros na estimativa do intervalo *post mortem* seja muito elevada. No entanto, a morte resulta também em alterações metabólicas nos tecidos do cadáver. O estudo destas alterações poderá levar à identificação de novos biomarcadores para uma estimativa mais precisa da hora da morte.

No presente estudo, foram recolhidas amostras de fígado de 20 murganhos, 10 machos e 10 fêmeas, da espécie *Mus Musculus*, imediatamente após a morte e 2, 6, 24, 48 e 72 horas depois, com o objetivo de analisar as alterações metabólicas e identificar possíveis biomarcardores úteis na determinação do intervalo *post mortem*, usando HR-MAS NMR. Foram obtidos 6 espectros de RMN por fígado de murganho, um por cada tempo de recolha de amostra, tendo-se obtido uma grande quantidade de dados, os quais foram todos processados e submetidos a uma análise estatística multivariada.

Os resultados da Análise de Componentes Principais (PCA) permitiram verificar diferenças significativas entre os perfis metabólicos relativos a amostras recolhidas 0, 6, 24 e 48 horas após a morte nos dois sexos, tendo-se observado alterações a nível dos lípidos, do lactato e da glucose. A partir da análise dos espectros, observou-se um aumento da concentração do lactato e glucose com o tempo após a morte, indicando, assim, que estes metabolitos apresentam ser biomarcadores *post mortem* promissores. Estes resultados mostraram que uma análise metabolómica de tecidos biológicos através de espectroscopia de HR-MAS NMR é uma abordagem promissora para a determinação do intervalo *post mortem* de um modo mais preciso.

Abstract

The estimation of the post mortem interval is an important task in a medico-legal investigation. This determination is crucial in homicide cases, since it can lead to the identification or elimination of a suspect. The conventional methods that are used for determining time since death are mostly based on physical changes and decomposition artefacts of the corpses. These changes are extremely affected by both internal and external conditions and thus the chance of producing erroneous results is high. However, death also results in metabolic changes in the tissues of the deceased. The study of these changes could lead to the identification of new biomarkers for a more accurate estimation of the post mortem interval.

In the present study, liver samples of twenty mice (*Mus musculus*), ten males and ten females, were collected immediately after death and 2, 6, 24, 48 and 72 hours after death. The aim was to analyse the metabolic changes by HR-MAS NMR spectroscopy and identifying potential post mortem interval biomarkers. Six NMR spectra were obtained per mouse liver, one per each time of sample collection, as such, a large amount of data was obtained. All spectral data were processed and subjected to a multivariate statistical analysis.

The results of principal component analysis (PCA) allowed to verify significant differences between the metabolic profiles of samples collected at 0, 6, 24 and 48 hours after death in both sexes. It was possible to observe changes of lipids, lactate and glucose. From the analysis of the spectra, was possible to identify an increase in lactate and glucose levels over time, after death, exposing these metabolites as potential post mortem biomarkers. The presented results showed that a metabolic analysis of biological tissues by HR-MAS NMR spectroscopy is a potential valid approach for a more precisely estimation of post mortem interval.

xi

1. Introdução

1.1. Autópsias médico-legais

Todos os anos ocorrem milhões de mortes e cada uma destas tem de ser verificada e certificada. Em Portugal, em casos de morte com causa natural, que na maioria dos casos resulta de doenças diagnosticadas que evoluem ou agudizam, segundo o artigo 14º da Lei n.º 45/2004, de 19 de agosto, é da competência do médico a verificação e certificação do óbito. Em situações de morte violenta ou de suspeita de morte violenta, como por exemplo acidentes de viação, acidentes de trabalho, homicídios, suicídios, assim como em situações de morte por causa ignorada, é necessário outro método de investigação e certificação do óbito. Nestes casos, a investigação tem de tentar responder sempre a quatro questões essenciais: quem é a vítima e quando, onde e como morreu. Deste modo, quando um óbito é verificado fora das instituições de saúde, segundo o artigo 16º da Lei n.º 45/2004, de 19 de agosto, a autoridade policial deve inspecionar e preservar o local e comunicar o facto à autoridade judiciária competente e deve providenciar a comparência do perito médico da delegação do instituto ou do gabinete médicolegal ao serviço. A verificação do óbito é realizada pelo delegado de saúde, sendo depois realizada a autópsia médico-legal, por ordem do Ministério Público. O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses é o responsável pela realização das autópsias médico-legais, que têm como objetivo esclarecer as questões referidas anteriormente. Também é responsável por determinar a etiologia, ou seja, estabelece o diagnóstico diferencial entre morte natural, acidente, homicídio e suicídio. [1–3] Uma autópsia, também designada por necrópsia, embora este termo seja mais utilizado para animais, ou exame post mortem, pode ser realizada por dois motivos: interesse clínico ou por objetivos médico-legais. As autópsias clínicas são realizadas nos hospitais com o consentimento da família e têm como objetivo clarificar o diagnóstico e causa de morte do paciente que estava a ser tratado. Segundo o artigo 18º da Lei n.º 45/2004, de 19 de agosto, a autópsia médico-legal tem lugar em situações de morte violenta ou de causa ignorada, como foi referido anteriormente, e apenas tem possibilidade de dispensa se existirem informações clínicas suficientes que associadas aos demais elementos permitam concluir, com segurança, a inexistência de suspeita de crime. As autópsias são sempre executadas sob a supervisão de uma autoridade legal. O Instituto Nacional de Medicina Legal, por vezes, também lida com mortes naturais que deviam ser analisadas por uma autópsia clínica. Mortes suspeitas e súbitas, mortes sem assistência médica e mortes que são litigiosas ou relacionadas com procedimentos cirúrgicos ou anestésicos também devem ser clarificadas por uma autópsia médico-legal. Não é necessária a permissão dos familiares, uma vez que o objetivo da investigação legal não seria cumprido se as objeções de possíveis culpados pudessem impedir a autópsia. [1, 4, 5]

Embora o desempenho de uma autópsia médico-legal seja bastante uniforme e independente da natureza da morte, há uma série de questões associadas que variam de acordo com as circunstâncias. Por exemplo, as precauções processuais requeridas num homicídio não são necessárias num caso de morte súbita. No entanto, há muitas facetas da autópsia que são comuns a todas as mortes. Os principais objetivos de uma autópsia são os seguintes: identificação da vítima; avaliação do tamanho e nutrição do corpo; determinar a causa da morte; determinar o tempo após a morte; atribuir a morte a um evento particular; documentar todas as lesões do hábito externo e interno do corpo; detetar anormalidades, malformações externas, internas e doenças; recolher amostras para análise histológica, toxicológica, microbiológica ou outras análises necessárias; recolher órgãos ou tecidos relevantes como provas; obtenção de fotografias ou vídeos com a finalidade de serem usados como provas; realizar um relatório completo escrito do que foi encontrado na autópsia, fornecendo uma interpretação médico-legal séria e competente e, por fim, devolver o corpo à família nas melhores condições possíveis. [4, 5]

Quando uma autópsia médico-legal é executada num corpo já identificado, é possível estabelecer uma categorização de objetivos. Para começar é necessário diagnosticar a causa da morte e perceber se foi uma morte violenta ou natural. Se o caso corresponder a uma morte violenta, surgem três possibilidades: lesões traumáticas, asfixia ou intoxicação. Depois de toda a análise ao corpo, o último passo é estabelecer a etiologia, ou seja, clarificar se a morte ocorreu devido a homicídio, suicídio ou acidente. Há uma variável bastante importante nestas determinações, a hora da morte, sendo necessário estimar o tempo que ocorreu após a morte até o corpo ser encontrado. [5]

1.2. Intervalo post mortem

Um dos objetivos cruciais numa autópsia médico-legal é a determinação do tempo após a morte, como foi referido anteriormente. Este, que também pode ser designado por intervalo *post mortem*, é uma das determinações mais importantes numa investigação, visto que auxilia na identificação da causa da morte e na sua etiologia. Para além de estabelecer há quanto tempo uma pessoa está morta, também ajuda a distinguir alterações *ante mortem* das *post mortem*. Tem relevância especial em casos de homicídios, uma vez que auxilia a identificação ou eliminação de suspeitos. Um intervalo *post mortem* preciso ajuda a verificar as declarações das testemunhas, a limitar o número de suspeitos, a avaliar as suas declarações e também ajuda os peritos, especialmente quando têm de recolher provas que apoiam ou negam ações declaradas pelos suspeitos. [6–9]

Para a determinação do intervalo *post mortem* normalmente recorre-se a duas fontes: testemunhas oculares e técnicas científicas baseadas nas alterações físico-químicas que ocorrem após a morte. No entanto, as declarações das testemunhas oculares são consideradas como uma prova frágil e pouco fiável, uma vez que dependem incontrolavelmente de fatores como a idade, saúde, interesses pessoais, problemas de perceção e stress da testemunha em causa. Assim, este tipo de declarações deve ser usado sempre em conjunto com outras evidências, como as provenientes de métodos científicos, que são mais exatas e precisas. [10]

1.2.1. Fenómenos post mortem

É possível afirmar que a morte não é um momento onde ocorre a cessação total e permanente das funções vitais, mas sim um processo que se arrasta ao longo do tempo. [11] Este processo, constituído por alterações físico-químicas, vai dar lugar ao aparecimento de um conjunto de fenómenos que são objeto de estudo, de interpretação e de extrema relevância na investigação criminal, os fenómenos *post mortem*. [7, 11] Para o patologista forense, estes fenómenos são de grande interesse e apresentam grande utilidade, uma vez que ocorrem de forma sequencial. Portanto, se os fenómenos *post mortem* forem bem interpretados, é possível estimar o intervalo após a morte a partir destes. No entanto, há fatores internos e externos que se tem de ter em consideração em determinados casos individuais, o que faz com que não seja possível atribuir uma hora exata para a ocorrência da morte, apenas um intervalo de tempo. [4, 7, 11]

Quando o coração pára e a respiração cessa, há uma queda imediata da pressão sanguínea e o fornecimento de oxigénio para as células do corpo termina. As células que têm a possibilidade de usarem a via anaeróbia irão fazê-lo até as reservas metabólicas se esgotarem e aí, todas as células do corpo deixam de ter as suas funções metabólicas normais. Com a perda da atividade neuronal, toda a atividade nervosa termina, os reflexos são perdidos, os músculos rapidamente se tornam flácidos e as alterações *post mortem* vão ficando percetíveis, possibilitando a sua interpretação. [1] Os fenómenos *post mortem* podem ser divididos em dois grandes grupos, os fenómenos abióticos, que ocorrem logo após a morte com a cessação das funções vitais, e os fenómenos transformativos, que causam modificações extensas na morfologia e na estrutura do cadáver. Os fenómenos abióticos podem ser imediatos, surgindo imediatamente após a morte (paragem cardiorrespiratória, imobilidade do cadáver, abolição da

motilidade e tónus muscular, ausência de circulação, dilatação pupilar, abertura das pálpebras e da boca, relaxamento esfincteriano, perda de consciência e de sensibilidade); ou podem ser tardios, os quais são de extrema importância para a determinação do intervalo *post mortem* (*algor mortis, rigor mortis, livor mortis*). Os fenómenos transformativos, tal como o nome indica, são responsáveis pelas transformações da morfologia e estrutura mais profundas e duradouras no cadáver e são causadas por uma intensa proliferação bacteriana. Estes podem ser mais destrutivos, causando a decomposição da matéria orgânica (autólise e putrefação) ou mais conservativos, causando uma transformação anormal no corpo conforme as condições ambientais a que está sujeito (saponificação, mumificação e corificação). [11]

1.2.2. Métodos convencionais para a determinação do intervalo post mortem

A interpretação dos fenómenos *post mortem*, avaliando em que fase se encontra o cadáver, vai permitir estimar o tempo que ocorreu depois da morte deste. Este tipo de avaliação baseia-se nas alterações físicas como o *algor mortis*, *rigor mortis*, *livor mortis* e fenómenos de decomposição, autólise e putrefação, que irão ser descritos de seguida. [9, 10]

• Algor mortis

Algor mortis refere-se ao arrefecimento do corpo após a morte. Este é um dos indicadores usados para estimar o intervalo post mortem durante as primeiras 24 horas após a morte. Durante a vida há um equilíbrio entre o calor produzido e o calor libertado, mas depois da morte deixa de ocorrer produção de calor, fazendo com que o calor do corpo seja libertado para o ambiente e a temperatura se iguale à do meio. Esta taxa de arrefecimento pode ser representada em função do tempo por uma curva sigmoide. Inicialmente a temperatura corporal mantém-se constante, geralmente entre 30 a 60 minutos, devido à produção de calor metabólico não terminar uniformemente, principalmente nos músculos e no fígado. Após este plateau a taxa torna-se linear e decresce lentamente até se atingir o equilíbrio com o meio envolvente. A medição da temperatura corporal do cadáver é geralmente realizada no recto, oralmente ou no fígado após a incisão no abdómen, sendo a temperatura rectal a mais usada. Todavia, a taxa de decréscimo da temperatura é muito variável, uma vez que é influenciável por muitos fatores, como o tamanho do corpo, a quantidade de tecido adiposo subcutâneo, a existência de roupas, condições ante mortem como por exemplo febre ou presença de toxinas ou drogas, a postura, correntes de ar e humidade e, como seria de esperar, a temperatura do meio ambiente. [4, 9, 10, 12]

Rigor mortis

Rigor mortis é uma alteração físico-química que causa o endurecimento do corpo após a morte devido à falta de oxigénio. Antes da morte, quando o músculo é estimulado, há a libertação de iões cálcio do retículo sarcoplasmático, permitindo que a actina se ligue à miosina, contraindo o músculo. Quando a estimulação pára, os iões cálcio são transportados de novo para o retículo sarcoplasmático, por transporte ativo. Este transporte ativo necessita de adenosina trifosfato (ATP) que é produzida a partir da fosforilação oxidativa. Após a morte, não havendo oxigénio, não há produção de ATP, o que faz com que os iões cálcio não sejam transportados de volta para o retículo sarcoplasmático. Deste modo, os iões acumulam-se no tecido muscular causando a ligação contínua entre a actina e a miosina, resultando na contração do tecido muscular. O desenvolvimento do *rigor mortis* inicia-se só a partir das 2 a 4 horas a partir da morte, uma vez que ainda existe ATP suficiente para impedir a contração dos músculos. O corpo fica completamente rígido entre as 6 e 12 horas e o endurecimento começa a extinguir-se aproximadamente 72 horas após a morte como resultado da perda de função das células devido à decomposição. Há diversos fatores que interferem com o início e duração do *rigor mortis*, como a temperatura ambiente, patologias, idade, massa muscular e presença de infeções. [1, 9, 10, 12]

• Livor mortis

Livor mortis ou lividez cadavérica pode ser descrito como a acumulação do sangue na parte inferior do corpo resultando numa coloração avermelhada, roxa-azulada da pele. Como o coração deixa de bombear sangue após a morte, os eritrócitos afundam pela ação da gravidade, causando esta coloração. No entanto, nas áreas do corpo pressionadas contra uma superfície dura, os vasos sanguíneos ficam mecanicamente compressos e o sangue não se consegue instalar, o que resulta num aspeto pálido. O *livor mortis* desenvolve-se em todos os cadáveres sob a influência da gravidade porque o sangue mantém-se líquido em vez de coagular através dos vasos sanguíneos. Após 30 a 60 minutos depois da morte o sangue torna-se permanentemente incoagulável, fazendo com que este fenómeno *post mortem* fique evidente, atingindo a máxima evidência entre as 8 e 12h após a morte. Há um número de variáveis que pode influenciar a lividez cadavérica, nomeadamente a pressão do vestuário ou de outros objetos pode evitar o aparecimento do livor nas áreas dependente destes, assim como o movimento do corpo após a morte. Compostos no sangue, como cianeto ou monóxido de carbono e temperaturas frias podem também alterar a cor da lividez, o que pode dificultar a sua visibilidade. [9, 10, 12, 13]

• Autólise e putrefação

Geralmente, o processo de decomposição ocorre através de dois mecanismos, autólise e putrefação. A autólise é um processo celular de autodestruição causado por enzimas hidrolíticas. O início desta é bastante variável dependendo do tipo de células e órgãos, mas regularmente começa logo depois da morte nas células que são metabolicamente ativas ou que contêm muita água e enzimas hidrolíticas. Órgãos envolvidos na produção de ATP, como o fígado e o cérebro, são mais suscetíveis às reações de autólise comparados com os outros órgãos. No funcionamento normal, as enzimas hidrolíticas estão presentes nos lisossomas e digerem hidratos de carbono e proteínas. Após a morte, deixa de ocorrer fornecimento de oxigénio para as células e para manter a atividade celular metabólica básica, as células seguem a via anaeróbia da glicólise como uma fonte de energia alternativa, produzindo dióxido de carbono e ácido láctico. Deste modo, o pH celular diminui e a membrana celular fica incapaz de manter a sua permeabilidade, resultando na rutura que é acompanhada pela libertação das enzimas hidrolíticas. Estas enzimas vão digerir estruturas celulares, que em condições normais não eram consideradas substratos, o que resulta na libertação do conteúdo celular que irá servir de fonte de nutrientes e energia para as reações subsequentes no processo da putrefação. A putrefação resulta na degradação de tecidos em gases, líquidos e sais. Este fenómeno é provocado pela atividade de microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários, que são provenientes do microbioma do corpo humano, especialmente do trato gastrointestinal. Desta forma, os primeiros sinais do processo de decomposição podem ser vistos no abdómen com uma coloração esverdeada. Este processo de decomposição depende de vários fatores como por exemplo temperatura ambiente, doenças, obesidade, envenenamento e presença de infeções. [9, 10, 12, 14]

Embora haja esta classificação dos diferentes tipos de fenómenos *post mortem*, é de salientar que estes são bastante afetados pelas condições internas e externas. Há uma diversidade de fatores que influencia o modo de resposta do corpo a cada transformação, ou seja, cada cadáver é único, assim como o local onde este se encontra, as condições ambientais a que está exposto e as circunstâncias que levaram à ocorrência do evento. Assim, a probabilidade de ocorrem erros na determinação do intervalo *post mortem* a partir destes fenómenos é bastante elevada, o que deve ser minimizado, uma vez que uma estimativa errada da hora da morte pode dificultar a identificação de um suspeito. [15] Posto isto, surgiram novas técnicas baseadas nas alterações bioquímicas em tecidos e fluídos biológicos, visto que sofrem menos alterações e contaminações. [10]

1.2.3. Métodos bioquímicos para a determinação do intervalo post mortem

Perfis bioquímicos ou metabólicos de fluídos biológicos, obtidos após a morte, vão refletir as reações que ocorreram desde o momento da morte até o funcionamento celular terminar, refletindo ainda a degradação celular e a decomposição de marcadores bioquímicos. Deste modo, estes perfis vão fornecer informação relativa à causa da morte e têm o potencial de fornecer uma estimativa do intervalo *post mortem* com a identificação e com o estudo detalhado de marcadores bioquímicos. [16, 17] O uso de marcadores bioquímicos possibilita a determinação da hora da morte de um modo mais preciso, no entanto, também se observam algumas variações devido a vários fatores como doenças pré-existentes, causa da morte, fatores ambientais e propriedades do analito sob investigação. [10]

A análise de humor vítreo é bastante utilizada na determinação do intervalo *post mortem*. Esta matriz está topograficamente isolada e bem protegida, o que faz com que as alterações autolíticas sejam mais lentas em comparação com o sangue. [4, 10] A investigação mais comum realizada no humor vítreo, neste contexto, é a determinação dos níveis de potássio. Está provado que os níveis de potássio aumentam de forma linear com o passar do tempo após a morte, o que permite a determinação do intervalo *post mortem* através da aplicação de uma fórmula matemática. [4, 10, 18]

Todavia, os métodos bioquímicos tradicionais têm sensibilidade relativamente baixa, requerem conhecimentos especializados e trabalho intensivo, o que faz com que estes não sejam completamente adotados. Atualmente, os investigadores têm identificado biomarcadores usando métodos baseados em ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS), ou seja, através da metabolómica tem sido possível obter marcadores que estimam um intervalo *post mortem* de forma mais precisa. [19]

1.3. Metabolómica

Qualquer amostra biológica (células, fluídos biológicos, tecidos e organismos), contém milhares de moléculas de baixo peso molecular (<1000 Da), que podem ser substratos, intermediários ou produtos de metabolismo. Estas moléculas são designadas por metabolitos e, por estarem envolvidas em vários processos bioquímicos, fornecem grande quantidade de informação sobre o estado e funcionamento de um sistema vivo em estudo, tanto a partir dos efeitos causados pela expressão génica, por uma doença específica ou por processos tóxicos, como a partir das diferenças do estilo de vida e dieta nos humanos ou noutros mamíferos. O

processo de análise de metabolitos em determinados sistemas sob um conjunto particular de condições, é designado por metabolómica. [20, 21]

1.3.1. Métodos de análise

A análise metabolómica compreende diferentes estratégias, as quais dependem da informação requerida do sistema em estudo. Pode ser realizada uma análise global, elaborando um perfil metabólico, ou pode ser feita uma análise mais específica direcionada a determinados metabolitos relevantes para o estudo em questão. A análise metabolómica global baseia-se na deteção, identificação e quantificação do maior número possível de metabolitos em amostras biológicas, de modo a encontrar variações que podem ser usadas para discriminar amostras. Por exemplo, em amostras obtidas a partir de indivíduos saudáveis e indivíduos afetados por uma doença, o objetivo é identificar diferenças relacionadas com a doença em um ou mais metabolitos endógenos encontrados em fluídos ou tecidos biológicos. Uma análise metabolómica específica, ao contrário da global, dedica-se apenas ao estudo qualitativo e quantitativo de um metabolito ou, mais frequentemente, de um grupo específico de metabolitos. [21, 24, 25]

O metaboloma, definido como o conjunto completo de todos os metabolitos, inclui aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, peptídeos, purinas, pirimidinas, vitaminas e inúmeros metabolitos envolvidos em vias de biossíntese e biodegradação. Devido a esta complexidade, as técnicas analíticas usadas em metabolómica devem ter a capacidade de monitorizar com precisão o maior número possível de moléculas e fornecer informação estrutural a cerca de numerosas classes químicas. [21, 22, 24–26] As principais técnicas aplicadas são baseadas em espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. Esta última requer uma pré separação dos componentes metabólicos, portanto é acoplada a cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC). [21, 22, 27] O uso de eletroforese capilar (CE) acoplado a espectrometria de massa mostrou ser promissor, assim como a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em alguns casos. [28]

A espectroscopia de RMN é bastante útil na caracterização de compostos desconhecidos, o que levou a que esta técnica tenha sido das primeiras adotadas em estudos de metabolómica. Como método analítico, pode ser definido como não destrutivo, facilmente quantificável, requer pouca ou nenhuma preparação da amostra e permite a identificação de novos compostos. [23, 29] No entanto, apresenta uma desvantagem fundamental, a qual assenta no facto de ser uma técnica relativamente insensível, com um limite de deteção baixo. [23, 29, 30]

A vantagem mais importante da espectrometria de massa é a sua elevada sensibilidade e o seu elevado rendimento, o que possibilita a confirmação da identidade dos componentes presentes nas amostras biológicas. Todavia, a escolha da técnica de ionização, analisador de massa, modo de aquisição e parâmetros instrumentais é muito dependente dos objetivos experimentais e é sempre necessária preparação da amostra, o que pode levar à perda de metabolitos. [23, 25, 30]

1.3.2. Abordagem estatística para a análise de dados

A análise metabolómica de amostras biológicas resulta numa enorme quantidade de resultados que não são fáceis de processar e analisar manualmente, consumindo muito tempo. Como tal, são aplicados métodos matemáticos e estatísticos aos resultados designados por métodos quimiométricos, que irão indicar quais os metabolitos importantes a identificar, conseguindo uma discriminação de amostras por agrupamentos e, consequentemente, a identificação de biomarcadores do processo sob estudo. [21, 22, 31–33] A análise estatística multivariada engloba uma série de métodos eficientes e úteis para o estudo deste tipo de resultados complexos. Os parâmetros requeridos para a análise estatística de GC-MS ou LC-MS são o tempo de retenção, a intensidade dos sinais e a razão massa/carga. Para RMN, tanto podem ser usados os desvios químicos como a concentração dos metabolitos. [22, 34]

O método de análise estatística multivariada mais utilizado nesta área é a Análise de Componentes Principais (PCA). Este consiste num procedimento algébrico que converte as variáveis originais, tipicamente correlacionadas, num conjunto de variáveis não correlacionadas, que se designam por componentes principais, ou seja, vai tornar possível extrair e apresentar a variação sistemática dos resultados, fornecendo uma visão geral de todas as amostras. [21, 31, 34] Além disto, este método também é utilizado para determinar outliers no conjunto de dados e agrupamentos entre estes, tendo em conta as suas características. Por exemplo, num estudo metabolómico por RMN, os espectros são reduzidos a um conjunto de descritores de sinais e estes são analisados com o intuito de identificar semelhanças e diferenças entre as amostras e as variáveis. De seguida, realiza-se a identificação dos sinais relativos aos metabolitos que são responsáveis pela separação das amostras em agrupamentos e, por fim, a caracterização dos metabolitos envolvidos, os quais se podem classificar como biomarcadores do estudo em questão. [34–37] De um modo resumido, as etapas envolvidas numa análise de um perfil metabólico proveniente da espectroscopia de RMN ou MS estão representadas no esquema da Figura 1.1. Após se definir o objetivo e a recolha das amostras necessárias ao estudo, deve proceder-se à aquisição dos espectros. O pré-processamento dos resultados obtidos é um passo

muito importante, visto que este transforma os dados de modo a torná-los aptos para a posterior análise estatística, ajustando a variabilidade de cada variável, assim como a relação entre elas. [38] O PCA fornece uma visão geral do conjunto de dados, sendo possível identificar agrupamentos e *outliers*. Também permite ainda identificar quais os sinais relativos aos metabolitos que são responsáveis pelos agrupamentos obtidos. De seguida, deve proceder-se à identificação e caracterização dos metabolitos em questão, recorrendo a bases de dados.



Figura 1.1 - Etapas envolvidas numa análise de um perfil metabólico.

1.3.3. Aplicações da metabolómica

Os recentes avanços da tecnologia usada em estudos de metabolómica levaram a um aumento do número de aplicações deste tipo de estudos em diversas áreas, como a saúde humana e animal, diagnóstico de doenças, descoberta de biomarcadores, desenvolvimento de fármacos, biologia vegetal, microbiologia e química alimentar. A diversidade de aplicações advém do facto de ser possível analisar uma ampla variedade de substratos, incluindo sólidos, líquidos e ainda gases. [21, 27, 39]

Estudos de metabolómica baseados em ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa são bastante usados atualmente em estudos pré-clínicos de candidatos a fármacos. Várias empresas farmacêuticas já adotaram a metabolómica nos seus

protocolos de desenvolvimento de fármacos com o intuito de analisar, a nível bioquímico, as consequências da ação destes, facilitando assim, a avaliação dos efeitos adversos. [21]

Há diversos estudos onde aplicam a metabolómica na identificação de diferenças no metabolismo, causadas por uma série de fatores internos e externos, em vários animais experimentais, como ratos e murganhos. Estas diferenças podem ajudar a explicar as diferenças na toxicidade de xenobióticos entre estirpes e mesmo entre animais diferentes. Ainda é de salientar que a metabolómica baseada em estudos de RMN tem provado que é capaz de determinar qual o órgão afetado após a administração de compostos tóxicos, devido a diferentes toxinas darem origem a padrões diferentes nos espectros de RMN. [21, 40]

A nível de diagnóstico de doenças em humanos, há vários exemplos na literatura do uso de espectroscopia de RMN em estudos de metabolómica, como a utilização do plasma para estudo de diabetes, do fluído cérebro-espinhal na investigação da doença de Alzheimer, do fluído seminal no estudo da infertilidade masculina e da urina para a investigação de sobredosagem por drogas, transplante renal e várias doenças renais. [21, 41]

Também há estudos onde analisam diretamente tecido biológico através de ressonância magnética nuclear de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico (HR-MAS NMR) e os exemplos publicados incluem cancro da próstata [42], carcinoma de células renais [43], cancro da mama [44], cancro da tiroide [45] e vários tumores cerebrais [46].

Em relação às alterações *post mortem*, estudos provaram que é possível aplicar a metabolómica na sua análise. Esta possibilidade advém do facto da morte resultar em alterações extensas tanto a nível metabólico como a nível bioquímico em todos os tecidos de um organismo devido à inexistência de oxigénio na circulação, degradação celular e alterações nas reações enzimáticas. [19, 47] Hirakawa *et al.*, em 2009, [48] investigaram as alterações metabólicas após diferentes tipos de morte (sufocação, sobredosagem de uma droga e insuficiência respiratória) através de RMN ¹H em músculo femoral de rato. Após o uso de PCA nos resultados, concluíram que os perfis metabólicos diferem de acordo com a causa da morte e, ainda, com o tempo decorrido após a morte, correlacionando-se com os parâmetros do *rigor mortis* comumente utilizados. Kang *et al.*, em 2012, [49] utilizaram cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada a Q-TOF/MS no estudo de fígado de rato recolhido às 0, 24 e 48 horas após o sacrifício. Os resultados foram analisados por diversas técnicas quimiométricas, o que permitiu realizar uma distinção entre os grupos de dados correspondentes a cada intervalo *post mortem*.

1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem provado ser uma ferramenta poderosa e versátil para a elucidação de estruturas de moléculas na área da química orgânica, na determinação estrutural e dinâmica de macromoléculas na área da biologia e, como foi referido anteriormente, na elaboração de perfis metabólicos na área da metabolómica. [50] Desde 1970 que tem sido extensamente utilizada nesta última área, nomeadamente na análise de células, tecidos e fluídos biológicos. [26]

O fenómeno de RMN é baseado no facto dos núcleos dos átomos possuírem propriedades magnéticas que podem ser usadas para obter informação química. Portanto, esta técnica irá resultar da ocorrência de transições entre níveis energéticos que correspondem às diferentes orientações permitidas do spin nuclear quando o núcleo está sujeito à ação de um campo magnético intenso. [51] Dos núcleos que apresentam spin nuclear diferente de 0 e dão origem ao fenómeno de RMN, o isótopo de ¹H é o mais utilizado em metabolómica, não só devido à sua elevada abundância (99,98%), como devido ao facto do átomo de hidrogénio fazer parte da maioria dos metabolitos orgânicos. [51, 52]

Uma experiência típica de RMN ¹H consiste na introdução da amostra entre dois polos de um campo magnético forte, o que faz com que esta região tenha um campo homogéneo e os momentos magnéticos nucleares fiquem alinhados ou anti-alinhados com a direção do campo magnético. Uma fonte de radiofrequência vai emitir radiação para a amostra excitando todos os núcleos. Após este período de excitação segue-se um período de relaxação, durante o qual se processa o decaimento. Deste modo, o aparelho de RMN recolhe o sinal resultante do decaimento da magnetização remanescente entre o final do impulso e o final da relaxação, o qual é designado por decaimento de indução livre (FID). Este contém todas as frequências que são emitidas simultaneamente durante o decaimento e é um registo de intensidade em função do tempo. De seguida é aplicada uma transformada de Fourier que tem como objetivo converter a informação numa função no domínio da frequência. Assim cada sinal irá corresponder a um protão específico numa molécula, cuja frequência ou desvio químico é afetado pela sua vizinhança imediata que depende da estrutura da molécula onde está inserido. [51, 53]

A espectroscopia de RMN é mais comumente aplicada a amostras no estado líquido, no entanto na área da metabolómica é muitas vezes necessário o estudo de células ou tecidos biológicos. A utilização do RMN convencional na análise de tecidos biológicos intactos geralmente resulta em espectros com resolução limitada, devido à elevada largura das linhas, causando dificuldades na atribuição e quantificação dos sinais. [54] Para ultrapassar este facto,

foi desenvolvida uma técnica que consegue analisar amostras em estado sólido ou semi-sólido, o RMN de alta resolução segundo o ângulo mágico. [21, 55]

1.4.1. RMN de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico

Andrew *et al.* [56] e Lowe [57] demonstraram que é possível a obtenção de espectros de amostras no estado sólido a partir de uma rotação rápida da amostra num determinado ângulo, denominado ângulo mágico. Este ângulo tem o valor de 54,7° em relação à direção do campo magnético, como é possível observar na Figura 1.2. A rotação segundo o ângulo mágico reduz os efeitos de alargamento de sinal. [55, 58] Estes efeitos de alargamento surgem em sólidos devido a acoplamentos dipolares e desvios químicos anisotrópicos. É um fator angular de $(3\cos^2\theta-1)$ que vai contribuir para a anisotropia, onde θ corresponde ao ângulo entre o campo magnético estático e o eixo de rotação da amostra. Numa experiência de HR-MAS NMR o termo $\cos^2\theta-1$ fica igual a 0 e uma rotação rápida vai levar à obtenção de sinais mais estreitos, sendo possível retirar informação mais detalhada a cerca das amostras. [44, 58, 59]



Figura 1.2 - Ilustração da rotação segundo o ângulo mágico. Adaptado de [21].

1.5. Fígado

O fígado é considerado um importante centro metabólico do organismo, visto que este desempenha funções essenciais relacionadas com a digestão, metabolismo, imunidade e destoxificação. Para o estudo metabolómico deste, neste trabalho utilizou-se como modelo animal o murganho, devido ao facto de este ser um mamífero fácil de tratar em laboratório e apresentar semelhanças estruturais e funcionais com os humanos. A função fisiológica deste órgão é semelhante em ambas as espécies, contudo há algumas diferenças a nível da morfologia, que serão descritas de seguida. [60, 61]

O fígado é o maior órgão abdominal, com uma coloração vermelha acastanhada, que existe em todos os animais vertebrados. A sua forma varia de espécie para espécie e esta é determinada pela disposição dos órgãos adjacentes. No ser humano, o fígado situa-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma, sendo protegido pela caixa torácica. Nos murganhos, ocupa toda a região abaixo do diafragma e não possui ligamentos de superfície proeminentes. [60, 62]

Este órgão pode ser dividido em lóbulos e esta separação é diferente entre as duas espécies, no entanto as suas subunidades básicas são idênticas a nível de estrutura e função. No ser humano, este pode ser dividido em lóbulo direito e esquerdo, os quais estão separados pelo ligamento falciforme. Todavia, há outro tipo de divisão lobular baseado no fornecimento de sangue ao fígado. Os lóbulos direito e esquerdo são separados pelo plano principal do fígado entre a fossa da vesícula biliar e a veia cava inferior. O lóbulo direito representa 60-70% da massa total do fígado e pode ser dividido em dois segmentos, o posterior e o anterior. Do lado esquerdo situa-se o lóbulo caudado, anterior e à esquerda da veia cava inferior. O lóbulo esquerdo pode ainda ser divido pelo ligamento falciforme no lóbulo quadrado e no segmento lateral. O lóbulo quadrado e o lóbulo caudado estão separados pelo sistema porta hepático ou hilo hepático. É através deste sistema que penetram no órgão dois grandes vasos, a artéria hepática e a veia porta, a qual transporta sangue vindo do tubo digestivo e do baço. [60, 62] O fígado de murganho é significativamente mais proeminente do que o fígado humano. É constituído pelo lóbulo lateral esquerdo, pelo lóbulo médio, o qual está subdivido em porção esquerda e direita, pelo lóbulo direito, subdivido horizontalmente em porção anterior e posterior, e pelo lóbulo caudal. A circulação do sangue é bastante semelhante à dos humanos. [60, 62, 63] Estas diferenças anatómicas estão representadas na Figura 1.3.



Figura 1.3 - Diferenças anatómicas entre fígado de murganho e humano. Adaptado de [60, 64].

1.5.1. Funções

O fígado é o primeiro órgão a ter contacto com nutrientes, vitaminas, minerais, substâncias químicas e tóxicos provenientes do meio ambiente. Isto acontece, uma vez que o sangue venoso proveniente do estômago e intestino circula pela veia porta até ao fígado e só depois é que entra na circulação sistémica. Deste modo, o fígado desempenha funções digestivas e excretoras importantes, armazena e metaboliza nutrientes, sintetiza novas moléculas e modifica moléculas nocivas. [64, 65]

Uma das funções do fígado é a produção da bílis, a qual é realizada pelos hepatócitos, as células do fígado, e depois é armazenada na vesícula biliar. A bílis é constituída por água, sais biliares, colesterol e bilirrubina e possui um papel muito importante na digestão, visto que dilui e neutraliza o ácido gástrico e emulsiona as gorduras. [61, 64]

Os hepatócitos armazenam glucose sob a forma de glicogénio, permitindo, assim, que o fígado mantenha os níveis de glicémia dentro de limites. Estas células também têm a capacidade de armazenar ácidos gordos a partir de triglicerídeos já digeridos e ainda vitaminas (A, D, E, K e B12) e minerais (ferro e cobre) de modo a que haja um fornecimento constante de substâncias essenciais aos tecidos do corpo. [61, 64]

As células do fígado são responsáveis por muitos processos metabólicos importantes que suportam outras células do organismo. Como foi referido anteriormente, todo o sangue que sai do sistema digestivo passa pelo fígado, que vai fazer com que os nutrientes ingeridos, como hidratos de carbono, lípidos e proteínas, sejam metabolizados. [64, 65] As proteínas da dieta são hidrolisadas em aminoácidos pelo sistema digestivo e estes quando chegam ao fígado podem ser sujeitos a uma biotransformação antes de serem usados como fonte de energia. Os hepatócitos removem o grupo amina dos aminoácidos, o qual é convertido em amónia e de seguida em ureia, sendo depois excretada na urina. As cadeias carbonadas dos aminoácidos podem ser transformadas em ATP ou convertidas em novas moléculas de glucose através do processo de gluconeogénese ou ainda em lípidos. [61, 62, 64] O fígado tem ainda um papel importante na regulação do metabolismo dos lípidos. Este vai metabolizar os ácidos gordos, provenientes do sangue, em energia na forma de ATP e tem a capacidade de produzir colesterol, lipoproteínas e fosfolípidos que vão ser usados pelas células de todo o organismo. [61, 62, 64]

Nem todas as substâncias ingeridas são benéficas para o organismo, muitas delas são nocivas para as células e, além disso, o próprio organismo produz muitos metabolitos que são tóxicos quando acumulados. Deste modo, o fígado é o órgão responsável pela defesa contra estas substâncias, modificando-as através de reações catalisadas por enzimas que modificam a sua estrutura, tornando-as em metabolitos mais fáceis de ser excretados. [64, 66]

Este órgão tem ainda a capacidade de produzir várias proteínas sanguíneas, nomeadamente a albumina, o fibrinogénio, as globulinas, a heparina e alguns fatores de coagulação. [64]

Devido a este conjunto de funções que o fígado desempenha espera encontrar-se inúmeros metabolitos relacionados com estas numa análise metabolómica deste órgão. Estudos de metabolómica por RMN já foram realizados tanto em fígado de humano como em fígado de rato e murganho saudáveis, tendo sido detetados diversos aminoácidos, ácidos gordos, glucose, glicerol, glicogénio, triglecerídeos, entre outros. [37, 55, 67–69]

1.6. Objetivo

Este trabalho consiste no estudo das alterações que ocorrem a nível metabólico no fígado de murganho (*Mus musculus*) no período após a morte, tirando partido da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico (HR-MAS NMR). Tem como objetivo averiguar diferenças nos metabolitos endógenos provenientes de amostras recolhidas imediatamente após a morte e 2, 6, 24, 48 e 72 horas depois, com a finalidade de identificar possíveis biomarcadores úteis na determinação do intervalo *post mortem*. Também se pretende verificar se há distinção entre o perfil metabólico de machos e fêmeas ao longo do período após a morte.
2. Materiais e métodos

2.1. Recolha das amostras

Foram utilizados 20 animais saudáveis, 10 machos e 10 fêmeas, da espécie *Mus musculus*, estirpe BALB/c. Os machos pesavam, em média, 25 g e as fêmeas 20 g. O alojamento e a manutenção destes animais, em regime experimental, foi realizado no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Pólo III), de acordo com as condições padronizadas de climatização e controladas permanentemente pelos técnicos do biotério. Os animais foram sempre alimentados com ração apropriada e com água potável *ad libitum*, ou seja, não houve qualquer restrição na quantidade de comida e bebida ingeridas. A manutenção das condições ideais para o alojamento e produção de animais permite garantir a reprodutibilidade, a comparabilidade e a possibilidade de fazer generalizações, o que faz com que a investigação experimental possua uma validação científica.

Aos 48 dias de idade, os murganhos foram sacrificados e necropsiados. O sacrifício obedeceu ao princípio de "morte humanamente aceitável", ou seja, o processo foi rápido sem *stress* e sofrimento ou dor, que levou à perda de consciência, paragem respiratória, cardíaca e paragem da função cerebral. O método utilizado foi a sobredosagem anestésica, seguida de deslocamento cervical com o intuito de assegurar a morte do animal. Usou-se uma solução anestésica de pentobarbital, cuja dose administrada foi de 0,1 a 0,2 ml/murganho via intraperitoneal. Confirmou-se sempre a morte do animal, através da ausência dos movimentos respiratórios, dos batimentos cardíacos e da perda dos reflexos. Após se ter realizado o sacrifício do animal, este foi pesado.



Figura 2.1 – Animal 1, espécie Mus Musculus, antes da necrópsia.

Para as necrópsias, organizou-se um conjunto de material completo composto por uma ficha de registo do peso, do sexo do animal e com os intervalos de tempo após a morte de recolha dos fragmentos do órgão; tubos de *Eppendorf* para o armazenamento das amostras;

material de apoio à necrópsia (placa para fixar o murganho, alfinetes, balança de precisão, régua e compressas); material de dissecção (tesoura, pinça de dissecção, cabo de bisturi com lâmina descartável) e um dermótomo *biopsy punch* de 3 mm (SPECULUM), ilustrado na Figura 2.2, para a recolha dos fragmentos de fígado para serem posteriormente analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).



Figura 2.2 - Dermótomo biopsy punch de 3 mm (SPECULUM).

O murganho foi colocado em decúbito dorsal sobre uma placa de esferovite com os quatro membros fixos com alfinetes. Realizou-se uma incisão mediana ventral desde o mento até ao púbis e, de seguida, efetuou-se a abertura das cavidades abdominal e torácica, expondo as vísceras, como está representado na Figura 2.3. Procedeu-se à remoção de fragmentos de fígado com o auxílio do dermótomo *biopsy punch* com o objetivo de terem todos aproximadamente o mesmo tamanho. Esta recolha foi realizada aproximadamente 3 minutos depois da morte do animal, sendo considerada como a 0 horas após a morte.



Figura 2.3 - Animal 1 em decúbito dorsal com as vísceras expostas.

Os murganhos foram mantidos no laboratório, com as vísceras expostas, à temperatura ambiente de ±22°C e foram recolhidas secções de fígado, do mesmo modo que as anteriores, após 2, 6, 24, 48 e 72 horas após a morte do animal. Para tal, a hora da morte foi registada na

folha de registo e foram anotados todos os tempos de recolha dos restantes fragmentos, como exemplificado na Tabela 2.1.

 Tabela 2.1 - Exemplo da folha de registo onde foram anotados os tempos de recolha dos fragmentos, o sexo e o peso do animal.

FÍGADO (A3)	0 h	2 h	6 h	24 h	48 h	72 h
1 5 🗆 M 🖂	4/04/2017	4/04/2017	4/04/2017	5/04/2017	6/04/2017	7/04/2017
Peso 23,19g	8:25 h	10:25 h	14:25 h	8:25 h	8:25 h	8:25 h

Cada fragmento de fígado, após ser retirado do animal, foi armazenado num *Eppendorf* e transportado no gelo até ao congelador a -80°C, onde foram conservados até a sua análise.

Todas as amostras foram devidamente identificadas e foi usado o código de referência topográfico usado no Laboratório de Patologia Experimental, constituído por uma letra e um número. Neste caso, foi usado o código A3, correspondente ao fígado, o número de identificação do animal e o intervalo *post mortem*.

No final, todo o material foi tratado e eliminado como resíduo hospitalar perigoso de risco biológico.

2.2. Análise por HR-MAS NMR

As amostras foram transportadas num *dewar* com azoto líquido para o laboratório de RMN da UC-NMR (Plataforma Tecnológica de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de Coimbra), no Departamento de Química (Pólo I da UC), onde foi realizada a análise. O fragmento de tecido congelado foi retirado do tubo *Eppendorf*, com o auxílio de uma pinça, para uma placa de *petri* sobre o gelo, como ilustrado na Figura 2.4.

Para retirar o sangue ao fragmento do tecido, este foi lavado com aproximadamente 30 μL de solução tampão fosfato salino (PBS), tendo-se retirado o excesso com papel absorvente. Esta solução foi preparada anteriormente (10 mL) com a seguinte composição: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄.H₂O 1,8 mM e NaH₂PO₄.H₂O 10 mM a pH a 7.5.

Os reagentes referidos, tendo a maior pureza comercialmente disponível, foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich-Merck.



Figura 2.4 - Preparação da amostra de fígado relativo ao animal 1, a qual foi lavada com PBS.

Quando foi necessário, o fragmento foi cortado com um bisturi, de modo a que fosse inserido sem problemas no rotor de HR-MAS. Este rotor (CortecNet) é de ZrO_2 e possui 4 mm de diâmetro com capacidade para 50 µL, ilustrado na Figura 2.5. Cada amostra foi inserida com uma pinça e, de seguida, foram adicionados 5 µL da solução de referência. Esta solução foi preparada anteriormente com a concentração de 8 mg/mL, de TSP (δ = 0 ppm) em água deuterada (D2O).

O rotor é fechado com o auxílio das ferramentas apresentadas na Figura 2.5 e é feito um meio círculo com um marcador permanente de tinta preta na parte de baixo do rotor, para ser detetada a velocidade de rotação do rotor durante a operação. Este processo de preparação da amostra demorou cerca de 10 a 12 minutos e, por fim, o rotor é inserido no espectrómetro de RMN.



Figura 2.5 - Rotor ZrO₂ de 4 mm à esquerda e ferramentas para a preparação do rotor à direita.

Todas as experiências de RMN foram realizadas à temperatura de 4°C num espectrómetro Bruker Avance III HD 500 MHz utilizando uma sonda HR-MAS de 4 mm de ressonância tripla ¹H, ¹³C e ¹⁵N, com uma rotação da amostra de 4000 Hz. Foi utilizada uma sequência de impulso CPMG RMN ¹H, de modo a suprimir os sinais alargados relativos a

macromoléculas. Os parâmetros utilizados foram: número de scans 128; número de pontos 16 k; janela espetral 15 ppm; tempo de relaxação 4 segundos; tempo de aquisição 2 segundos; número de loops 126 e "spin-echo delay" 600 μs.

2.3. Processamento dos espectros obtidos e PCA

O processamento dos espectros RMN obtidos vai torná-los aptos para a posterior análise quimiométrica. Este processamento foi levado a cabo aplicando um mesmo template a todos os espectros, o qual incluiu os seguintes parâmetros: função exponencial de apodização 0.7 Hz; "zero filling" 65536 (64k), efetuando "linear prediction" de 16k a 64k; correção de fase automática e correção de linha de base com um ajuste polinomial Bernstein de ordem 3. Os espectros foram referenciados para o TSP a 0.00 ppm e, de seguida, foi selecionada apenas a região entre 0.4 e 4.8 ppm, a qual foi normalizada pela área total definida para o valor 100. Este passo é essencial, uma vez que as amostras recolhidas não possuem exatamente o mesmo tamanho, o que se iria refletir em variações nas intensidades dos sinais, tornando os espectros incomparáveis. Assim, ao dividir cada ponto dos dados por uma área total igual este efeito é removido. [38] Após a normalização, a mesma região foi submetida a um binning, com o objetivo de reduzir o número de variáveis, tornado os resultados menos complexos e mais fáceis de comparar. Este método dividiu cada espectro num número definido de regiões (110) com intervalo de 0.04 ppm. Estas regiões são denominadas de bins e cada uma contém apenas um "sinal", o qual é uma entidade matemática caracterizada pelo desvio químico, intensidade e largura do sinal a meia altura. [38, 70]

Para a realização deste processamento foi utilizado o programa MestreNova versão 11.0.3. e os dados foram exportados como ficheiros .csv para o *software* "ChemoSpec: Exploratory Chemometrics for Spectroscopy", R *package* versão 4.4.17. (https://CRAN.Rproject.org/package=ChemoSpec) onde foi efetuado o PCA. Para a execução desta análise estatística multivariada todas as variáveis foram centradas e foi estipulada a análise das 3 primeiras componentes principais para todos os PCA executados. A remoção de *outliers* foi efetuada a partir de um teste de diagnóstico baseado na distância *score*.

2.4. Identificação de metabolitos

Foi usado o *software* "Chenomx NMR suite 8.31 evaluation", com uma base de dados de 350 compostos, de modo a auxiliar a identificação dos metabolitos nos espectros de RMN.

3. Resultados e discussão

Como foi referido no capítulo 1, os métodos convencionais para a determinação do intervalo *post mortem* baseiam-se, maioritariamente, nas alterações físicas e em fenómenos de decomposição do cadáver. Estes são muito afetados por diversos fatores, o que faz com que a probabilidade de ocorrerem erros numa estimativa da hora da morte seja muito elevada. No entanto, a morte resulta em alterações extensas a nível metabólico em todos os tecidos de um organismo devido à inexistência de oxigénio na circulação, degradação celular e alterações nas reações enzimáticas. [47] Tendo como base estes factos, este trabalho tem como objetivo principal averiguar se ocorrem diferenças significativas mensuráveis nos metabolitos endógenos de fígado de murganho em função do intervalo *post mortem*, tirando partido da técnica de espectroscopia de HR-MAS NMR. Deste modo, este estudo é composto por uma análise metabolómica, a qual deve incluir várias etapas, nomeadamente, recolha das amostras, aquisição dos espectros de RMN, análise estatística multivariada e, por fim, identificação dos metabolitos importantes, os quais se podem classificar como biomarcadores do estudo.

3.1. Alterações post mortem visíveis

Na recolha das amostras para este estudo foi realizado um registo fotográfico, ilustrado na Figura 3.1, das vísceras do animal 1 logo após a necrópsia (0 h) e 24, 48 e 72 horas depois, mantendo o animal à temperatura ambiente do laboratório (aproximadamente 22 °C). É possível observar diferenças notórias com o decorrer do tempo, sendo visível a evolução dos fenómenos de decomposição. Estes fenómenos advêm da putrefação, ou seja, da degradação dos tecidos em gases e líquidos provocada pela atividade de enzimas hidrolíticas e de microrganismos provenientes do organismo do murganho.

Relativamente ao fígado, assinalado na mesma Figura, sendo este um órgão rico em vasos sanguíneos e nutrientes para os microrganismos, é possível afirmar que ocorreu uma alteração da tonalidade, bem como alguma retração. Ao longo do tempo, este ganhou um aspeto mais argiloso e mais rígido, em consequência da degradação do tecido.



Figura 3.1 - Registo fotográfico do animal 1 imediatamente após a necrópsia (0h), 24, 48 e 72 horas depois. O fígado encontra-se assinalado.

3.2. Espectroscopia HR-MAS NMR

Com o objetivo de analisar as alterações *post mortem* a nível metabólico, para cada animal (murganho), foram obtidos 6 espectros de RMN de biopsias de fígado, um espectro para cada tempo de recolha de amostra, tendo-se obtido 120 espectros no total de 20 animais, sendo 10 machos e 10 fêmeas. Primeiramente, os resultados obtidos de amostras recolhidas imediatamente após a morte dos animais foram comparados com espectros da literatura de fígado saudável de murganho macho, também obtidos logo após o sacrifício do murganho. Verificou-se que estes estão de acordo com a literatura e, por comparação, foi ainda possível identificar algumas das moléculas presentes. [37, 68] Na Figura 3.2 está representado um espectro CPMG RMN ¹H da amostra 1 de fígado de murganho macho recolhida às 0 horas, a título de exemplo, com as possíveis atribuições de sinais. O espectro foi processado conforme descrito no capítulo 2 e referenciado para o TPS a 0.00 ppm.

Neste tipo de espectros, a atribuição de sinais é complexa devido à sua sobreposição proveniente das diversas moléculas da amostra e à pequena quantidade de amostra analisada, o que diminuiu a intensidade dos sinais. Para uma atribuição mais extensa de sinais e identificação adicional de metabolitos, poderia ser realizado um estudo mais detalhado de atribuição dos metabolitos presentes nas amostras através de um estudo de RMN bidimensional. No entanto, através da comparação dos desvios químicos e multiplicidade dos sinais obtidos com os valores da literatura para diferentes metabolitos endógenos e recorrendo à base de dados referida no subcapítulo 2.4 foi possível a atribuição de alguns sinais. [55, 71–73]



Figura 3.2 - Espectro CPMG RMN ¹H (a 500 MHz) da amostra 1 recolhida a tempo zero (0h) após a morte do animal com indicação das atribuições de sinais.

Verificou-se que a zona do espectro entre os 3.20 e 4.0 ppm, sendo uma zona muito complexa, como é possível observar no espectro da Figura 3.2, apresenta várias sobreposições de sinais. No entanto, com base na literatura e com recurso à base de dados, é possível inferirse a presença de glucose e glicogénio nesta zona. [37, 68, 71] O glicogénio é um homopolissacarídeo de glucose, o qual é considerado como a principal reserva energética das células, maioritariamente encontrado no fígado. A complexidade do espectro da glucose na região espectral 3.35 a 4.03 ppm resulta da presença de vários ¹H com desvios químicos próximos e diversos padrões de multiplicidade. [55, 72]

Os sinais que mais facilmente se detetam pertencem ao lactato, alanina e acetato, que se podem observar mais pormenorizadamente na expansão do espectro na Figura 3.4. Analisando a estrutura destes compostos, apresentadas na Figura 3.3, é possível averiguar que tipo de sinais devem ser observados no espectro de RMN ¹H. Relativamente ao lactato, este possui um grupo CH₃, cujos hidrogénios apresentam o mesmo ambiente químico, sendo representados apenas por um sinal. O carbono vicinal possui um hidrogénio que acopla com o grupo CH₃, justificando a presença do dubleto aos 1.34 ppm e do quarteto aos 4.13 ppm. Este desvio químico superior deve-se à proximidade do protão H-2 dos grupos carboxilo e hidroxilo que provocam a sua desblindagem. A existência desta molécula no fígado indica que o processo de autólise já foi iniciado, uma vez que após a morte deixa de ocorrer fornecimento de oxigénio, obrigando as células a seguirem a via anaeróbia da glicólise, produzindo, assim, dióxido de carbono e ácido láctico. [12, 71]

Em relação ao aminoácido alanina, este é constituído também por um grupo CH₃, que possui um desvio químico de 1.49 ppm. Os seus protões estão acoplados apenas com o hidrogénio vicinal, o qual se apresenta como um sinal dubleto. Deste modo, o protão H-2 é representado por um sinal quarteto que deveria ser observado na zona dos 3.8 ppm, devido à sua proximidade do grupo amina e do grupo carboxilo. Não é possível a visualização deste sinal nos espectros obtidos, uma vez que se situa numa zona com elevada sobreposição de sinais. Este aminoácido é encontrado no fígado, uma vez que este órgão é responsável pela metabolização das proteínas da dieta, na medida em que estas são hidrolisadas a aminoácidos.

O acetato, ilustrado na Figura 3.4, contém um grupo CH₃, cujos protões são representados pelo singleto de desvio químico 1.93 ppm, explicado pela proximidade dos oxigénios adjacentes. Esta molécula é encontrada no fígado, uma vez que é utilizada pelos organismos na forma de acetilcoenzima A, um composto intermediário muito importante no metabolismo celular.



Figura 3.3 – Estrutura química do lactato (A), da alanina (B) e do acetato (C).

Ainda ao analisar a expansão do espectro (Figura 3.3), observa-se um sinal tripleto com desvio químico de 1.19 ppm. Recorrendo a base de dados, verificou-se que este sinal pode ser relativo ao etanol, o qual possui um outro sinal característico, nomeadamente um quarteto, na zona dos 3.60 ppm, mas não é possível a sua observação devido à complexidade da zona do espectro em questão. Após uma análise aos resultados, observou-se que o sinal tripleto apenas se encontra em alguns espectros, incluindo espectros de várias horas do mesmo animal. Deste modo, o etanol, possivelmente, advém de uma contaminação na recolha das amostras.



Figura 3.4 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹H (a 500 MHz) da amostra 1 recolhida a tempo zero (0h) após a morte do animal, com a indicação das atribuições de sinais relativas ao lactato, alanina e ião acetato.

Analisando vários espectros de fígado, com as correspondentes atribuições de sinais retratados na literatura, verificou-se que os sinais a 0.92; 1.15; 1.31 ppm devem ser relativos aos protões das cadeias alifáticas dos lípidos, como é possível observar na Figura 3.4. [68, 71, 74] O sinal singleto largo menos desviado (0.92 ppm) é possivelmente relativo aos protões do grupo CH₃ terminal da cadeia alifática e o sinal dubleto com desvio de 1.15 ppm pode ser referente aos hidrogénios dos grupos CH₂ da cadeia. Com maior desvio, aos 1.31 ppm, encontrase um sinal sobreposto com o do lactato, o qual pode corresponder aos protões do grupo CH₂ mais afastado do grupo carboxilo da porção lipídica (n)CH₂CH₂COOH. A multiplicidade dos sinais observados nos espectros não corresponde ao esperado tendo em conta os protões adjacentes. Isto pode ser devido à sobreposição de vários sinais relativos aos lípidos na mesma zona, visto que estas moléculas são compostas por cadeias alifáticas extensas, e devido ainda ao alargamento dos sinais dos lípidos em sistemas em bicamada.

Tendo em conta os espectros da literatura, também deveriam ter sido observados sinais relativos aos aminoácidos glutamina e glutamato, às moléculas colina e N-óxido de trimetilamina e ainda sinais relativos a mais porções lipídicas, cuja atribuição não foi possível nos espectros obtidos. [37, 55, 68]

De seguida, de modo a averiguar que alterações ocorrem a nível metabólico entre os vários intervalos *post mortem*, foi realizada uma comparação dos vários espectros relativos às amostras recolhidas a diferentes horas do mesmo animal. Na Figura 3.5 estão representados, como exemplo, espectros CPMG RMN ¹H relativos ao fígado do animal 9 (macho) para os diferentes intervalos *post mortem*. Após a aplicação do *template* de processamento, estes espectros foram sujeitos a normalização pela área total apenas na região entre 0.4 e 4.8 ppm, como referido no subcapítulo 2.3. À primeira vista todos os espectros aparentam ser semelhantes, no entanto é possível observar algumas diferenças, principalmente na zona entre 0.8 e 1.5 ppm e entre 3.2 e 4.3 ppm.



Figura 3.5 – Espectros CPMG RMN ¹H (a 500 MHz) relativos à amostra 9 para os diferentes intervalos *post mortem*, exibidas por ordem crescente.

Como referido no capítulo 1, um dos objetivos deste estudo inclui verificar se existem diferenças significativas entre os metabolitos endógenos do fígado de murganhos machos e fêmeas ao longo do período *post mortem*. É esperado obter resultados distintos, uma vez que o metabolismo entre machos e fêmeas é ligeiramente diferente devido às funções específicas para cada sexo, nomeadamente a gestação e lactação. [75, 76] Na Figura 3.6 está representada uma comparação dos espectros relativos à amostra 6, pertencente a uma fêmea, e à amostra 9, relativa a um macho. Os espectros foram submetidos ao mesmo tipo de processamento dos espectros apresentados anteriormente. Nesta comparação observam-se espectros relativos a amostras recolhidas imediatamente após a morte e 24 horas depois. Globalmente não se observam diferenças significativas entre machos e fêmeas, no entanto é possível notar algumas dissemelhanças na zona correspondente aos lípidos, entre 0.8 e 1.0 ppm.



Figura 3.6 – Comparação dos espectros CPMG RMN ¹H (a 500 MHz) relativos à amostra 6 (fêmea) e à amostra 9 (macho) recolhidas a 0h e 24h após a morte do animal. A vermelho estão representados os espectros relativos à fêmea e a azul relativos ao macho.

A análise metabólica de amostras de tecidos animais por RMN resulta numa enorme quantidade de resultados que não são fáceis de examinar manualmente. A comparação dos espectros da Figura 3.5, provenientes de amostras de um animal recolhidas em diferentes horas, não nos permite retirar conclusões significativas a cerca de todos os resultados obtidos. Avaliando os espectros referentes a um macho e uma fêmea da Figura 3.6, estes aparentam ser semelhantes, mas, como no caso anterior, não é possível extrair informação significante. Posto isto, a melhor forma de analisar este tipo de resultados é através da aplicação de métodos estatísticos multivariados. Neste estudo foi aplicada a Análise de Componentes Principais.

3.3. Análise de Componentes Principais

A análise estatística multivariada permite reduzir a quantidade de variáveis num conjunto de resultados, tornando-os mais fáceis de interpretar, uma vez que o objeto em estudo vai ser representado de uma forma mais simples. Deste modo, é possível extrair informação mais útil que permite averiguar se há diferenças significativas entre os espectros referentes a diferentes intervalos *post mortem*, verificando-se também se ocorrem distinções entre os dois

sexos. A utilização deste tipo de estatística pode ainda indicar quais os metabolitos responsáveis pela distinção das amostras recolhidas a diferentes intervalos *post mortem*.

A análise de componentes principais (PCA) é o método mais indicado para este tipo de estudo metabolómico, visto que permite analisar um grande conjunto de dados que envolvem um número elevado de variáveis, que é o caso dos dados espectroscópicos. O PCA vai simplificar o conjunto enorme de dados num novo sistema de coordenadas, as quais são denominadas de componentes principais (PCs). Estas representam a maior parte da variabilidade dos dados, o que permite descrever a informação a partir de muito menos variáveis do que as que os dados originais parecem apresentar. Os novos componentes são derivados dos dados originais de forma a que a maior variação dos dados esteja representada na primeira componente principal (PC1), a segunda maior variação na segunda componente principal (PC2) e assim sucessivamente. Deste modo, grande parte da variância é retida nas primeiras componentes principais, sendo possível a representação dos dados num gráfico de componentes principais de duas ou três dimensões. [22, 77] Esta representação dos dados com as novas coordenadas é designada por score plot e cada ponto representa uma amostra, ou seja, neste estudo, após a aplicação do PCA, um espectro vai ser representado por um ponto no gráfico. Pode ainda obterse um *loading plot* onde cada ponto representa uma variável, sendo assim usado para detetar quais as regiões do espectro responsáveis pela separação dos vários tipos de amostras no score *plot*. [40]

Com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre os vários espectros obtidos relativos aos intervalos *post mortem* de 0, 2, 6, 24, 48 e 72 horas, foram efetuados vários PCA com diferentes comparações tanto para os machos como para as fêmeas. Estas comparações foram realizadas entre 0 e 24 horas; 24, 48 e 72 horas; 0, 24 e 48 horas e, por fim, 0, 2 e 6 horas.

• Intervalos post mortem 0 e 24 horas

Primeiramente foi efetuada a comparação de espectros relativos a 0 e 24 horas após a morte, visto que são dois tempos relativamente afastados e no decorrer da recolha das amostras foram observados facilmente fenómenos de decomposição, referidos anteriormente no subcapítulo 3.1. Assim sendo, espera-se obter perfis metabólicos distintos entre estes dois intervalos e, por conseguinte, dois agrupamentos distintos no gráfico de componentes principais após a aplicação do PCA.

Após os espectros serem submetidos a normalização e ao *binning* descritos no subcapítulo 2.3, foi efetuado um PCA para cada sexo, de modo a evitar a variabilidade entre os

perfis metabólicos, visto que o metabolismo entre machos e fêmeas é ligeiramente diferente, como foi referido anteriormente. [40]

Machos

Na Figura 3.7 é possível observar a representação dos dados através de duas componentes principais, PC1 e PC2. Para a execução deste PCA foram usadas todas as amostras, ou seja, ainda não foi realizada a identificação e eliminação de *outliers*. Após a aplicação do PCA, verifica-se que a primeira componente principal (PC1) explica 66% da variabilidade dos dados e a segunda componente principal (PC2) 11%. Nesta representação já é possível observar que os dados referentes às amostras de 0 e 24 horas se agrupam de modo diferente, como era esperado, sendo notável a separação das amostras, principalmente, segundo a primeira componente principal.



Figura 3.7 – *Score plot* relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h e 24h em murganhos machos: representação 2D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2, após a aplicação do PCA, antes da verificação de *outliers*. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 0h após a morte e os pontos a cor azul a 24h.

Para todas as comparações foi estipulado analisar as três primeiras componentes principais, as quais explicam uma determinada variância dos dados consoante o caso. Para determinar a percentagem de variância referente às três primeiras componentes principais obteve-se um *scree plot*, representado na Figura 3.8, para os dados relativos aos intervalos *post mortem* 0 e 24 horas. Verifica-se que as três primeiras componentes principais explicam 82% da variância dos dados para este caso.

Ao analisar o *score plot* da Figura 3.7, verifica-se que a amostra 17 relativa às 0 horas está mais desviada das restantes. Para uma identificação mais precisa de possíveis *outliers* e sua eliminação, executou-se um teste de diagnóstico, ilustrado na Figura 3.9, baseado na distância *score*, a partir do número de componentes principais estipulados anteriormente. Com a interpretação deste confirma-se que a amostra "17_0h" é um possível *outlier*. Deste modo, realizou-se uma análise ao espectro em questão e concluiu-se que deve ser eliminado e ser executado um novo PCA.



Figura 3.8 – *Scree plot* relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h e 24h em murganhos machos: representação da percentagem de variância consoante o número de componentes principais.



Possible PCA Outliers based on Score Distance

Figura 3.9 – Teste de diagnóstico de *outliers* baseado na distância score relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h e 24h em murganhos machos.

Na Figura 3.10 observam-se novas representações 2D e 3D dos dados através do novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA depois da eliminação do *outlier*. Verifica-se que a primeira componente principal (PC1) explica agora 71% da variabilidade dos dados, a segunda componente principal (PC2) 7.8% e a terceira componente principal (PC3), exibida na representação a 3D, 5.9%. Isto indica que a larga maioria da variabilidade dos dados é explicada pela primeira componente, como sucedeu anteriormente.

Analisando tanto a representação 2D como a 3D, observam-se facilmente dois agrupamentos distintos referentes às 0 e 24 horas, separados segundo a primeira componente principal, apesar de que o agrupamento relativo às 0 horas apresenta uma dispersão bastante elevada em comparação com o agrupamento das 24 horas. Esta dispersão mostra que há uma elevada variabilidade no conjunto de espectros relativos às amostras recolhidas imediatamente após a morte, o que pode ser devido a diferentes perfis metabólicos dos diferentes animais.



Figura 3.10 - *Scores plots* relativos à comparação dos intervalos *post mortem* 0h e 24h em murganhos machos após a aplicação do PCA depois da eliminação de um *outlier*. À esquerda, a representação 2D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 0h após a morte e os pontos a cor azul a 24h.

A separação visível dos dados relativos às 0 e 24 horas indica que as amostras relativas a estes intervalos *post mortem* apresentam perfis metabólicos diferentes, ou seja, ocorrem alterações a nível metabólico no fígado de murganhos machos neste intervalo de tempo.

Para determinar quais as regiões do espectro que se alteram neste intervalo de tempo, foi obtido um *loading plot* (Figura 3.11) da primeira e segunda componente principal, uma vez que com estas duas componentes já é possível observar separação dos resultados. Nesta representação, como referido anteriormente, cada ponto representa uma variável, a qual possui um valor de *loading* que varia entre -1 e 1, ou seja, cada variável tem uma determinada contribuição para cada componente principal, sendo que o valor zero indica uma contribuição nula. Deste modo, os pontos mais extremos vão indicar os valores de desvios químicos responsáveis pela diferenciação de amostras observada no *score plot,* uma vez que possuem um valor absoluto elevado de *loading*.

Ao analisar o *loading plot* em questão, com base no *score plot* obtido anteriormente, é possível concluir que os desvios químicos 3.47 e 3.59 ppm, contribuem para a separação do agrupamento das amostras recolhidas às 0 horas e os desvios químicos 1.15 e 1.35 ppm para a separação do agrupamento relativo às 24 horas. Os valores de *loading* associados a cada desvio químico estão representados na Tabela 3.1. Deste modo, tendo em conta os metabolitos correspondentes a cada desvio químico, verifica-se que os sinais relativos ao lactato, à glucose e aos grupos CH₂ da cadeia alifática dos lípidos vão contribuir para a diferença entre os perfis metabólicos de amostras de fígado de murganho macho recolhidas imediatamente após a morte e 24 horas depois.

No mesmo gráfico, ainda é possível observar uma variável num ponto extremo, a qual corresponde ao etanol com um desvio químico de 1.19 ppm. Como foi referido anteriormente, o sinal relativo ao etanol provavelmente adveio de uma contaminação na recolha das amostras, portanto, para uma análise mais simples dos resultados, este valor não vai ser tido em conta.



Figura 3.11 – *Loading plot* do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h e 24h em murganhos machos.

<u>Fêmeas</u>

Na Figura 3.12 observam-se as representações 2D e 3D dos dados relativos às fêmeas através do novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA. As três primeiras componentes principais explicam 72% da variância total e efetuando o teste de diagnóstico de *outliers* e análise dos espectros, não se eliminou nenhum dado. Verifica-se que a primeira componente principal (PC1) explica 34% da variabilidade dos dados, a segunda componente principal (PC2) 27% e a terceira componente principal (PC3), exibida na representação a 3D,

11%. Comparativamente ao caso dos machos, a variabilidade dos dados está mais distribuída nas fêmeas pelas três componentes principais.

Ao analisar ambas as representações 2D e 3D, observa-se uma separação dos resultados referentes às 0 e 24 horas, maioritariamente, segundo a primeira componente principal, como no caso anterior. O agrupamento relativo às amostras recolhidas às 0 horas, referentes às fêmeas, apresenta elevada dispersão, tal como aconteceu nos machos.



Figura 3.12 - *Scores plots* relativos à comparação dos intervalos *post mortem* 0h e 24h em murganhos fêmeas após a aplicação do PCA e verificação de *outliers*. À esquerda, a representação 2D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 0h após a morte e os pontos a cor azul a 24h.

Deste modo, a representação dos dados no novo sistema de componentes principais após a aplicação do PCA indica que as amostras relativas aos intervalos *post mortem* 0 e 24 horas nas fêmeas apresentam perfis metabólicos bastante diferentes.

Na Figura 3.13 está representado o *loading plot* relativo à primeira e segunda componente principal, visto que estas componentes são suficientes para a visualização da separação dos agrupamentos analisados neste caso, como foi observado no *score plot* 2D. Verifica-se que os desvios químicos 3.46 e 3.58 ppm contribuem para a separação do agrupamento relativo às amostras de 0 horas, enquanto que os desvios químicos importantes na separação do conjunto das amostras de 24 horas são 1.14; 1.34 e 3.50 ppm. Os valores de *loading* associados a cada desvio químico estão representados na Tabela 3.1. Realizando a correspondência entre os valores obtidos de desvios químicos com os respetivos valores dos metabolitos identificados, verifica-se que ocorrem alterações na zona do lactato e da glucose e na zona correspondente aos grupos CH₂ da cadeia alifática dos lípidos.



Figura 3.13 - *Loading plot* do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* Oh e 24h em murganhos fêmeas.

De modo a comparar mais facilmente os resultados obtidos pelos *loading plots* relativos aos machos e fêmeas é apresentada a Tabela 3.1 com os desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 0 e 24 horas com os respetivos valores de *loading* associados para cada componente principal. Analisando os *loading plots* anteriores verifica-se que as variáveis com um valor de *loading* absoluto maior que 2.0 já se situam nos pontos extremos do gráfico, portanto, na Tabela 3.1, os valores a negrito são os que possuem maior contribuição.

Verifica-se que o desvio químico com maior contribuição nos machos (-0.608 na PC2) corresponde possivelmente ao sinal da glucose (3.47 ppm), o qual nas fêmeas, na PC2, apresenta um valor de *loading* muito baixo. Relativamente às fêmeas, o desvio químico relativo ao grupo CH₂ da cadeia alifática dos lípidos é o que possui maior influência (-0.869) na PC2. Curiosamente este último valor de desvio químico possui bastante diferença entre machos e fêmeas, tendo uma maior contribuição para a separação dos agrupamentos de amostras recolhidas 0 e 24 horas após a morte nas fêmeas. Também se verifica que o valor de desvio químico relativo ao lactato (1.35 ppm) e provavelmente glucose (3.59 ppm) contribuem mais para a separação dos conjuntos de dados nos machos segundo a PC2, enquanto que o valor 3.51 ppm, possivelmente relativo à glucose, tem mais influência nas fêmeas.

Os estudos que se seguem foram realizados com base no raciocínio que foi explicado nesta primeira comparação.

	Loadings				
Desvios	Mac	chos	Fêmeas		
químicos (ppm)	PC1	PC2	PC1	PC2	
1.15	-0.218	0.117	0.0479	-0.869	
1.35	-0.173	-0.364	0.168	0.0726	
3.47	0.160	-0.608	-0.209	-0.0470	
3.51	-0.0404	-0.0704	0.0721	0.218	
3.59	0.220	-0.481	-0.124	0.0994	

Tabela 3.1 - Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 0h e 24h com os respetivos valores de *loading* para cada componente principal. A negrito encontram-se os valores com maior contribuição.

Intervalos post mortem 24, 48 e 72 horas

Após se ter verificado diferenças a nível metabólico em amostras recolhidas imediatamente após a morte e 24 horas depois, decidiu-se realizar a comparação de espectros relativos aos intervalos *post mortem* de 24, 48 e 72 horas. Estes intervalos de tempo são bastante importantes a nível forense, visto que a maioria dos cadáveres são encontrados nos primeiros dias após a morte. Os métodos convencionais usados para a determinação da hora da morte são baseados nos fenómenos *post mortem*, o que faz com que não se obtenha um tempo preciso porque estes são afetados por diversos fatores internos e externos. No entanto, todos estes fenómenos advêm das alterações bioquímicas em todos os tecidos do corpo que ocorrem após a morte. Deste modo, espera-se observar diferenças significativas entre os espectros relativos aos intervalos de tempo em questão, visto que se observaram fenómenos de decomposição subsequentes à morte dos animais e em função do tempo.

<u>Machos</u>

Realizou-se o PCA ao conjunto de amostras relativos aos intervalos *post mortem* 24, 48 e 72 horas para os machos e obtiveram-se as representações 2D e 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, ilustradas na Figura 3.14. As três primeiras componentes principais explicam 73% da variância total e efetuando o teste de diagnóstico de *outliers* e uma análise posterior aos espectros, verificou-se que a amostra recolhida 24 horas após a morte referente ao animal 11 deve ser eliminada. A primeira componente principal (PC1) explica 41% da variabilidade dos dados, a segunda componente principal (PC2) 21% e a terceira componente principal (PC3), exibida na representação a 3D, 9.3%.

Analisando a representação a 2D é difícil observar uma distinção entre os agrupamentos relativos a cada intervalo post mortem, mas ao examinar a representação a 3D é de notar que o agrupamento dos dados relativos a 24 horas e o agrupamento dos dados de 48 horas estão afastados, o que mostra que estes têm perfis metabólicos diferentes. O agrupamento referente aos espectros de amostras recolhidas às 72 horas exibe uma elevada dispersão, estando sobreposto com o agrupamento de 24 e 48 horas. Estes factos são comprovados pela análise de uma representação a três dimensões interativa em que os agrupamentos são visualizados através de diferentes ângulos. Esta representação é ilustrada na Figura 3.15 e observa-se a sobreposição do agrupamento das amostras recolhidas às 72 horas após a morte com os restantes agrupamentos, os quais estão separados entre si, maioritariamente, segundo a primeira componente principal. Isto pode ser devido ao facto de as amostras recolhidas após 3 dias já terem um nível elevado de degradação, tornando-as bastante sólidas. Assim, os espectros, referentes a amostras recolhidas às 72 horas após a morte, obtidos por HR-MAS NMR perdem resolução devido ao estado da amostra estar fora do limiar semi-sólido para a técnica utilizada, o que faz com que estes não se consigam distinguir estatisticamente dos espectros relativos às amostras recolhidas para intervalos post mortem inferiores.



Figura 3.14 - *Scores plots* relativos à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos machos após a aplicação do PCA e eliminação de *outliers*. À esquerda, a representação 2D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; a direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; a direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 24h após a morte, os pontos a cor azul a 48h e os pontos a cor verde 72h.



Figura 3.15 - *Score plot* relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos machos após a aplicação do PCA e verificação de *outliers*: representação 3D interativa dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 24h após a morte, os pontos a cor azul a 48h e os pontos a cor verde 72h.

Neste caso, são necessárias as três primeiras componentes principais para visualizar a separação das amostras, portanto na Figura 3.16 e Figura 3.17 estão representados os *loading plots* relativos à primeira e segunda componente principal e à primeira e terceira componente principal, respetivamente. Ao analisar os dois *loading plots*, tendo em atenção os valores de *loading* para às variáveis que se situam nos extremos dos gráficos, verifica-se que os desvios químicos que mais contribuem para a separação dos agrupamentos observada no *score plot* anterior são as seguintes: 0.99; 1.15; 1.35; 1.39; 3.43; 3.47; 3.55 e 3.59 ppm. Os valores associados a cada desvio químico estão representados na Tabela 3.2. Estes correspondem aos metabolitos que irão sofrer alterações entre as 24 e 72 horas. Portanto, observam-se alterações na zona do lactato e da glucose e na zona dos grupos CH₃ terminal e CH₂ da cadeia alifática dos lípidos. Na identificação dos metabolitos realizada anteriormente no subcapítulo 3.2 não se verificou nenhum sinal na zona dos 1.39 ppm, no entanto é possível que este seja relativo ao lactato, uma vez que ao longo do tempo após a morte a degradação dos tecidos aumenta, o que faz com que se perca resolução nos espectros de RMN, podendo o sinal apresentar-se mais largo.



Figura 3.16 - *Loading plot* do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos machos.



Figura 3.17 - *Loading plot* do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos machos.

<u>Fêmeas</u>

Na Figura 3.18 observam-se as representações 2D e 3D dos dados relativos às fêmeas através do novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA. As três primeiras componentes principais explicam 70% da variância total. Verificou-se um *outlier*, após a realização do teste de diagnóstico e análise dos espectros, nomeadamente a amostra relativa ao animal 10 recolhida às 24 horas *post mortem*, a qual foi removida. Observa-se que a primeira componente principal (PC1) explica 43% da variabilidade dos dados, a segunda componente

principal (PC2) 17% e a terceira componente principal (PC3), exibida na representação a 3D, 9.9%. A distribuição da variabilidade dos dados pelas três primeiras componentes principais é muito semelhante à dos machos.

Analisando o *score plot* 3D, visto vez que é difícil observar separação do conjunto de dados em 2D, verifica-se que o agrupamento referente às 72 horas apresenta uma dispersão elevada e encontra-se sobreposto com o das 24 horas e 48 horas, muito provavelmente devido à mesma razão explicada anteriormente para o caso dos machos. Neste caso, também é possível observar uma separação dos agrupamentos referentes às amostras recolhidas após 24 e 48 horas da morte, a qual é mais evidente na representação 3D interativa, visualizada através de um ângulo diferente, ilustrada na Figura 3.19.



Figura 3.18 - *Scores plots* relativos à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos fêmeas após a aplicação do PCA e verificação de *outliers*. À esquerda, a representação 2D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 24h após a morte, os pontos a cor azul a 48h e os pontos a cor verde 72h.



Figura 3.19 - *Score plot* relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos fêmeas após a aplicação do PCA e verificação de *outliers*: representação 3D interativa dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 24h após a morte, os pontos a cor azul a 48h e os pontos a cor verde 72h.

Como no caso anterior, são necessárias as três primeiras componentes principais para visualizar a separação das amostras. Deste modo, o *loading plot* relativo à primeira e segunda componente principal e o relativo à primeira e terceira componente principal, estão representados na Figura 3.20 e 3.21, respetivamente. Observando os dois gráficos em questão, verifica-se que os desvios químicos com mais influência são os seguintes: 0.96; 1.04; 1.16; 1.36; 1.40; 3.51 e 3.59 ppm. Os valores associados a cada desvio químico estão representados na Tabela 3.2. Assim, cada um destes desvios químicos corresponde a metabolitos que vão sofrer alterações ao longo destes intervalos post mortem, indicando que existem variações na zona dos grupos CH₃ e CH₂ da cadeia alifática dos lípidos, na zona do lactato e da glucose.



Figura 4.20 - *Loading plot* do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos fêmeas.



Figura 4.21 - *Loading plot* do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 24h, 48h e 72h em murganhos fêmeas.

Com o intuito de comparar mais facilmente os resultados obtidos pelos *loading plots* relativos aos machos e fêmeas é apresentada a Tabela 3.2, com os desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 24, 48 e 72 horas com os respetivos *loadings* associados para cada componente principal, ou seja, cada desvio químico possui uma determinada contribuição em cada componente principal.

É possível observar que os desvios químicos com maior contribuição nos machos, correspondem ao grupo CH₂ da cadeia alifática dos lípidos na PC3, com desvio químico de 1.15 ppm; ao lactato, com desvio químico 1.35 ppm na PC1; e possivelmente a um sinal referente à glucose, de 3.51 ppm na PC3. Relativamente a estes desvios químicos nas fêmeas, com contribuição nas componentes principais referidas, verifica-se que o sinal relativo ao grupo CH₂ dos lípidos possui uma menor contribuição na PC3, assim como o sinal relativo ao lactato na PC1, apesar de não ser uma diminuição tão significativa. Em relação ao sinal com desvio de 3.51 ppm, as fêmeas apresentam uma maior contribuição na PC3.

Nas fêmeas, os metabolitos que sofrem mais alteração, correspondem ao lactato (1.35 ppm) e possivelmente à glucose (3.51 e 3.59 ppm).

Também se verifica que o sinal relativo à cadeia CH₂ da cadeia alifática dos lípidos tem maior influência na separação dos agrupamentos nos machos do que nas fêmeas, enquanto que o sinal relativo ao grupo terminal CH₃ da cadeia alifática apenas tem contribuição nas fêmeas, assim como o sinal com desvio químico de 1.03 ppm, que se situa na mesma zona deste metabolito.

	Loadings					
Desvios	Machos			Fêmeas		
químicos (ppm)	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
0.95	-4.950E-05	0.0669	0.0245	0.193	0.116	-0.373
0.99	-0.0790	0.293	0.211	7.43E-03	0.217	0.158
1.03	0.0814	0.0863	0.0784	-0.240	0.239	-0.228
1.15	-0.381	0.327	-0.564	0.286	0.278	0.0985
1.35	-0.508	-0.0878	0.362	0.437	0.0183	0.0690
1.39	0.324	-0.0712	0.134	-0.299	-0.225	-0.255
3.43	-0.304	-0.242	-0.174	0.248	0.0265	0.0327
3.47	0.256	0.0665	-0.373	-0.0737	-0.264	0.129
3.51	-5.97E-03	-0.401	0.00973	0.0547	-0.483	0.0640
3.55	-0.0754	-0.0575	-0.294	0.110	0.140	-0.105
3.59	0.0758	0.256	0.142	-0.0847	-0.125	0.387

Tabela 3.2 - Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 24h, 48h e 72h com os respetivos valores de *loading* para cada componente principal. A negrito encontram-se os valores com maior contribuição.

É possível afirmar que espectros relativos a amostras recolhidas imediatamente após a morte são significativamente diferentes em relação a espectros de 24 horas e, consequentemente, 48 horas. Estes resultados são concordantes com os de um estudo realizado em fígado de rato recolhido às 0, 24 e 48 horas após o sacrífico do animal através de UPLC acoplada a Q-TOF/MS. [49] A partir das 72 horas já não é possível obter diferenças significativas relativamente aos restantes intervalos de tempo.

• Intervalos post mortem 0, 24 e 48 horas

Com o intuito de confirmar a separação entre os agrupamentos relativos às amostras recolhidas a 0, 24 e 48 horas após a morte do animal, realizou-se um novo PCA, tanto para machos como para fêmeas. Nesta comparação apenas se ilustram as representações 3D interativas, onde se observa o conjunto de dados a partir de um ângulo diferente, visualizando-se mais facilmente os agrupamentos das amostras. Assim, na Figura 3.22 estão ilustradas as representações 3D dos conjuntos de dados relativos aos machos e às fêmeas, de forma a ser mais simples a visualização de diferenças no agrupamento destes no novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA. Para o caso dos machos as três primeiras componentes principais explicam 76% da variância total e no caso das fêmeas 70%. Após a realização do teste de diagnóstico de possíveis *outliers* e análise dos espectros, foram removidas as amostras relativas ao animal 10 (murganho fêmea) e 17 (murganho macho) recolhidas 24 e 0 horas após a morte do animal, respetivamente. No caso dos machos a primeira componente principal (PC1) explica 59% da variabilidade dos dados, a segunda componente principal (PC2) 12% e a terceira componente principal (PC3) 6.4%. No caso das fêmeas a PC1 explica 33%, a PC2 26% e a PC3 10%.

Ao analisar os *score plots* verifica-se que, no geral, há separação dos agrupamentos relativos aos espectros das amostras recolhidas imediatamente após a morte, e 24 e 48 horas depois. Nas fêmeas, é possível observar uma maior separação entre o agrupamento das 0 horas e dos restantes intervalos. Em relação aos conjuntos de dados referentes às 24 e 48 horas, observa-se uma separação mais clara também no caso das fêmeas, enquanto que no caso dos machos os agrupamentos aparentam apresentar alguma sobreposição.



Figura 3.22 - *Scores plots* relativos à comparação dos intervalos *post mortem* 0h, 24h e 48h após a aplicação do PCA e verificação de *outliers*. **A:** representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas (PC1, PC2, PC3) relativa aos murganhos machos; **B:** representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas (PC1, PC2, PC3) relativa aos murganhos fêmeas. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 0h após a morte, os pontos a cor azul a 24h e os pontos a cor verde 48h.

Estas diferenças são visíveis, uma vez que dentro destes intervalos de tempo a autólise e putrefação vão evoluir de forma considerável, levando a uma destruição dos tecidos ao longo do tempo. Os maiores passos da decomposição envolvem reações de hidrólise que resultam na quebra química dos principais constituintes do corpo, nomeadamente lípidos, proteínas e hidratos de carbono. [78] Portanto, à medida que a decomposição evolui, as macromoléculas vão-se degradando até aos seus constituintes principais, o que resulta em perfis metabólicos, obtidos por RMN, diferentes com o decorrer do tempo. Sendo assim, será possível estimar o intervalo *post mortem* entre 0, 24 e 48 horas.

Para determinar quais os valores de desvios químicos exatos que contribuem para estas diferenças, foram analisados os *loading plots* da primeira e segunda componente principal e da primeira e terceira componente principal, apresentados em Apêndice. Desta análise foram obtidos os desvios químicos mais importantes na separação das amostras com os respetivos valores de *loading*, que estão representados na Tabela 3.3.

Verifica-se, nesta comparação, que tanto para os machos como para as fêmeas, os desvios químicos correspondentes aos sinais do lactato (1.35 ppm) e possivelmente à glucose (3.47 ppm) são os que apresentam maiores valores de *loading*, ou seja, são os responsáveis pela distinção entre os agrupamentos das amostras. Relativamente ao desvio químico relativo ao grupo CH₂ da cadeia alifática dos lípidos, observa-se que na PC2 das fêmeas o valor absoluto de *loading* é mais elevado do que na mesma componente principal nos machos.

	Loadings					
Desvios químicos (ppm)	Machos			Fêmeas		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
1.15	-0.206	0.417	0.063	-0.282	-0.674	-0.356
1.35	-0.158	0.484	0.006	0.174	-0.337	0.382
1.39	0.0797	-0.272	0.0209	0.025	0.307	0.0946
3.27	-0.156	-0.193	-0.0662	0.247	0.114	-0.0661
3.43	-0.197	0.129	-0.176	0.099	-0.174	-0.0135
3.47	0.169	-0.111	0.692	-0.219	-0.114	0.479
3.59	0.211	0.166	0.440	-0.077	0.088	0.205

Tabela 3.3 – Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 0h, 24h e 48h com os respetivos valores de *loading* para cada componente principal. A negrito encontram-se os valores com maior contribuição.

Intervalos post mortem 0, 2 e 6 horas

Por fim, decidiu-se analisar as diferenças entre amostras recolhidas imediatamente após a morte, e 2 e 6 horas depois. Esta comparação tem como objetivo averiguar se é possível distinguir perfis metabólicos com intervalos de tempo menores, ou seja, verificar a partir de que intervalo de tempo é possível observar diferenças significativas a nível dos metabolitos entre amostras recolhidas após a morte.

Machos

O PCA foi efetuado sobre o conjunto de dados referentes às amostras de fígado de murganho macho relativas aos intervalos *post mortem* 0, 2 e 6 horas e obtiveram-se as representações 2D e 3D dos dados no novo sistema de componentes principais, como é possível observar na Figura 3.23. As três primeiras componentes principais explicam 79% da variância total e efetuando o teste de diagnóstico de *outliers* e uma análise posterior aos espectros, eliminou-se o espectro relativo à amostra recolhida às 6 horas do animal 15. A primeira componente principal (PC1) explica 44% da variabilidade dos dados, a segunda componente principal (PC2) 21% e a terceira componente principal (PC3), exibida na representação a 3D, 10%.

Ao analisar a representação com as três componentes principais, observa-se alguma separação entre os agrupamentos de dados relativos às 0 e 6 horas, no entanto o agrupamento das 2 horas encontra-se sobreposto, tanto com o agrupamento das 0 horas como das 6 horas.

Isto indica que os perfis metabólicos referentes ao fígado recolhido às 0 e 6 horas são significativamente diferentes, todavia já não é possível distinguir os de 2 horas entre estes.



Figura 3.23 - *Score plot* relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h, 2h e 6h em murganhos machos após a aplicação do PCA e eliminação de *outliers*. À esquerda, a representação 2D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 0h após a morte, os pontos a cor azul a 2h e os pontos a cor verde 6h.

São necessárias as três primeiras componentes principais para visualizar a separação dos conjuntos de dados, assim na Figura 3.24 e Figura 3.25 estão representados os *loading plots* relativos à primeira e segunda componente principal e à primeira e terceira componente principal, respetivamente. Ao analisar estes gráficos, verifica-se que os desvios químicos que mais contribuem para a separação dos agrupamentos observada no *score plot* 3D anterior são as seguintes: 1.15; 1.23; 3.47; 3.59 ppm. Os valores de *loading* associados a cada desvio químico estão representados na Tabela 3.4. Estes valores correspondem possivelmente à zona da glucose e às zonas dos grupos CH₂ da cadeia alifática dos lípidos, o que indica que ocorrem alterações nestes metabolitos entre as 0 e 6 horas.


Figura 3.24 - *Loading plot* do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h, 2h e 6h em murganhos machos.



Figura 4.25 - *Loading plot* do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h, 2h e 6h em murganhos machos.

<u>Fêmeas</u>

Na Figura 3.26 observam-se as representações 2D e 3D dos dados relativos às fêmeas através do novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA. As três primeiras componentes principais explicam 74% da variância total e após a realização dos testes de diagnóstico de *outliers* e análise aos espectros, os dados relativos às amostras recolhidas a 0 e 6 horas após a morte referentes ao animal 20 foram removidas. Verifica-se que a primeira componente principal (PC1) explica 35% da variabilidade dos dados, a segunda componente principal (PC2) 25% e a terceira componente principal (PC3), exibida na representação a 3D, 18%. É de salientar que o PC3 explica uma elevada variabilidade dos dados relativamente à

comparação efetuada anteriormente. Neste caso, tendo em conta o caso anterior relativo aos fígados de machos, observa-se uma separação mais explícita entre os agrupamentos relativos a 0 e 6 horas, mas ainda com alguma sobreposição. De igual forma, o agrupamento de dados referente às amostras recolhidas 2 horas após a morte encontra-se totalmente sobreposto com o das 0 horas, indicando que os respetivos perfis metabólicos não possuem diferenças significativas.



Figura 3.26 - *Score plot* relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h, 2h e 6h em murganhos fêmeas após aplicação do PCA e eliminação de *outliers*. À esquerda, a representação 2D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1 e PC2; à direita, a representação 3D dos dados no novo sistema de coordenadas, PC1, PC2 e PC3. Os pontos a cor vermelha referem-se a amostras recolhidas a 0h após a morte, os pontos a cor azul a 2h e os pontos a cor verde 6h.

Na Figura 3.27 e Figura 3.28 estão representados os *loading plots* relativos à primeira e segunda componente principal e à primeira e terceira componente principal, respetivamente. Analisando estes gráficos, verifica-se que os desvios químicos com mais influência são os seguintes: 1.15; 1.35; 3.47 e 3.59 ppm. Os valores de *loading* associados a cada desvio químico estão representados na Tabela 3.4. Deste modo, cada um destes desvios corresponde a metabolitos que sofrem alterações entre 0 e 6 horas, indicando, assim, que ocorrem variações na zona dos grupos CH₂ da cadeia alifática dos lípidos, na zona do lactato e possivelmente glucose.



Figura 3.27 *-Loading plot* do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h, 2h e 6h em murganhos fêmeas.



Figura 3.28 - *Loading plot* do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos *post mortem* 0h, 2h e 6h em murganhos fêmeas.

De modo a comparar mais facilmente os resultados obtidos pelos *loading plots* relativos aos machos e fêmeas, é apresentada a Tabela 3.4, com os desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos relativos às amostras recolhidas 0, 2 e 6 horas depois da morte, com os respetivos *loadings* associados para cada componente principal. Verifica-se que o desvio químico com maior contribuição na separação dos resultados nos machos tem um *loading* de 0.544 em PC3, que corresponde possivelmente a um sinal da glucose, com 3.47 ppm de desvio químico. Nas fêmeas, este desvio químico apresenta uma contribuição menor na mesma PC. Relativamente às fêmeas, o desvio químico que tem a maior influência para a distinção dos agrupamentos possui o valor de 1.15 ppm, com um valor de *loading* -0.623 na PC2, correspondendo à porção lipídica relativa aos grupos CH₂ da cadeia alifática. Nos machos, este desvio químico também possui contribuição, mas não tão elevada como nas fêmeas. Em relação ao desvio químico correspondente ao sinal do lactato, verifica-se que apenas tem alguma contribuição na separação dos agrupamentos relativos às fêmeas. No entanto, estes valores de *loading* não são muito elevados relativamente às análises realizadas anteriormente. Isto indica que para os intervalos *post mortem* menores (entre as 0 e 6 horas após a morte) ainda não há uma variação significativa na concentração deste metabolito.

	Loadings					
Desvios	Machos			Fêmeas		
químicos (ppm)	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
1.15	-0.383	0.274	-0.413	-0.599	-0.623	-0.174
1.35	-0.0967	0.127	-0.0440	-0.155	0.270	0.247
3.47	0.0205	0.319	0.544	0.0728	-0.287	0.201
3.59	0.221	0.248	0.348	0.196	-0.207	0.219

Tabela 4.4 - Desvios químicos responsáveis pela separação dos agrupamentos de 0h, 2h e 6h com os respetivos valores de *loading* para cada componente principal. A negrito encontram-se os valores com maior contribuição.

Após a análise comparativa global de resultados, observa-se que as diferenças mais significativas entre os espectros de RMN relativos a amostras de fígado de murganho ocorrem a partir das 6 horas após a morte. Deste modo, neste intervalo *post mortem* as células do organismo já seguiram a via anaeróbia e já ocorreram algumas reações de degradação das macromoléculas. Após as 6 horas, é possível distinguir metabolicamente as amostras até 48 horas após a morte tanto nos machos como nas fêmeas, visto que amostras recolhidas às 72 horas possuem um estado de degradação elevado, a que está associado uma alteração do estado físico das amostras, dificultando a observação de diferenças através de HR-MAS NMR.

Em relação às desigualdades entre machos e fêmeas é possível afirmar que possuem comportamentos diferentes ao longo do período *post mortem*, visto que as representações dos conjuntos de dados no novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA são diferentes para cada comparação realizada. Tal deve-se ao facto de vários desvios químicos contribuírem de forma desigual, principalmente os desvios químicos relativos aos sinais dos lípidos. Estes resultados foram ao encontro do esperado, uma vez que metabolicamente machos e fêmeas são diferentes.

3.4. Possíveis biomarcadores post mortem

Com base nos resultados obtidos e na análise por PCA, mais propriamente a partir da análise dos *loading plots* obtidos para cada comparação, foi possível identificar quais os metabolitos que se alteraram ao longo do período *post mortem*.

Verificou-se que os desvios químicos que mais contribuem para a distinção entre as amostras analisadas correspondem ao lactato, à zona da glucose, ao grupo terminal CH₃ e grupos CH₂ da cadeia alifática dos lípidos. Com o intuito de confirmar estas alterações metabólicas entre os diferentes intervalos *post mortem*, foi realizada uma comparação a vários espectros relativos a 0, 6, 24 e 48 horas, uma vez que a partir do PCA se verificou que é possível observar distinção significativa entre estes intervalos.

Na Figura 3.29 é possível visualizar a expansão do conjunto de espectros relativos a uma amostra de fígado de macho, do animal 1, a título de exemplo, onde se observam as alterações da porção lipídica dos grupos CH₃ e CH₂ e do lactato. A variação dos mesmos metabolitos é observada na expansão dos espectros relativos ao fígado de fêmea, do animal 18, na Figura 3.30. Estes espectros foram processados segundo o *template* descrito no subcapítulo 2.3, sendo também submetidos a uma normalização pela área total.

Ao analisar as expansões dos espectros referidos, verifica-se que há um aumento da intensidade do sinal correspondente ao lactato, tanto nos machos como nas fêmeas, o que confirma o resultado obtido pelo PCA. Esta alteração ocorre devido ao facto de o fornecimento de oxigénio terminar após a morte, o que faz com que as células, para manter a atividade celular metabólica básica, seguem a via anaeróbia da glicólise como uma fonte de energia alternativa. Deste modo, é produzido ácido láctico pela lactato desidrogenase a partir do piruvato no fígado, aumentando a sua concentração ao longo do intervalo *post mortem*. [79–81] Assim, as alterações do lactato indicam que este metabolito é um possível biomarcador *post mortem* no fígado.

59



Figura 3.29 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹H (a 500 MHz) da amostra 1 (murganho macho) recolhida 0h, 6h, 24h e 48h após a morte, com indicação das atribuições de sinais relativas aos lípidos, lactato, alanina e acetato.



Figura 3.30 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹H (a 500 MHz) da amostra 18 (murganho fêmea) recolhida 0h, 6h, 24h e 48h após a morte, com indicação das atribuições de sinais relativas aos lípidos, lactato, alanina e acetato.

Relativamente aos sinais correspondentes às porções lipídicas, verifica-se que ocorrem alterações nos sinais correspondentes aos grupos CH₃ e CH₂ da cadeia alifática, respetivamente. Nas fêmeas estas alterações encontram-se mais evidenciadas e observa-se um aumento do sinal relativo ao CH₂ mais afastado do grupo carboxilo na porção lipídica (n)(CH₂)CH₂CH₂COOH (1.31 ppm), o qual se encontra sobreposto com o sinal do lactato. Esta última alteração não se detetou com o PCA, o que indica que não ocorre de forma significativa em todas as amostras. Em relação aos restantes sinais, as suas alterações foram observadas nos *loading plots* obtidos anteriormente e verificaram-se variações conforme o sexo do animal. São detetáveis alterações ao longo dos intervalos *post mortem*, visto que um dos maiores passos da decomposição envolve reações de quebra dos principais constituintes do organismo, nomeadamente os lípidos. Para um melhor estudo destas alterações, deveria ser realizada uma análise quantitativa, de modo a compreender como é que as concentrações das porções lipídicas variam com o aumento do tempo após a morte em machos e fêmeas.

Na Figura 3.31 é ilustrada a expansão do conjunto de espectros relativos a fígado de murganho macho (animal 1, como exemplo), na zona espectral da glucose. Verifica-se que ocorre um aumento da intensidade com o decorrer do tempo após a morte, tal como o previsto pelo PCA. Estas alterações também são evidentes nas fêmeas e ocorrem em consequência da hidrólise a glucose de hidratos de carbono complexos como o glicogénio. A principal reserva energética encontrada no fígado, o glicogénio é, portanto, hidrolisado a glucose, processo denominado de glicogenólise, levando a um aumento da glucose nas amostras. [81, 82] Assim sendo, também estes sinais podem ser possíveis biomarcadores *post mortem* no fígado.



-3.98 -3.99 -3.90 -3.94 -3.78

Figura 3.31 - Expansão do espectro CPMG RMN ¹H (a 500 MHz) da amostra 1 (murganho macho), recolhida 0h, 6h, 24h e 48h após a morte, com indicação da atribuição de sinais relativos à glucose e glicogénio.

É possível afirmar que se observaram diferenças significativas nos perfis metabólicos de fígado de murganho entre vários dos intervalos post mortem, com base em espectros de HR-MAS NMR, na medida em que se verificaram alterações significativas em vários metabolitos, nomeadamente um aumento significativo do lactato e da glucose. Estas moléculas apresentam ser biomarcadores post mortem promissores. No futuro, deverá ser realizada uma análise quantitativa destas variações, de modo a que se consiga associar uma gama de concentrações a um intervalo de tempo post mortem, com o objetivo de estimar o período após a morte através da análise espectroscópica de biopsias do fígado, tirando partido da técnica de HR-MAS NMR. Para facilitar a análise quantitativa, na recolha das amostras os tecidos deverão ser pesados, de forma a recolher exatamente a mesma quantidade de amostra, diminuindo, assim, a variabilidade da intensidade dos sinais. Com esta otimização deverá também ser possível obter mais informação sobre a variação da concentração das porções lipídicas que contribuem para as diferenças entre os perfis metabólicos.

4. Conclusão

O objetivo deste estudo consistiu em averiguar se ocorrem diferenças significativas mensuráveis nos metabolitos endógenos em fígado de murganho macho e fêmea em função do intervalo post mortem, tirando partido da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico (HR-MAS NMR). Deste modo, foi obtida uma grande quantidade de dados, os quais foram todos processados e submetidos a uma análise estatística multivariada, nomeadamente uma análise de componentes principais (PCA). Através da representação dos dados num novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA, verificaram-se agrupamentos distintos entre as 0 e 24 horas, 24 e 48 horas e entre 0 e 6 horas. Portanto, é possível afirmar que existem diferenças significativas entre os perfis metabólicos relativos a amostras recolhidas às 0, 6, 24 e 48 horas após a morte dos murganhos, em ambos os sexos, tendo-se observado alterações a nível do lactato e da glucose e dos lípidos, nomeadamente nos grupos CH₃ e CH₂ da cadeia alifática. A partir da análise dos espectros, observou-se um aumento da concentração do lactato e glucose com o tempo após a morte, indicando, assim, que estes metabolitos parecem ser biomarcadores post mortem promissores. Relativamente às porções lipídicas, verificou-se que estas também sofrem alterações, contudo são mais influenciadas pelo sexo do animal. Deste modo, verificou-se que machos e fêmeas possuem comportamentos ligeiramente diferentes ao longo do tempo após a morte, uma vez que as representações dos conjuntos de dados no novo sistema de coordenadas após a aplicação do PCA diferem para cada sexo em consequência das diferentes contribuições de cada desvio químico.

Posto isto, é possível afirmar que uma análise metabolómica de tecidos biológicos através de espectroscopia de HR-MAS NMR é uma abordagem promissora na determinação do intervalo *post mortem*, sendo possível a utilização de biomarcadores específicos para uma estimativa mais precisa.

Todavia serão necessárias otimizações ao procedimento utilizado neste estudo, na medida em que a recolha de exatamente a mesma quantidade de tecido facilita a quantificação e minimiza os erros; as amostras deverão ser ultra-congeladas em azoto-líquido imediatamente após a sua recolha, de forma a evitar reações de degradação indesejáveis; poderão ser efetuados estudos detalhados de RMN bidimensional de modo a facilitar a identificação de metabolitos adicionais e, por fim, uma análise quantitativa aos metabolitos com a finalidade de associar uma gama de concentrações a um intervalo de tempo *post mortem*.

Como perspetivas futuras, com o objetivo de validar a possibilidade de determinação do intervalo *post mortem* tirando partido da metodologia aqui empregue, poderá executar-se uma análise cega com amostras de fígado de murganho colhidas a diferentes intervalos *post mortem*. Posteriormente, este estudo poderá ser realizado em outros órgãos, no sentido de se verificar

65

qual o melhor tecido para uma estimativa mais correta do intervalo *post mortem* e, numa fase mais avançada, a abordagem poderá ser transposta para humanos.

5. Bibliografia

- 1. Payne-James J, Jones R, B Karch S, Manlove J (2011) Simpson's Forensic Medicine, 13th editi. Hodder & Stoughton Ltd, London
- Lei nº45/2004, 19 de agosto.
 http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?artigo_id=403A0014&nid=40
 3&tabela=leis&pagina=1&ficha=1&so_miolo=&nversao=#artigo. Acedido em Maio.
- 3. Em situação de morte. http://www.ministeriopublico.pt/perguntas-frequentes/emsituacao-de-morte. Acedido em Maio.
- 4. Saukko P, Knight B (2004) Knight's Forensic Pathology, 3th Editio. Edward Arnold Ltd, London
- 5. Pinheiro J (2006) Forensic Anthropology and Medicine: complementary sciences form recovery to cause of death. Human Press Inc, Totowa, NJ
- Sharma R, Kumar Garg R, Gaur JR (2015) Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. Egypt J Forensic Sci 5:1–12. doi: 10.1016/j.ejfs.2013.04.002
- Salam HA, Shaat EA, Aziz MHA, et al (2012) Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes. Alexandria J Med 48:335–344. doi: 10.1016/j.ajme.2012.05.004
- 8. Donaldson AE, Lamont IL (2014) Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. Aust J Forensic Sci. doi: 10.1080/00450618.2013.784356
- 9. Bautista R (2012) Survey of Biological Factors Affecting the Determination of the Postmortem Interval. Sci Humanit A J Student Res 13–22.
- 10. Mathur A, Agrawal YK (2011) An overview of methods used for estimation of time since death. Aust J Forensic Sci 43:275–285. doi: 10.1080/00450618.2011.568970
- 11. Santos A (2004) Tanatologia forense Medicina Legal 2003/2004. Porto
- Hau TC, Hamzah NH, Lian HH, Hamzah SPAA (2014) Decomposition Process and Post Mortem Changes: Review. Sains Malaysiana 43:1873–1882. doi: 10.17576/jsm-2014-4312-08
- 13. DiMaio VJM, Dana SE (2006) Handbook of forensic pathology, Second Edi. Taylor & Francis, Boca Raton
- Clark MA, Worrel MB, Pless JE (1997) Postmortem changes in soft tissues. In: Sorg M (ed) Forensic Taphon. Postmortem Fate Hum. Remain. CRC Press, p 151–164.
- 15. Kaliszan M, Hauser R, Kernbach-Wighton G (2009) Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. Leg Med 11:111–117. doi: 10.1016/j.legalmed.2008.12.002
- Donaldson AE, Lamont IL (2013) Biochemistry changes that occur after death: Potential markers for determining post-mortem interval. PLoS One 8:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0082011
- 17. Madea B, Musshoff F (2007) Postmortem biochemistry. Forensic Sci Int 165:165–171. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.023
- Jashnani KD, Kale SA, Rupani AB (2010) Vitreous humor: Biochemical constituents in estimation of postmortem interval. J Forensic Sci 55:1523–1527. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01501.x

- Castillo-Peinado LS, Luque de Castro MD (2016) Present and foreseeable future of metabolomics in forensic analysis. Anal Chim Acta 925:1–15. doi: 10.1016/j.aca.2016.04.040
- Zelentsova EA, Yanshole L V., Snytnikova OA, et al (2016) Post-mortem changes in the metabolomic compositions of rabbit blood, aqueous and vitreous humors. Metabolomics 12:1–11. doi: 10.1007/s11306-016-1118-2
- 21. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E (2007) The Handbook of Metabonomics and Metabolomics, First edit. Handb Metabonomics Metabolomics. doi: 10.1016/B978-0-444-52841-4.X5000-0
- 22. Issaq HJ, Van QN, Waybright TJ, et al (2009) Analytical and statistical approaches to metabolomics research. J Sep Sci 32:2183–2199. doi: 10.1002/jssc.200900152
- 23. Villas-Bôas SG, Roessner U, Hansen MAE, et al (2006) Metabolome Analysis: An Introduction, First edit. doi: 10.1002/9780470105511
- 24. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD (2007) Serum and Plasma Proteomics. Chem Rev 107:3601–3620.
- Gamache PH, Meyer DF, Granger MC, Acworth IN (2004) Metabolomic Applications of Electrochemistry /Mass spectrometry. Am Soc mass Spectrom 15:1717–1725. doi: 10.1016/j.jasms.2004.08.016
- 26. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, et al (2007) Metabolic profiling , metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine , plasma , serum and tissue extracts. doi: 10.1038/nprot.2007.376
- 27. Wishart DS (2016) Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. Nat Rev Drug Discov 15:473–484. doi: 10.1038/nrd.2016.32
- Kaderbhai NN, Broadhurst DI, Ellis DI, et al (2003) Functional genomics via metabolic footprinting : monitoring metabolite secretion by Escherichia coli tryptophan metabolism mutants using FT – IR and direct injection electrospray mass spectrometry. 376–391. doi: 10.1002/cfg.302
- 29. Wishart DS (2011) Advances in metabolite identification. Bioanalysis 3:1769–1782. doi: 10.4155/bio.11.155
- 30. Zhang A, Sun H, Wang P, et al (2012) Modern analytical techniques in metabolomics analysis. Analyst 137:293–300. doi: 10.1039/C1AN15605E
- Maraschin M, Zeggio A, Tomazzoli M, et al (2017) Metabolômica e Quimiometria como ferramentas para análises quimio(bio) diversas. In: Biotecnol. Apl. à Agro&Indústria. Blucher, pp 17–49
- 32. Spraul M, Neidig P, Klauck U, et al (1994) Automatic reduction of NMR spectroscopic data for statistical and pattern recognition classification of samples. J Pharm Biomed Anal 12:1215–1225. doi: 10.1016/0731-7085(94)00073-5
- 33. Deming SN (1986) Chemometrics: An overview. Clin Chem 32:1702–1706.
- 34. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T (2007) Chemometrics in Metabonomics. J Proteome Res 6:469–479.
- 35. Ebbels TMD, Cavill R (2009) Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc 55:361–374. doi: 10.1016/j.pnmrs.2009.07.003

- 36. Holmes E, Antti H, Alexander S, et al (2002) Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to charaterising and interpreting complex biological NMR spectra. 1549–1557. doi: 10.1039/b208254n
- 37. Coen M, Lenz EM, Nicholson JK, et al (2003) An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. Chem Res Toxicol 16:295–303.
- 38. Euceda LR, Giskeodegard GF, Bathen TF (2015) Preprocessing of NMR metabolomics data. Scand J Clin Lab Invest 75:193–203. doi: 10.3109/00365513.2014.1003593
- 39. Wishart DS (2008) Applications of metabolomics in drug discovery and development. Drugs R D 9:307–322. doi: 10.2165/00126839-200809050-00002
- 40. Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, et al (2005) NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. NMR Biomed 18:143– 162. doi: 10.1002/nbm.935
- 41. Lindon JC, Nicholson JK, Everett JR (1999) NMR Spectroscopy of Biofluids. Annu Reports NMR Spectrosc. doi: 10.1016/S0066-4103(08)60035-6
- 42. Swanson MG, Vigneron DB, Tabatabai ZL, et al (2003) Proton HR-MAS Spectroscopy and Quantitative Pathologic Analysis of MRI/3D-MRSI-Targeted Postsurgical Prostate Tissues. Magn Reson Med 50:944–954. doi: 10.1002/mrm.10614
- 43. Moka D, Vorreuther R, Schicha H, et al (1998) Biochemical classification of kidney carcinoma biopsy samples using magic-angle-spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Pharm Biomed Anal 17:125–132. doi: 10.1016/S0731-7085(97)00176-3
- 44. Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, et al (2002) High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. NMR Biomed 15:327–337. doi: 10.1002/nbm.775
- Wojakowska A, Chekan M, Widlak P, Pietrowska M (2015) Application of metabolomics in drug resistant breast cancer research. Int J Endocrinol 1–13. doi: 10.3390/metabo5010100
- 46. Barton SJ, Howe FA, Tomlins AM, et al (1999) Comparison of in vivo 1H MRS of human brain tumours with 1H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro. Magn Reson Mater Physics, Biol Med 8:121–128. doi: 10.1016/S1352-8661(99)00020-4
- Donaldson a. E, Lamont IL (2014) Metabolomics of post-mortem blood: identifying potential markers of post-mortem interval. Metabolomics 11:237–245. doi: 10.1007/s11306-014-0691-5
- Hirakawa K, Koike K, Uekusa K, et al (2009) Experimental estimation of postmortem interval using multivariate analysis of proton NMR metabolomic data. Leg Med 11:S282–S285. doi: 10.1016/j.legalmed.2009.02.007
- 49. Kang YR, Park YS, Park YC, et al (2012) UPLC/Q-TOF MS based metabolomics approach to post-mortem-interval discrimination: Mass spectrometry based metabolomics approach. J Pharm Investig 42:41–46. doi: 10.1007/s40005-012-0006-7
- 50. Fan TW, Lane AN (2016) Applications of NMR Spectroscopy to Systems Biochemistry. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. doi: 10.1016/j.pnmrs.2016.01.005
- 51. Pinho e Melo TMVD, Rocha Gonsalves AM d'A. (2007) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra

- 52. Lammerhofer M, Weckwerth W (2013) Metabolomics in practice, First Edit. Wiley-VCH, Weinheim
- 53. Lammerhofer M, Weckwerth W (2013) Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data. Wiley-VCH
- 54. Moka D, Vorreuther R, Schicha H, et al (1997) Magic angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of intact kidney tissue samples. Anal Commun 34:107–109. doi: 10.1039/a701456b
- Bollard ME, Garrod S, Holmes E, et al (2000) High-resolution 1H and 1H-13C magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver. Magn Reson Med 44:201–207. doi: 10.1002/1522-2594(200008)44:2<201::AID-MRM6>3.0.CO;2-5
- Andrew ER, Bradbury A, Eades RG (1959) Removal of Dipolar Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Solids by Specimen Rotation. Nature 183:1802–1803. doi: 10.1038/1831802a0
- 57. Lowe IJ (1959) Free induction decays of rotating solids. Phys Rev Lett 7:285–287.
- Beckonert O, Coen M, Keun HC, et al (2010) High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. Nature 5:1019–1032. doi: 10.1038/nprot.2010.45
- 59. Waters NJ, Garrod S, Farrant RD, et al (2000) High-Resolution Magic Angle Spinning 1 H NMR Spectroscopy of Intact Liver and Kidney : Optimization of Sample Preparation Procedures and Biochemical Stability of Tissue during Spectral Acquisition. Anal Biochem 282:16–23. doi: 10.1006/abio.2000.4574
- 60. Treuting P., Dintzis S. (2012) Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas. Elsevier
- 61. Taylor T Liver. http://www.innerbody.com/image_digeov/card10-new2.html. Acedido em Junho.
- 62. Monga SPS (2010) Molecular Pathology of Liver Diseases. Springer, Pittsburgh
- 63. Hedrich H (2012) The laboratory mouse, Second edi. Elsevier
- 64. Seeley RR, Stephens TD, Tate P (2003) Anatomia E Fisiologia. McGraw-Hill Higher Education
- 65. Klaassen CD, Watkins JB (2003) Casarett and Doull's Essentials of Toxicology, First edit. McGraw-Hill Professional, New York
- 66. Timbrell J (2009) Principles of Biochemical Toxicology, 4th editio. doi: 10.3109/10409239609110574
- Martínez-Granados B, Monleón D, Martínez-Bisbal MC, et al (2006) Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy. NMR Biomed 19:90–100. doi: 10.1002/nbm.1005
- Coen M, Ruepp SU, Lindon JC, et al (2004) Integrated application of transcriptomics and metabonomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse. J Pharm Biomed Anal 35:93–105. doi: 10.1016/j.jpba.2003.12.019
- 69. Waters NJ, Holmes E, Williams A, et al (2001) NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of a-naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat: An integrative metabonomic approach. Chem Res Toxicol 14:1401–

1412. doi: 10.1021/tx010067f

- 70. (2014) PCA and NMR: Practical aspects. http://nmr-analysis.blogspot.pt/2014/07/pcaand-nmr-practical-aspects.html. Acedido em Junho.
- 71. Martínez-Granados B, Monleón D, Martínez-Bisbal MC, et al (2006) Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy. NMR Biomed 18:1–11. doi: 10.1002/nbm.1005
- 72. Wang Y, Bollard ME, Keun H, et al (2003) Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues. Anal Biochem 323:26–32. doi: 10.1016/j.ab.2003.07.026
- 73. Fan TW (1996) Metabolite profiling by one- and two-dimensional analysis of complex mixtures. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc 28:161–219.
- 74. Knothe G AOCS Lipid Library. http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40270. Acedido em Agosto.
- Chen X, Mcclusky R, Itoh Y, et al (2013) X and Y Chromosome Complement Influence Adiposity and Metabolism in Mice. Endocrinology 154:1092–1104. doi: 10.1210/en.2012-2098
- 76. Varlamov O, Bethea CL, Jr CTR (2015) Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. Front Endocrinol (Lausanne) 5:1–7. doi: 10.3389/fendo.2014.00241
- 77. Davies AMC, Fearn T (2005) Back to basics : the principles of principal component analysis. Spectrosc Eur 17:20–23.
- Swann LM, Forbes SL, Lewis SW (2010) Analytical separations of mammalian decomposition products for forensic science: A review. Anal Chim Acta 682:9–22. doi: 10.1016/j.aca.2010.09.052
- Donaldson AE, Lamont IL (2013) Biochemistry changes that occur after death: Potential markers for determining post-mortem interval. PLoS One 8:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0082011
- 80. Donaldson AE, Lamont IL (2014) Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. Aust J Forensic Sci 46:8–26. doi: 10.1080/00450618.2013.784356
- 81. Palmiere C, Mangin P (2012) Postmortem chemistry update Part I. Int J Legal Med 126:199–215. doi: 10.1007/s00414-011-0614-1
- 82. Coe JI (1993) Postmortem chemistry update. Am J Forensic Med Pathol 14:92–117.

6. Apêndice



Figura A1 - Loading plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h, 24h e 48h em murganhos machos.



Figura A2 - Loading plot do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h, 24h e 48h em murganhos machos.



Figura A3 - Loading plot do PC1 e PC2 relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h, 24h e 48h em murganhos fêmeas.



Figura A4 - Loading plot do PC1 e PC3 relativo à comparação dos intervalos post mortem 0h, 24h e 48h em murganhos fêmeas.