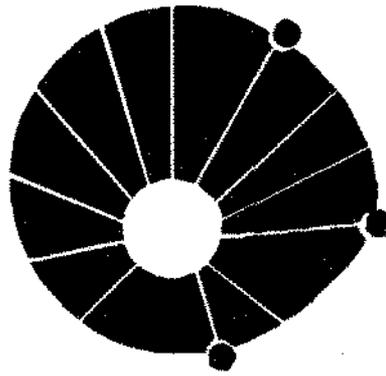


FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



UNICAMP

PAULO CESAR GAIOTTO
MÉDICO

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESTIMATIVA DO TEMPO
DECORRIDO DE MORTE ATRAVÉS DA DOSAGEM DE
ÍONS POTÁSSIO NO HUMOR VÍTREO**

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO DARUGE

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba
da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do
grau de Mestre em Ciências,
Área de Odontologia Legal e
Deontologia.

*Este exemplar foi doado -
sem corrigido conforme
resolução C.P.R.G. 036/83.
Piracicaba, 13 de fevereiro de 1998.
Eduardo Daruge*

G128c

33017/BC

PIRACICABA

- 1997 -

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
- UNICAMP-**

**PAULO CESAR GAIOTTO
MÉDICO**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESTIMATIVA DO TEMPO
DECORRIDO DE MORTE ATRAVÉS DA DOSAGEM DE
ÍONS POTÁSSIO NO HUMOR VÍTREO.**

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO DARUGE

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Área de Odontologia Legal e Deontologia.

**PIRACICABA
- 1997 -**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

9805784

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	G. 1028c
V.	Ex.
TEMPO BC/	3201f
PROC.	395798
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/03/98
N.º CPD	

CM-00106579-1

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

GAIOTTO, PAULO CESAR

G. 1028c

M.48c CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESTIMATIVA DO TEMPO DECORRIDO DE MORTE ATRAVÉS DA DOSAGEM DE ÍONS POTÁSSIO NO HUMOR VÍTREO. / Paulo Cesar Gaiotto - Piracicaba : [S.N.], 1997.

86 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Daruge

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba

I. Estimativa do Tempo 2. Íons Potássio 3. Humor Vítreo

I. Daruge, Eduardo

II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título

19.CDD-573.6

Índice para catálogo Sistemático

1. Estimativa do Tempo 573.6
2. Íons Potássio 572.2
3. Humor Vítreo



UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 11/12/97, considerou o candidato aprovado.

1. Eduardo Daruge

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

2. Roberto José Gonçalves

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

3. Miguel Morano Júnior

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

DEDICO ESTE TRABALHO

- * A minha esposa, Cláudia, e meu filho, Matheus, pelo carinho e afeto sempre presentes

- * A minha mãe, Henriette, pela compreensão e apoio que tem a mim devotado

- * Ao meu pai, Osmar (*in memoriam*), pelos ensinamentos e mensagens a mim transmitidos.

- * Ao meu irmão, Osmar, por tudo o que juntos passamos e superamos e pelo que ainda iremos passar, e com certeza, juntos, superar...

- * As minhas queridas e adoráveis irmãs, Marise, pelo carinho dispensado durante todos estes anos; e Mara, pelo esforço e trabalho dispensados a mim, fundamentais para a realização deste estudo.

- * Aos meus amigos: Hermínio, Lígia, Renato, Maitê, Wilder e Kátia pelo estímulo constante.

Ao Professor

Dr. Eduardo Daruge

Pela orientação e paciência a mim dispensados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

a **DEUS**

por iluminar o meu caminho

AGRADECIMENTOS

* À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. José Ranalli e Diretor associado, Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.

* Ao Prof. Dr. Mário Fernando de Góes, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

* Ao amigo Prof. Dr. Roberto José Gonçalves, Professor Titular deste Curso de Pós-Graduação desta Faculdade pelas horas a mim dispensadas.

* Aos demais Professores do Curso de Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia pela confiança e apoio a mim depositados.

* À Bibliotecária Sueli Duarte Oliveira Soliani, pela presteza e atenção na revisão da literatura deste trabalho.

* À Srta. Érika Buzeto e demais assessores da Comissão de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pelos muitos préstimos a mim ofertados

* À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) que contribuiu e possibilitou a realização do presente trabalho.

* Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal e Deontologia pelas horas de conforto e pela amizade a mim demonstrada, em especial as queridas amigas **Dinoly Albuquerque Lima e Célia Regina Manesco.**

* Aos amigos desta Faculdade, que muito me ajudaram para a conclusão deste trabalho:

* Luiz Franceschini Júnior, Mestre em ciências.

* Daniela Miekko Abe, Estagiária.

* A minha prima, Eliana, pelo estímulo constante

* Meus sinceros agradecimentos a todos que direta e indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULOS	pg
LISTAS	01
RESUMO	03
INTRODUÇÃO	06
REVISTA DA LITERATURA	13
PROPOSIÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS OBTIDOS	35
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	43
CONCLUSÕES	53
APÊNDICE	55
SUMMARY	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86



LISTAS

LISTAS

I - FIGURAS

NÚMERO	ASSUNTOS	PÁGINA
1	Aspecto geral da cabeça do coelho.	30
2	Aspecto geral do local de punção da agulha, para coleta de humor vítreo	32

II - GRADES

NÚMERO	ASSUNTOS	PÁGINA
I	Dados obtidos da amostra após 2 horas	37
II	Dados obtidos da amostra após 4 horas	38
III	Dados obtidos da amostra após 6 horas	39
IV	Dados obtidos da amostra após 8 horas	40
V	Dados obtidos da amostra após 10 horas	41

III - TABELAS

NÚMERO	ASSUNTOS	PÁGINA
1	Quadro de análise de variância	65
2	Valores de R^2 e coeficiente de variação para o modelo adotado	67
3	Resultado do teste de Tukey	68
4	Quadro de análise de variância dos modelos de Regressão estudados	71
5	Quadro de análise de variância dos modelos de Regressão estudados	72
6	Resultado da análise de variância para o estudo de regressão linear	75
7	Parâmetros estimados segundo modelo linear	76

IV - GRÁFICOS

NÚMERO	ASSUNTOS	PÁGINA
1	Linha de Regressão interpolada pela Regressão Linear	78
2	Linha de Regressão interpolada pela Regressão Linear	79



RESUMO

Este estudo constituiu-se na determinação da concentração de íons potássio no humor vítreo de coelhos, e sua correlação na estimativa do tempo decorrido de morte.

Procedemos à coleta sistematizada de humor vítreo de 40 coelhos, submetidos ao mesmo mecanismo de morte (traumatismo crânio - encefálico seguido de decapitação), e retirada do humor vítreo em intervalos de 2/2 horas até 12 horas "*post-mortem*".

Realizamos a dosagem de íons potássio através da técnica de fotometria de chama, sendo submetido os resultados à análise estatística.

Concluimos que existiu variação de íons potássio em relação ao tempo decorrido de morte, sendo esta estatisticamente significativa.

Porém, este aumento dos níveis de íons potássio no humor vítreo responderam por apenas 13% da variação de tempo, sendo que os outros 87% não foram determinados por este experimento.

Entretanto, a determinação de íons potássio no humor vítreo, associado a outros fatores, pode ser um elemento objetivo importante na estimativa do tempo decorrido de morte.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESTIMATIVA DO TEMPO DECORRIDO DE MORTE ATRAVÉS DA DOSAGEM
DE ÍONS POTÁSSIO NO HUMOR VÍTREO.
INTRODUÇÃO

6



INTRODUÇÃO

O fenômeno morte e sua importância forense, demonstrada através da Tanatologia, é objeto de análise cotidiana na atividade Médico-Legal e Odontologia-Legal.

Não obstante ser difícil o próprio diagnóstico da morte, motivado pela falta de conceitos e definições satisfatórias, e sendo esta um processo dinâmico, com participação de fenômenos físico-químicos responsáveis por sua progressão, havendo portanto a necessidade de se realizar uma análise completa de todos os sinais que a compõem, a determinação de sua cronologia (denominada cronotanatognose) é matéria controversa e intrigante, pela inexistência de método único que a determine com precisão, SCHELEYER³⁸, 1963.

INTRODUÇÃO

No período imediatamente posterior à morte, com a cessação do metabolismo energético celular, inicia-se o processo denominado autólise, responsável esta pela dissolução da integridade química, física e morfológica do corpo. A falência energética é responsável pela cessação do transporte ativo da membrana celular e perda da permeabilidade seletiva desta, iniciando-se a difusão de íons de acordo com os seus gradientes de concentração nos diferentes tecidos corpóreos.

O tempo de processo autolítico é determinado por vários fatores, entre eles: fatores anatômicos locais (globo ocular, esôfago, estômago), peculiaridades específicas de células e tecidos, fatores bioquímicos (sobretudo glicólise), fatores "ante" e "post-mortem", influenciando o meio corpóreo, especialmente temperatura e pH, COE¹², 1980.

A atividade supravital, reações supravitais, conforme preconiza SCHLEYER³⁸, 1963, é denominada como fenômenos vitais ou biologicamente explicáveis, que são constatados durante o processo de morte. A duração da atividade supravital varia consideravelmente em diferentes tecidos idênticos, em localizações topográficas distintas, devido aos depósitos energéticos e velocidade de glicólise diversos. Como resultado, o ponto de partida do processo autolítico, bem como, a velocidade deste, variam consideravelmente entre diferentes tecidos, tecidos idênticos em diferentes topografias e inter-individualmente, MADEA *et al.*³², 1989.

Portanto, estas conclusões devem ser consideradas em processos autolíticos dependentes do tempo decorrido de morte. Sem estrita diferenciação das estruturas investigadas, o local de coleta do tecido, e fatores “*ante*” e

"*post-mortem*" (sobretudo temperatura e pH), a margem de erro do parâmetro autolítico investigado aumentará consideravelmente, quanto maior for o intervalo "*post-mortem*", SCHLEYER³⁸ 1963 e COE¹² 1980.

O humor vítreo se revela como um meio importante para o estudo de concentração de íons "*post-mortem*", por diversos motivos, entre eles: topografia isolada e anatomicamente bem protegida, no interior do globo ocular, sobretudo se compararmos com o sangue e líquido cefalorraquidiano, como por exemplo, resistência prolongada à contaminação microbiológica por degradação bacteriana, HARPER²⁴, 1989; estrutura bioquímica peculiar, sendo um fluido intra-ocular colóide, com poucas células, e ausência de vascularização, WURSTER *et al.*⁴¹, 1985, BALAZS *et al.*³, 1984, BERMAN *et al.*⁴, 1970; facilidade de obtenção de amostras e contra-provas, com processamento laboratorial economicamente acessível e de metodologia simples.

O mais importante parâmetro estudado é o potássio, havendo difusão "*post-mortem*" da retina e, de maneira menos expressiva, do cristalino, para o corpo vítreo, BITO⁵, 1970. Experimentos em animais têm demonstrado que o metabolismo supravital pode ser mantido por até 15 minutos, a 37°C. Durante a vida, existem graus de concentração entre os diversos compartimentos intra-oculares, com um influxo de potássio através do corpo ciliar e cristalino por transporte ativo celular, e vítreo para a retina por difusão, pois a concentração de potássio do humor vítreo é maior do que a do plasma. No período "*post-mortem*", o gradiente de potássio na interface vítreo-retineana se inverte, pela parada do transporte ativo do cristalino, havendo posteriormente equilíbrio por difusão, BITO⁶, 1977.

Neste estudo pretendeu-se realizar a análise quantitativa de potássio em humor vítreo de coelhos,

objetivando determinar a real importância destes íons na estimativa do tempo decorrido de morte.

Concentramos nosso estudo ao período imediatamente posterior à morte e até 10 horas após esta, devido ao maior interesse Médico-Legal deste intervalo, e controvérsias de outros estudos à respeito deste período.



REVISTA DA LITERATURA

Primeiramente, relacionaremos os principais autores que se preocuparam com os estudos de íons potássio nos compartimentos intra-oculares de coelhos e, em seguida, aqueles que dedicaram os estudos na concentração de íons potássio no humor vítreo humano e sua correlação com o intervalo "*post-mortem*".

O potássio nos compartimentos intra-oculares de coelhos

REDDY e KINSEY³⁶ (1960), através da fotometria de chama, obtiveram valores de potássio no corpo vítreo de coelhos albinos entre 37,0 e 74,5mg%, sendo bem superiores às do humor aquoso e sangue, valores estes bem superiores aos encontrados em humanos, e não conseguiram estabelecer concentração do potássio no humor vítreo.

CASTREN e LAAMANEN¹¹ (1996), obtiveram valores médios de 27,8mg%, e PRESTE e TRAVERSO³⁵ (1966) relataram média de 20mg%, através da fotometria de chama.

BOTING *et al.*⁹ (1963), estudando o transporte catiônico no cristalino de coelho, vitela e gato, encontraram quantidades significativas, no epitélio do cristalino, e em menor quantidade na cápsula e processos ciliares, de sódio e potássio, ativados pela ATPase.

FOWLKS²⁰ (1963), estabeleceu que substâncias de peso molecular baixo movimentam-se no sentido do corpo ciliar para o disco óptico.

BITO e DAVSON⁷ (1964) encontraram valores médios para coelhos albinos de 22mg% de potássio na câmara posterior, 17mg% na câmara anterior, 20,5mg% no vítreo anterior e 19mg% no vítreo posterior, determinando estas diferenças pela ação do cristalino, como mantenedor de

gradiente de concentração entre o humor aquoso e o humor vítreo.

PRESTE e TRAVERSO³⁵ (1966), através do estudo de coelhos albinos encontraram valores de potássio de $5,14 \pm 0,16$ mEq/l no humor vítreo imediatamente após a morte, e que a concentração de potássio aumentou em um período de 24 horas após a morte, e explicaram este fato pela participação de fenômenos autolíticos.

KOMURA e OSHIRO²⁸ (1977), analisaram 30 amostras de humor aquoso, e vítreo de coelhos, através de exames periódicos mantendo-os em temperaturas de 2° C, 6°C, 23°C e 27°C e demonstraram que não houve variações significativas entre diferentes temperaturas, para os valores de potássio no humor aquoso e vítreo.

HONDA *et al.*²⁵ (1983), através da análise em coelhos albinos, determinaram as concentrações de sódio, potássio,

magnésio e cálcio, antes e depois da extração de humor vítreo através da técnica de vitrectomia posterior, e sugerem que a variação dos valores iônicos é decorrente de gradientes de concentração entre o corpo vítreo e tecidos adjacentes, sendo a parede posterior do globo ocular a via principal. Demonstraram que o transporte ativo de íons, pelo corpo ciliar, contribui para o equilíbrio iônico.

Concentração de íons potássio no humor vítreo humano e sua correlação com o intervalo “*post-mortem*”

A correlação entre o aumento da concentração de íons potássio no humor vítreo e o tempo estimado de morte tem sido estudado por diversos autores (COE¹³, 1989).

JAFFE²⁷ (1962), através da análise de humor vítreo (36 amostras) de 31 cadáveres (excluindo-se casos de uremia e distúrbios eletrolíticos), em intervalos “*post-mortem*” de até

125 horas, com idades entre 17 e 81 anos, determinou que a concentração de íons potássio apresenta relação aritmética, de aumento com o decorrer do intervalo "*post-mortem*", e atribui este fato à difusão do potássio das células retinianas para o interior do corpo vítreo. Verificou não haver diferenças estatisticamente significativas entre cadáveres mantidos refrigerados ou em temperatura ambiente.

ADELSON *et al.*¹(1963), determinaram a existência de uma relação estreita entre o potássio vítreo e o intervalo "*post-mortem*", dentro das primeiras 24 horas após a morte, analisando 349 amostras de humor vítreo de 209 cadáveres.

STURNER⁴⁰ (1963), através da análise de 54 cadáveres em IPM superior à 108 horas, excluindo casos em que o fluido intra-ocular apresentou-se manchado, turvo ou contendo partículas, e encontrou relação aritmética, chegando à fórmula $IPM = 7,14 \cdot \{K+\} - 39,1$, com coeficiente de

correlação $(r) = 0,987$, e intervalo de 95% de limite de confiança de $\pm 9,5$ horas.

HUGHES²⁶ (1965), através da análise de 135 cadáveres em IPM de ± 20 horas, estabeleceu que o aumento de potássio não pode ser correlacionado com consistência suficiente com o IPM.

HANSSON *et al.*²³ (1966), analisando 203 cadáveres com IPM de 3-310 horas, estabeleceu um intervalo de confiança de 95% de ± 40 horas; e em 180 casos com IPM superior a 120 hpm, houve aumento linear do potássio vítreo; e que após 48 horas da morte, houve grande dispersão nos valores de potássio; e que idade, sexo e raça não exerceram influência nos resultados, ao contrário da duração do período agônico, que poderia influenciar os resultados.

MARTCHENCO³³ (1966), através da análise de 300 amostras vítreas "*post-mortem*", com IPM entre 6 e 48 horas,

encontrou valores diferentes, dependendo da causa e tipo de morte, e não apresentou variação quanto ao sexo, idade e condições de conservação dos corpos.

LIE³¹ (1967), em 88 amostras com IPM entre 2 e 95 horas, não observou diferenças significativas entre os dois olhos, refrigeração do cadáver, e relata as principais causas de erro na determinação da concentração de potássio vítreo: aspiração de humor vítreo menor que 0,5 ml (devido à distribuição irregular do potássio no corpo vítreo), aspiração forçada (que levaria à sucção de células retinianas, aumentando os níveis de potássio da amostra) e a possível mistura de sangue ou humor aquoso ao humor vítreo, devido à sucção por agulha em local não apropriado.

LEAHY e FARBER³⁰ (1967), pela análise de 52 cadáveres em IPM de até 30 horas, de pacientes hospitalizados que faleceram no momento de entrada no hospital,

determinaram que a concentração de potássio vítreo aumenta de maneira dispersa, não apresentando significância estatística.

COE¹⁵ (1969), analisou 160 amostras de pacientes hospitalizados, com mortes súbitas ou violentas e sem antecedentes de distúrbios eletrolíticos, com IPM até 100 hpm, e observou grande variação individual, de padrão aritmético.

KRAUSE *et al.*²⁹ (1971), através da análise de 262 amostras em IPM de até 230 horas, estabeleceram um aumento exponencial de potássio, determinando as equações $\{K^+\} = 2,96 + 1,65 \cdot VH$ ou $h = (\{K^+\} - 2,96) / 1,65$, com coeficiente de correlação $(r) = 0,7$, e sugeriram que o emprego de vários métodos levaria à uma estimativa mais precisa do IPM.

ADJUDANTIS e COUTSELINIS² (1972), em análise de 120 olhos, com IPM de até 120 horas, dividido em intervalos

de 3 horas, através de avaliação dos dois olhos, não revelaram diferenças estatisticamente significativas, bem como, em fatores como causa de morte, idade e sexo, detectando em aumento linear da concentração de íons potássio neste IPM de 120 horas.

KOMURA e OSHIRO²⁸ (1977), em análise de 90 amostras com IPM de 30 horas, estabeleceram correlação linear entre potássio vítreo e IPM, com a variação, sendo maior em temperaturas de 26-29° C do que em 13-17° C.

GREGORI *et al.*²² (1978), em amostra de 47 cadáveres, utilizando o método de espectrofotometria de absorção atômica, determinaram que este pode ser um método mais precioso para estimativa do tempo de morte do que a espectrofotometria de chama, estabelecendo também uma correlação linear de aumento da concentração do potássio vítreo e o IPM.

FOERCH *et al.*¹⁸ (1979), em análise de 50 amostras de humor vítreo, estabeleceram correlação linear entre potássio vítreo e IPM, mesmo resultado obtido por BLUMENFELD *et al.*⁸, 1979, na análise de 127 amostras de crianças entre 1 ano e 13 anos, com IPM de 11-17 horas, e FORMAN e BUTTS²⁰, 1980, na análise de 82 amostras de humor vítreo.

FARMER *et al.*¹⁷ (1985), analisando concentrações de cálcio, sódio, potássio e magnésio em IPM 24-120 horas, referiram correlação ($r = 0,98$) entre os íons K^+ e IPM, e destacam que influências externas e variações biológicas individuais trazem limitações ao método.

MADEA *et al.*³² (1989), em 405 amostras com IPM de 130 horas, divididas em 03 grupos, sendo o grupo I o total de amostras, o grupo II com níveis de uréia no humor vítreo $>100\text{mg}\%$ e episódio terminal menor que 6 horas e grupo III, com uréia $>100\text{mg}\%$ no humor vítreo, e concluíram que existe

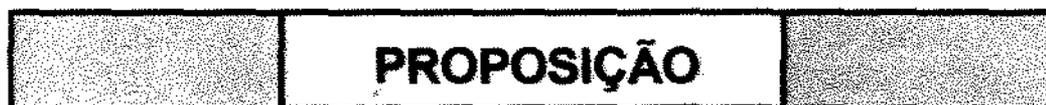
variações estatisticamente significativas entre os dois olhos, bem como, os índices de uréia $<100\text{mg}\%$ como sendo o mais preciso padrão para análise de distúrbio eletrolítico, prévio à morte que possa interferir nos níveis de potássio vítreo "post-mortem", melhorando o limite de confiança de 95% na análise do potássio vítreo e sua conelação com IPM.

SPARKS *et al.*³⁹ (1989), em análise de 91 amostras com IPM de 60 horas, juntamente com os níveis de 3-methoxy-tyramine (3-mt) do putamen cerebral, determinaram que as análises conjuntas destes 2 fatores melhora a estimativa de tempo decorrido de morte.

MONTALO *et al.*³⁴ (1989), em análise de 289 amostas com PMI de 80 horas, estabeleceram intervalos de ± 8 a ± 23 horas com 95% de confiança, de acordo com os vários sub-grupos estudados (idade, sexo, tipo de morte, condições climáticas).

GAMERO *et al.*²¹ (1990), em 60 amostras com IPM de 24 horas, determinaram a melhor correlação entre o potássio e IPM em casos de morte menor que 17 horas.

ROGNUM *et al.*³⁷ (1991) em 87 amostras com IPM de 120 horas, realizando retiradas repetidas (duas vezes por olho) em temperaturas diversas (5°C, 10°C, 15°C, e 23°C), determinaram que quanto maior a temperatura ambiente, maior será a velocidade de aumento dos níveis de potássio vítreo.



PROPOSIÇÃO

A despeito dos inúmeros estudos descritos na literatura sobre o tema, a nossa pretensão constitui-se em realizar um estudo experimental em coelhos, controlando-se ou reduzindo-se as variáveis que pudessem interferir, como por exemplo idade, tipo de morte, eventos "*ante-mortem*", temperatura, sexo, para se determinar a real importância dos íons potássio no humor vítreo, como determinante de estimativa do tempo decorrido de morte.

	MATERIAL E MÉTODOS	
--	---------------------------	--

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra utilizada em nosso experimento constituiu-se de 40 coelhos albinos da raça NORFOLK, linhagem Botucatu, com idade de 40 dias, sendo 20 fêmeas e 20 machos, peso entre 900g e 1150g, recém-desmamados, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista.

Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento de morte, sendo traumatismo crânio-encefálico, por instrumento contundente, isto é, um pedaço de madeira na região occipital, seguido de decapitação com um instrumento cortante, uma faca, anotando-se o exato momento da hora do óbito. (figura 1)



Figura 1 - Aspecto geral da cabeça do coelho.

Constituíram-se, então, 05 grupos, cada um com oito animais, sendo 04 machos e 04 fêmeas, sendo os coelhos devidamente identificados através de fita adesiva, individual numeradas de um a quarenta, anotando-se, os respectivos grupos e sexo, realizando-

se, no momento do óbito, a coleta de humor vítreo, do olho direito de todos os 40 animais e, a seguir, em intervalos de 2 horas (grupo I), 4 horas (grupo II), 6 horas (grupo III), 8 horas (grupo IV) e 10 horas (grupo V), "*post-mortem*", foram realizadas as coletas de humor vítreo do olho esquerdo; mantendo-se os mesmos à temperatura ambiente (26-29 °C), até a hora da coleta das amostras de cada grupo.

A técnica de coleta de humor vítreo utilizada, descrita por COE¹⁵, em 1969, foi realizada através de punção a 3mm do limbo esclero-corneano, com uma agulha de calibre 13x4,5 (26 ½ Gauge) acoplada a uma seringa de 3,0 ml, devidamente esterilizados, com aspiração lenta e gradual, de cerca de 0,3 a 0,5 ml de humor vítreo, para se evitar contaminação do espécime com fragmentos de retina ou outras partículas, sendo a

agulha introduzida integralmente no globo ocular, atingindo, o bisel, o centro do mesmo, obtendo-se desta maneira apenas amostras incolores de humor vítreo (Figura 2). A coleta deste material foi sempre analisada, a olho nú, com auxílio de lupa, para se evitar a presença de outras substâncias orgânicas ou até mesmo sangue.

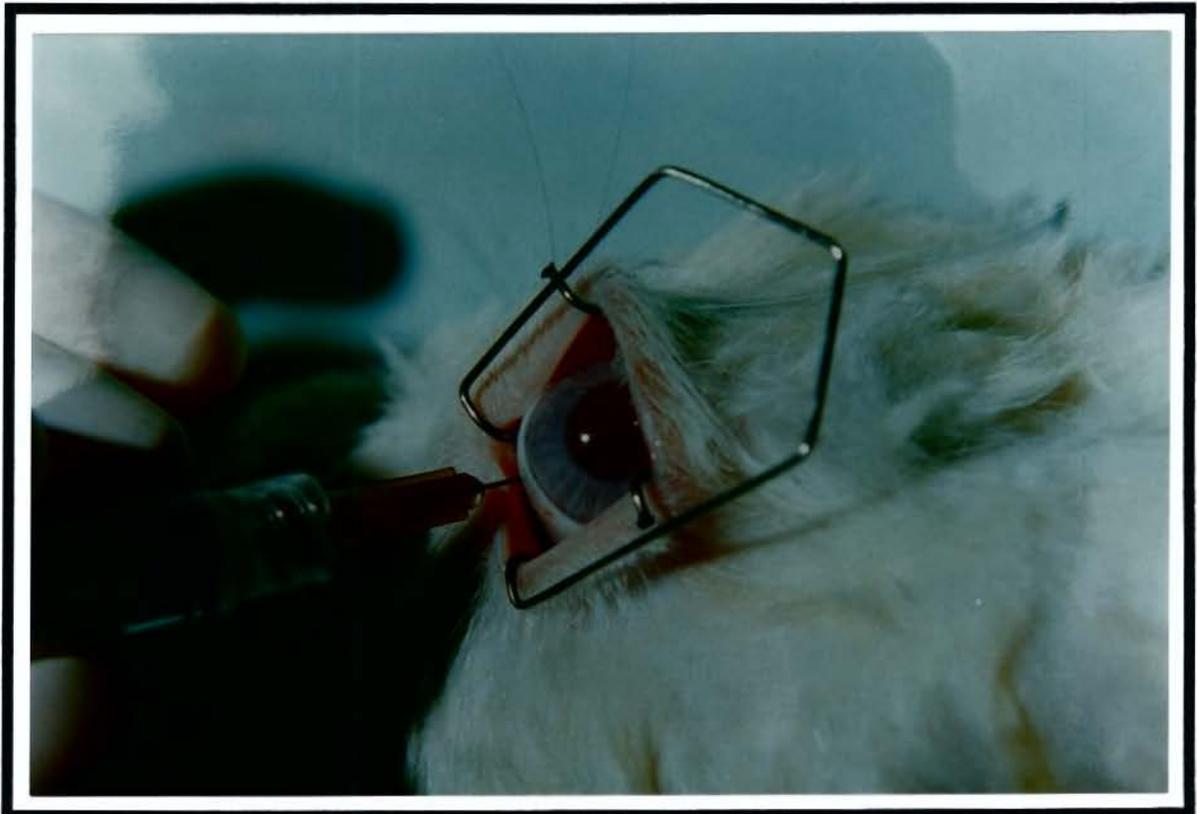


Figura 2 - Aspecto geral do local de punção da agulha, para coleta do humor vítreo.

As amostras foram mantidas em tubos de ensaio, centrifugadas e congeladas em -70°C até o momento de serem analisadas.

A análise foi feita através da metodologia padronizada por BURINI e CAMPANA¹⁰ (1970), a qual consiste em diluir 1,00 ml de humor vítreo em balão volumétrico de 10 ml, completando-o, até a marca, com água deionizada, sendo as amostras previamente centrifugadas a 1.500 r.p.m., por 05 minutos em Centrífuga Ciclo C II da marca REVAN.

As leituras foram realizadas em fotômetro de chama, tipo CORNING 400, com o filtro seletor na posição de K, atomizando-se a solução padrão Tritisol Merck (9976), e a solução diluente com água deionizada para ajuste das escalas do fotômetro, e, em seguida, atomizou-se a escala e multiplicou-se pela diluição para se obter o resultado em mEq/l.

Devido à solução padrão Tritisol 9976 da Merck apresentar o valor da amostra em mg% utilizou-se da seguinte fórmula para se obter o valor da amostra em mg%:

$$\text{mg\%} = \text{mEq/l} \div 0,25 \text{ (K)}$$

	RESULTADOS OBTIDOS	
--	---------------------------	--

RESULTADOS OBTIDOS

Os valores obtidos estão expressos nas grades a seguir, onde:

- Nº número da etiqueta adesiva responsável pela
 identificação do coelho.
- G número do grupo.
- F fêmea
- M macho
- V amostra do humor vítreo
- OD olho direito
- OE olho esquerdo
- K+ concentração de íons potássio obtida na
 amostra de humor vítreo, em mg%.

Grade I - Dados obtidos da amostra após 2 horas

Grupo I - Potássio - mg%						
				÷ 0,25		÷ 0,25
		Amostra	Hora (O . D.)	K ⁺ (O . D.)	Hora (O . E.)	K ⁺ (O . E.)
		V	8h25min	42,0	10h25min	60,0
		V	8h28min	52,0	10h28min	80,0
		V	8h30min	34,0	10h30min	92,0
		V	8h32min	36,0	10h32min	56,0
		V	8h37min	34,0	10h37min	45,6
		V	8h39min	32,0	10h39min	44,0
		V	8h41min	36,8	10h41min	68,0
		V	8h43min	34,0	10h43min	76,0

Grade II - Dados obtidos da amostra após 4 horas

			÷ 0,25		÷ 0,25
	Amostra	Hora (O . D.)	K ⁺ (O . D.)	Hora (O . E.)	K ⁺ (O . E.)
	V	7h33min	44,0	11h33min	44,0
	V	7h35min	34,0	11h35min	56,0
	V	7h37min	38,4	11h37min	52,0
	V	7h39min	25,6	11h39min	44,0
	V	7h41min	48,0	11h41min	44,0
	V	7h43min	44,0	11h43min	44,0
	V	7h45min	38,0	11h45min	48,0
	V	7h47min	44,0	11h47min	48,0

Grade III - Dados obtidos da amostra após 6 horas

			÷ 0,25		÷ 0,25
	Amostra	Hora (O . D.)	K ⁺ (O . D.)	Hora (O . E.)	K ⁺ (O . E.)
	V	8h05min	30,0	14h05min	44,0
	V	8h07min	36,4	14h07min	80,0
	V	8h10min	33,6	14h10min	80,0
	V	8h11min	32,8	14h11min	80,0
	V	8h14min	48,0	14h14min	84,0
	V	8h19min	52,0	14h19min	84,0
	V	8h20min	34,0	14h20min	68,0
	V	8h22min	34,0	14h22min	76,0

Grade IV - Dados obtidos da amostra após 8 horas

Grade IV - Resultados						
			÷ 0,25			÷ 0,25
		Amostra	Hora (O . D.)	K ⁺ (O . D.)	Hora (O . E.)	K ⁺ (O . E.)
		V	7h50min	33,6	15h50min	66,4
		V	7h51min	32,4	15h51min	64,0
		V	7h53min	26,8	15h53min	56,0
		V	7h55min	37,2	15h55min	56,0
		V	7h57min	36,8	15h57min	52,8
		V	7h59min	31,6	15h59min	52,0
		V	8h01min	38,0	16h01min	42,0
		V	8h03min	30,0	16h03min	34,0

Grade V - Dados obtidos da amostra após 10 horas

Grupo 5 - Potássio (mEq)					
			÷ 0,25		÷ 0,25
	Amostra	Hora (O . D.)	K ⁺ (O . D.)	Hora (O . E.)	K ⁺ (O . E.)
	V	7h	37,6	17h	108,0
	V	7h13min	35,2	17h13min	88,0
	V	7h15min	64,0	17h15min	96,0
	V	7h20min	36,8	17h20min	64,0
	V	7h22min	36,0	17h22min	108,0
	V	7h25min	28,0	17h25min	60,0
	V	7h27min	44,0	17h27min	80,0
	V	7h30min	60,0	17h30min	92,0

1. ANÁLISE ESTATÍSTICAS EFETUADAS (VIDE APÊNDICE).

1.1 Análises preliminares: para se aplicar medidas que vieram, a melhorar os resultados obtidos, para a análise de variância e estudo de regressão.

1.2 Análise de Variância: pretendeu-se determinar quais os fatores que afetaram o acúmulo de íons potássio no humor vítreo, sendo detectado um único fator, sendo este o tempo decorrido de morte.

1.3 Estudo de Regressão: visou explicar o comportamento da variação do teor de potássio de acordo com o tempo decorrido de morte, e a montagem de uma equação para determinação do tempo decorrido de morte, quantificando deste modo a quantidade de variação (IX^2), referente ao íons potássio.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A utilização do humor vítreo, através do estudo da concentração de íons potássio, na estimativa do tempo decorrido de morte, vem sendo analisada desde os trabalhos pioneiros de JAFFE²⁷ (1962) e SCHLEYER³⁸ (1963), relatando estes, as vantagens deste, em relação aos demais fluidos corpóreos.

A correlação entre o aumento da concentração de íons potássio e o tempo decorrido de morte têm sido estabelecida por diversos autores, sendo, para alguns, aritmético; para outros, exponencial; inexistindo qualquer tipo de aumento, para outros; e, para a maioria, sendo linear.

Existe consenso de que o método deve ser utilizado com reservas, devido à grande dispersão dos valores encontrados, sobretudo em intervalos longos "*post-mortem*".

Os resultados mais expressivos foram os alcançados por STURNER⁴⁰ em 1963, em um estudo controlado de 54 cadáveres em IPM superior a 100 horas, com limites de confiança de 95%, na concentração de potássio de $\pm 9,5$ horas; sendo o aumento linear, e descrito pela regressão:

$$[K^+] = 5.476 + 0.14 h \quad \text{ou} \quad R = 7.14 [K^+] - 39,1$$

Entretanto, investigações posteriores não confirmaram este intervalo de confiança de 95%, e sim, uma variação muito ampla, com diferenças entre mortes súbitas e agônicas, tendo a duração do episódio terminal grande influência para ADELSON *et al.*¹ em 1963. Portanto, este é o principal obstáculo para a utilização da concentração de íons potássio no humor vítreo, como estimativa do tempo decorrido de morte.

Diversos motivos para os diferentes parâmetros de regressão têm sido identificados:

1) A duração do episódio terminal (período entre o início do óbito e o seu término);

2) A composição das amostras em estudo, de acordo com o tipo de óbito (mortes súbitas, casos patológicos, etc.);

3) Velocidades diferentes de aumento da concentração de íons potássio no humor vítreo, de acordo com os níveis de uréia (indicador de distúrbios eletrolíticos prévios ao óbito);

4) Temperatura ambiente;

5) Possível influência do álcool no momento da morte;

6) Estudos com diferentes IPM;

7) Instrumentos utilizados para medir a concentração de íons potássio;

8) Idade (a concentração de íons potássio no humor vítreo, "*post-mortem*", aumenta mais rapidamente em crianças do que em adultos, provavelmente pelo menor diâmetro do globo ocular infantil).

Nosso modelo de estudo experimental visou eliminar o maior número possível destes fatores que pudessem influenciar na análise de regressão, através de:

1) Análise em animais de mesma espécie, raça, idade, sem diferenças estatisticamente significativas com relação ao sexo, olho estudado e, ao tipo de óbito;

2) Padronização da técnica de coleta de humor vítreo, sendo efetuada pelo mesmo indivíduo, com utilização de materiais descartáveis e esterilizados;

3) Padronização precisa dos IPM, sendo cada amostra retirada em intervalos estritos, em relação ao olho do lado oposto.

4) Padronização da técnica de determinação da concentração de íons potássio, com utilização dos mesmos instrumentos utilizados, e realizados pela mesma pessoa.

Manutenção dos corpos no mesmo local, e a mesma temperatura ambiente.

Através destes parâmetros, com diminuição das possíveis variáveis, objetivamos demonstrar se a concentração de íons potássio no humor vítreo alterava de maneira estatisticamente significativa, e quantificar, através do valor de R^2 , o real papel do acúmulo de íons potássio na estimativa do tempo decorrido de morte.

Na análise de variância, pretendia-se determinar quais eram os fatores que afetavam o acúmulo de íons potássio no humor vítreo; foi detectado um único fator cujo efeito pôde ser estudado, sendo este, o tempo decorrido após a morte, e apresentando este, variação estatisticamente significativa ($P < 0,01\%$), com valor de R^2 de 0.591325, mostrando que o fator tempo foi responsável por 60% da variação do teor de potássio, sendo os restantes 40%, não explicados, portanto,

atribuídos ao acaso. O coeficiente de variação de 19.39024 foi um pouco alto para um experimento em laboratório, mas que pôde ser justificado pela influência de fatores biológicos que não foram efetivamente controlados.

O primeiro estudo de regressão, para explicar o comportamento da variação do teor de potássio de acordo com o tempo, pelas análises através do sistema SAS, recomendou a regressão linear, mostrando que esta é significativa ao nível pré-estabelecido de 5% (Prob>F = 0,0219), o que permitiu montagem de equação e a determinação do tempo decorrido após a morte, a partir dos valores de $[K^+]$ no humor vítreo, sendo esta:

$$\text{Tempo} = 2,511195 + 0,213317 [K^+]$$

Esta equação, apesar de estatisticamente significativa, e permitir a estimativa dos valores de tempo decorridos de morte obtido em função dos teores de potássio

encontrados, mostrou um R^2 muito baixo (13,07), significando que apenas 13% da variação observada nos dados pôde ser atribuída ao teor de potássio no humor vítreo, e que, portanto, grande parte da variação permaneceu sem causa contemplada pelo modelo.

Infelizmente, por ser este um estudo conduzido em modelo experimental, inédito sob este ponto de vista na literatura, não pudemos comparar os resultados obtidos, visto os demais serem realizados em seres humanos, e sem o controle de variáveis, as quais foram o objetivo deste.

Finalmente, acreditamos que para se realizar uma estimativa mais precisa do tempo decorrido de morte, será possível somente com um conjunto de métodos e técnicas, aplicadas aos diversos líquidos biológicos e entre estes, o humor vítreo.

Sem dúvida, a análise completa dos íons correlacionados ao potássio intra-ocular durante o processo

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

de autólise, entre eles o sódio, fosfato inorgânico, cloro, cálcio, magnésio, bem como, de outras substâncias (hormônios, enzimas, produtos do metabolismo proteico e carboidratos), contribuirão sobremaneira na melhoria dos índices de R^2 demonstrados neste estudo, diminuindo desta forma, os intervalos de confiança de 95% através de múltiplas análises de regressão linear, tornando mais precisa a estimativa do tempo decorrido de morte, através de análise de constituintes do humor vítreo.

A técnica de coleta de amostra de humor vítreo, preconizada no presente trabalho, pode ser executada facilmente pelo Médico-legista ou qualquer outro elemento investido na função pericial;

O método empregado para a análise dos constituintes do humor vítreo, fotometria de chama, constituiu-se de uma técnica simples, acessível a qualquer laboratório de análises clínicas, sendo economicamente viável, podendo fornecer

amostra suficiente para contraprova, mesmo algum tempo após, se devidamente armazenado;

Pelas características anatômicas do globo ocular, pode ser aplicado nas diversas condições em que se encontram os cadáveres, com resistência prolongada à contaminação microbiológica por degradação bacteriana, podendo inclusive ser utilizado como método de estimativa do tempo decorrido de morte em casos de encontro somente de segmento cefálico, conforme demonstrado por este experimento;

A presente técnica permitiu a retirada de amostra de tecidos corpóreos, neste experimento do humor vítreo, sem danos estéticos ao globo ocular e face, minimizando, deste modo, as seqüelas e traumatismos indesejáveis ao corpo que será velado, bem como, a possíveis outros exames, como por exemplo, exumação cadavérica, eventualmente realizados posteriormente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do presente trabalho, obtivemos a seguinte conclusão:

- A estimativa do tempo decorrido de morte pela determinação da concentração de íons potássio no humor vítreo de coelhos, apesar de um nível de correlação baixo ($R^2 = 13,07$), propiciou uma técnica de estimativa objetiva, portanto de utilidade junto às subjetivas (resfriamento corpóreo, rigidez cadavérica, hipostases, entre outras), e que, se analisado aos os demais constituintes do humor vítreo e fluidos biológicos, poderá eventualmente tornar-se muito mais precisa, como técnica de estimativa do tempo decorrido de morte.



1. Análises Efetuadas

De acordo com os objetivos determinados, optou-se pela execução de três tipos de análise, as quais são explicadas a seguir.

1.1. Análise preliminar

A aplicação da análise de variância e do estudo de regressão só pode ser feita em dados que atendam certas características. Por vezes, pressupõe-se o atendimento dessas características e chega-se a resultados equivocados já que, nem sempre elas são razoáveis em um conjunto de dados.

Para se evitar essa possibilidade, foi feito um estudo inicial visando determinar se as pressuposições necessárias para a aplicação dessas técnicas que foram atendidas. Quando as pressuposições não forem atendidas,

pode-se optar pela aplicação de técnicas que corrijam os dados e possibilitem o andamento das análises.

1.2. Análise de variância

Através da análise de variância, pretendeu-se determinar quais são os fatores que afetam o acúmulo de íons potássio no globo ocular. Para essa análise, foi detectado um único fator cujo efeito pode ser estudado, que é o tempo decorrido após a morte.

1.3. Estudo de Regressão

Por fim, foi tentado um estudo visando-se encontrar uma equação que permita determinar o tempo decorrido após a morte, através dos teores de íons potássio observados no olho.

2. Estudo preliminar

Preliminarmente, diversas características dos dados foram analisadas, com o objetivo de se aplicar medidas que viessem a melhorar os resultados obtidos na análise de variância e no estudo de regressão.

2.1. Obtenção da variável de análise

O estudo objetivou correlacionar o teor de íons potássio no olho, com o tempo decorrido após a morte do animal.

Para se alcançar esse objetivo, foram analisados os teores de íon no momento da morte do animal em um olho e, decorrido um tempo variável entre 2 e 10 horas, foi feita a determinação dos teores de potássio em outro olho.

A fim de se eliminar as diferenças observadas entre os animais, já no momento da morte (tempo 0), optou-se por trabalhar com uma única variável, calculada a partir da subtração dos teores observados, desde o momento da morte do animal, até os teores obtidos nos diferentes tempos após a morte.

O cálculo seguiu a seguinte fórmula:

$$\text{Diferença} = K+i - K+0$$

$K+i$ - Teor de potássio observado no tempo i ($i=2,4,6,8,10$);

$K+0$ - Teor de potássio observado no momento da morte do animal.

Procedeu-se dessa maneira, trabalhando-se exclusivamente com o acúmulo do íon após a morte dos animais.

Os estudos seguintes foram efetuados sobre essa nova variável denominada de "DIF".

2.2. Adequação da escala da variável

A utilização de certas ferramentas estatísticas só foram possíveis em dados que apresentassem características favoráveis.

Nesse caso, especificamente, a utilização de certas ferramentas exigiu que os dados não apresentassem valores iguais ou menores que zero.

Embora fosse esperado um acúmulo de íon potássio, o que foi observado na maior parte dos dados, em algumas observações, os teores do íon se mantiveram, ou até, se reduziram com o tempo, resultando em diferenças 0 ou menores que esse número.

Para que se aplicassem técnicas adequadas, solucionou-se o problema através adição da constante dois (2) aos dados, conforme a seguinte equação:

$$\text{Diferença 2} = \text{Diferença} + 2$$

Após essa simples operação, todos os valores 0 ou menores foram transformados em valores positivos, gerando-se com isso, a variável "DIF2". Após essa transformação dos dados, pôde-se prosseguir com os estudos preliminares.

2.3. Estudos de pressuposições

Em um primeiro estudo, efetuou-se uma análise visando a detecção de pressuposições necessárias para uma análise de variância.

Através desse estudo, notou-se que foram violadas duas pressuposições:

- Homogeneidade de variâncias;
- Escala de respostas.

A homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) foi observada quando os erros estimados nos grupos formados pelos fatores são “parecidos”. Nesse estudo, os erros tenderam a ser maiores conforme aumentou o tempo decorrido após a morte dos animais, ou seja, a variação foi maior nos tempos maiores.

Uma possível forma de solucionar esses problemas seria através da transformação de dados. Procedeu-se a um estudo de máxima verossimilhança o qual determinou que a transformação dos dados para as respectivas raízes quadradas seria adequada para melhorar a modelagem dos dados.

Efetuuou-se essa transformação, de acordo com a seguinte fórmula:

$$SQRTDIF2 = \sqrt{DIF2}$$

3. Análise de variância

Considerou-se, para a análise de variância, a existência de um fator ou causas de variação controlada, o chamado fator TEMPO.

O estudo permitiu concluir se o TEMPO afetava significativamente o acúmulo de potássio, ou, em outras palavras, se o teor médio de potássio diferia nos tempos.

Considerou-se que esse experimento foi casualizado em blocos, já que houve uma restrição à casualização de animais de sexos diferentes.

O delineamento disse respeito à forma de atribuição dos tratamentos aos animais. O sorteio do tempo que demoraria para que os animais fossem analisados ocorreu dentro de cada sexo.

3.1. Quadro de análise de variância

Através do teste F, mostrado no quadro de análise de variância, obteu-se um indicativo da probabilidade de erro que seria cometida no caso da rejeição da hipótese de nulidade (H_0) enunciada a seguir:

$H_0: \text{Tempo 2} = \text{Tempo 4} = \text{Tempo 6} = \text{Tempo 8} = \text{Tempo 10}$

A rejeição da hipótese de nulidade se verifica, quando o erro envolvido nessa decisão é suficientemente pequeno. Entende-se como pequeno, na maioria das pesquisas científicas, uma probabilidade de erro de até 5%.

A rejeição da hipótese de nulidade implica na aceitação de uma hipótese alternativa:

$$H_a: \text{Tempo}_i \neq \text{Tempo}_j (i \neq j)$$

Correspondendo à um indicativo de que pelo menos 2 entre os níveis testados diferem estatisticamente entre si.

O quadro de análise de variância é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Quadro de análise de variância

<u>Causa de</u>	<u>GL</u>	<u>Soma de Quadrados</u>	<u>Quadrados Médios</u>	<u>Valor F</u>	<u>Pr > F</u>
<u>Varição</u>					
Modelo	5	15.13083179	3.02616636		0.0001
Blocos	1	1.49991532			
Tempo	4	13.63091646	3.40772912	11.08	0.0001**
Resíduo	34	10.45717617	0.30756401		
Total Corrigido	39	25.58800796			

Na linha que apresenta o Tempo como causa de variação, avaliou-se o efeito desse fator sobre o teor de K⁺ no globo ocular dos animais previamente sacrificados. Na coluna rotulada como Pr > F, o valor 0,0001 indicou que a probabilidade de erro na rejeição da hipótese de nulidade (H₀) enunciada anteriormente é de 0,01 %. Como o valor foi menor que os 5% previamente estabelecidos, optou-se por rejeitar a hipótese de nulidade e aceitar a hipótese alternativa (H_a).

Essa rejeição da hipótese de nulidade nos deu fortes evidências de que havia diferença nas variações dos teores de potássio entre, pelo menos, dois dos tempos estudados.

Antes de prosseguirmos com a análise, a Tabela 2 apresenta os valores de R² e do coeficiente de variação, os quais podem nos dar indicativos da adequação do modelo adotado.

Tabela 2. Valores de R^2 e coeficiente de variação para o modelo adotado.

R² : 0.591325

C.V. : 19.39024

Através dessas estatísticas, conclui-se que o modelo estava adequado mas que poderia estar havendo a concorrência de alguma outra causa de variação. O valor de R^2 de um bom modelo deveria ser superior a 80 %, indicando que as causas de variação usadas explicam 80%, no mínimo, da variação que ocorre nos dados.

O modelo atual mostrou ser capaz de explicar aproximadamente 60% da variação observada nos dados, sendo os demais 40% não explicados, sendo atribuídos ao acaso.

O coeficiente de variação (C.V.) também foi um pouco alto para um experimento em laboratório mas que pode ser justificado pela influência de fatores biológicos que não foram tão efetivamente controlados.

3.2. Teste de Tukey

Uma vez rejeitada a hipótese de nulidade, partiu-se para um teste de comparações múltiplas que visa detectar quais são as médias que diferiam entre si.

A tabela 3 mostra o resultado do teste de Tukey.

Tabela 3. Teste da amplitude studentizada de Tukey para as raízes quadradas das diferenças(SQRTDIF2).

Alfa= 0.05 GL= 34 QMR= 0.307564 Valor crítico da amplitude studentizada = 4.072 Diferença mínima significativa = 0.7985				
Tukey Grouping		Mean	N	TEMPO
	A	3.5710	8	10
	A			
B	A	3.3243	8	6
B	A			
B	A	2.916	8	2
B				
B	C	2.5695	8	8
	C			
	C	1.9142	8	4

Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si com nível de significância de 5%

A análise do teste de Tukey revelou fortes indícios de que as médias de $[K^+]$ nos Tempos 10, 6 e 2 foram maiores que a do tempo 4. Adicionalmente, conclui-se que a média de $[K^+]$ no tempo 10 foi significativamente maior que a do tempo 8.

Conclui-se, dessa forma, que existiu uma variação no teor de potássio nos animais após a morte.

3. Estudo de regressão

O passo seguinte foi um estudo objetivando-se o ajuste de uma função matemática que explicasse o comportamento das variáveis estudadas. Esse estudo foi dividido em duas partes:

- Um primeiro estudo de regressão buscou explicar o comportamento da variação do teor de potássio de acordo com o tempo;

- No outro estudo foi ajustada uma função, buscando-se determinar o tempo decorrido após a morte a partir dos teores de potássio encontrados no globo ocular do animal.

3.1. Estudo do comportamento dos teores de K⁺ após a morte do animal.

Nesse primeiro estudo foi feita uma regressão buscando-se uma explicação da variação do teor de potássio encontrado no olho dos animais após a morte.

Para o estudo, optou-se pelo desmembramento dos 4 graus de liberdade pertencentes ao tempo nos quatro graus de regressão possíveis.

O quadro de análise de variância da regressão é listado a seguir na Tabela 4.

Tabela 4. Quadro de análise de variância dos modelos de regressão estudados.

<u>Causa de Variação</u>	<u>GL</u>	<u>Soma de Quadrados</u>	<u>Quadrados Médios</u>	<u>Valor F</u>	<u>Pr > F</u>
Modelo	5	15.13083179	3.02616636	9.84	0.0001
Blocos	1	1.49991532			
Tempo	4	13.63091646	3.40772912	11.08	0.0001**
Reg. Linear	1	3.05493773	3.05493773	9.93	0.0034**
Reg. Quadr.	1	1.96196585	1.96196585	6.38	0.0164*
Reg. Cubic.	1	0.34996492	0.34996492	1.14	0.2936
Reg. 4o.	1	8.26404796	8.26404796	26.87	0.0001**
Resíduo	34	10.45717617	0.30756401		
Total Corrigido	39	25.58800796			

Dos resultados observados na tabela 4, conclui-se que os efeitos linear, quadrático e de 4^o grau foram significativos. Apenas a regressão cúbica não foi significativa.

Com a existência de três modelos significativos, pudemos calcular as três funções que poderiam ser usadas na explicação do comportamento da variável. As três equações são listadas a seguir na Tabela 5.

Tabela 5. Quadro de análise de variância dos modelos de regressão estudados.

Grau	Equação de regressão
Linear:	Varição de K ⁺ = 2.273879647 + 0,0977 x Tempo (** R ² = 0.2241)
Quadrática:	Varição de K ⁺ = 3.200356879 - .299354555xTempo + 0.033088473xTempo ² (* R ² = 0.3681)
Quarto grau:	Varição de K ⁺ = 19.43 - 15.37xTempo + 4.56xTempo ² - 0.54xTempo ³ + 0,02xTempo ⁴ (** R ² = 0.8772)

** Indica equações significativas com nível de significância de 1%
 * Indica equações significativas com nível de significância de 5%

Na tabela 5, observa-se as diversas equações através das quais pode-se explicar o comportamento da variação do teor de potássio em função do tempo decorrido após a morte. Entre parênteses são colocados os asteriscos indicando o nível de rejeição da hipótese de que todos os coeficientes são estatisticamente iguais a zero e o valor da estatística R² que explica a quantidade de variação do tempo que pode ser explicado através da função.

Um primeiro critério usado para selecionar a equação é o nível de significância. Por esse critério as três equações atendem o requisito já que todas são significativas, a equação de 3º grau foi descartada em função de ser não significativa.

Um segundo critério para selecionar entre as diferentes equações é o valor da estatística R^2 . Por esse critério, a equação mais adequada é a de 4º grau já que ela explica 87,72% da variação observada nos dados que é causada pelo tempo.

Um terceiro critério que deve ser considerado são as implicações teóricas envolvidas na adoção de um ou de outro modelo.

Em vista do valor de R^2 sugeriu-se utilizar o modelo de 4º grau já que o valor de R^2 era muito superior, entretanto, coube ao pesquisador a seleção do modelo mais adequado, de acordo com as características esperadas para a variável.

A seguir, em complemento ao estudo anterior, procurou-se obter o ajuste de uma curva que permitisse a estimativa do tempo decorrido após a morte, através da determinação dos teores de íons K^+ .

4. Análises efetuadas

Foi efetuado um estudo de regressão através do sistema SAS. Um estudo de pressuposições foi efetuado através do módulo LAB do SAS o qual permitiu a verificação de escala de resposta, inexistência de efeito de graus superiores aos testados, homogeneidade de variâncias e dados muito influentes.

Através dos testes, verificou-se que todas as pressuposições eram razoáveis. Adicionalmente, um teste de máxima verossimilhança indicou que os dados poderiam ser mais facilmente modelados se houvesse a elevação dos

dados a 0,85; detectou-se todavia, que essa potência não melhoraria significativamente o ajuste.

5. Estudo de regressão

Posteriormente ao estudo de pressuposições, utilizou-se o procedimento REG do SAS para efetuar a regressão linear previamente recomendada pelas análises preliminares. Os resultados são mostrados na tabela 6.

Tabela 6. Resultado da análise de variância para o estudo de regressão linear.

Variável dependente: TEMPO Tempo decorrido					
Análise de Variância					
C. De Var.	GL	Soma de	Quadrado	Valor F	Prob>F
		Quadrados	Médio		
Modelo	1	41.81019	41.81019	5.711	0.0219
Resíduo	38	278.18981	7.32078		
C. Total	39	320.00000			

A análise de variância da regressão mostrou que o modelo foi significativo ao nível pré-estabelecido de 5% ($\text{Prob}>F = 0,0219$) o que nos forneceu evidências de que o tempo dependia linearmente do teor de potássio e que o estudo poderia prosseguir.

A tabela 7 traz informações a respeito dos parâmetros estimados e que permitem a estimativa dos valores de tempo obtido em função dos teores de K^+ .

Tabela 7. Parâmetros estimados segundo modelo linear.

Variável	GL	Parâmetros Estimados	Erro Padrão	T for H_0 : Parameter = 0	Prob> T
INTERCEP	1	2.511195	1.52126325	1.651	0.1070
KT	1	0.213317	0.08926143	2.390	0.219

Os dados da tabela 7 permitiram a montagem da equação que permitiu a determinação do tempo decorrido após a morte a partir dos valores de K^+ , a qual é expressa a seguir:

$$\text{TEMPO} = 2,511195 + 0,213317 \cdot \text{KT} \quad (* R^2=13,07)$$

A equação, apesar de significativa, apresentou um valor de R^2 muito baixo (13,07) o que mostrou que apenas 13% da variação observada nos dados pôde ser atribuída ao teor de K^+ e que grande parte da variação permaneceu sem causa de variação contemplada pelo modelo.

Os gráficos a seguir mostram a linha de regressão interpolada pela regressão linear.

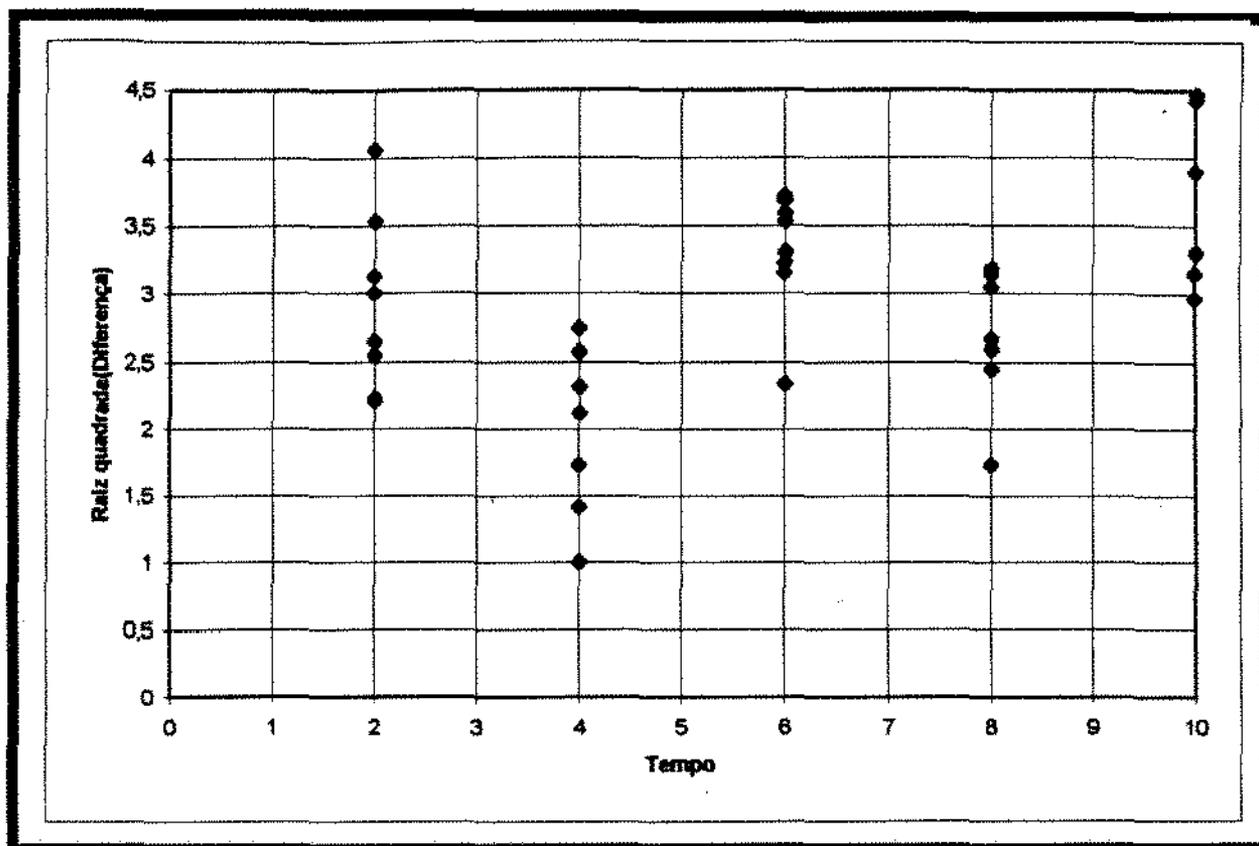


Gráfico 1. Linha de regressão interpolada pela regressão linear.

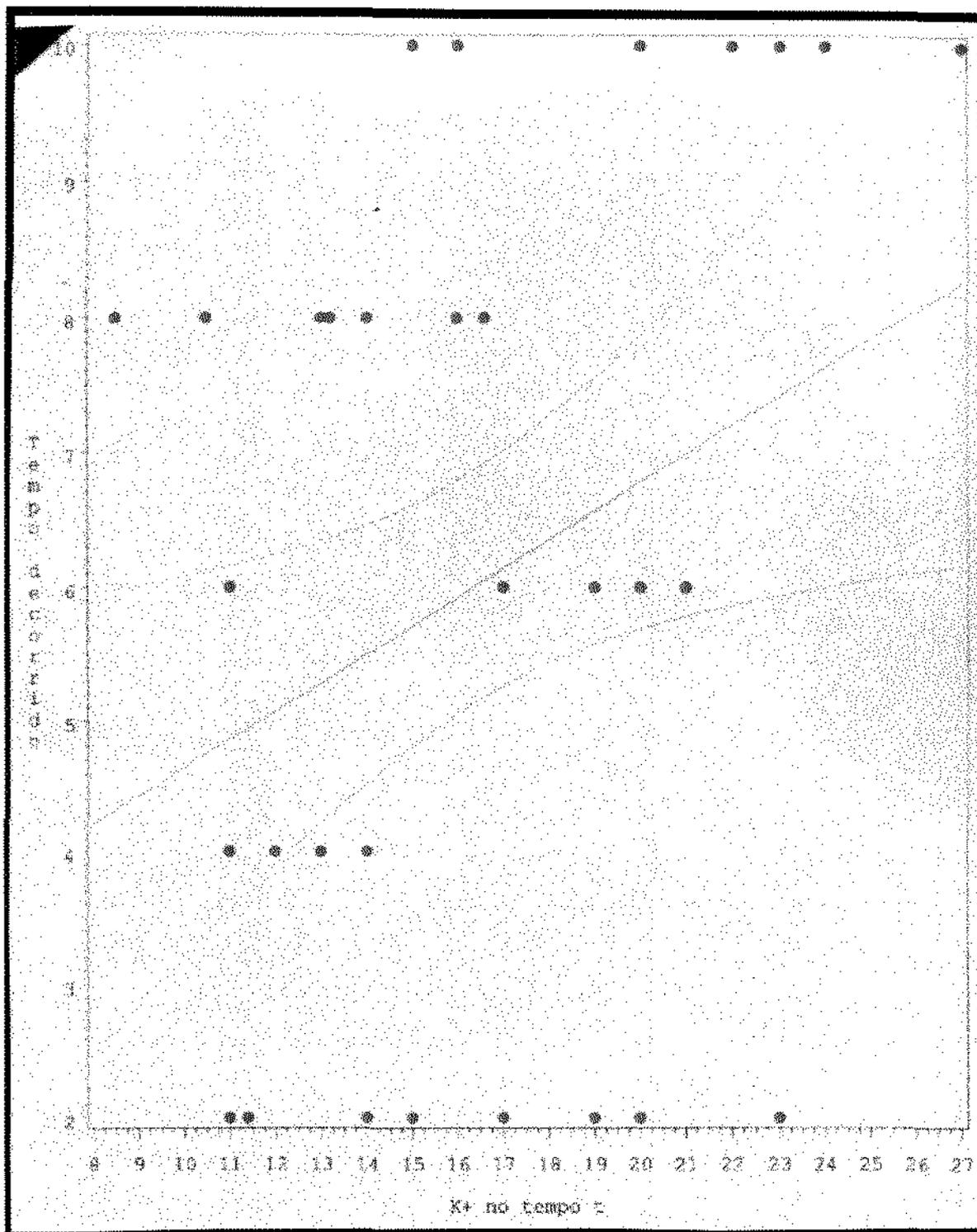


Gráfico 2. Linha de regressão interpolada pela regressão linear.



SUMMARY

This study was based on the estimation of the time since death by correlation of vitreous potassium and "*post-mortem*" period.

We obtained vitreous humour of 40 rabbits, that died by the same way, violent death, and we performed timed removal of vitreous humour at an interval of 2 hours until the first 12 hours after death.

We performed determination of potassium concentration by flame photometry, and the results were studied by statistical methods.

The conclusion was that vitreous potassium rises over the "*post-mortem*" interval on a statistically significant level.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADELSON, L. et al. Vitreous potassium concentration as an indicator of the postmortem interval. **J. forens. Sci.**, 8: 503-14, 1963.
2. ADJUDANTIS, G. & COUTSELINIS, A. Estimation of the time of death by potassium levels in the vitreous humor. **Forens. Sci. int.**, 1: 55-60, 1972
3. BALAZS, E.A. & DENLINGER, J.L. The vitreous. In: **In the eye**. 3.ed. Herausgeber, Hugh Davson, v.1, p.533-89, 1984
4. BERMAN, E.R. & VOADEN, M. The vitreous body. In: GRAYMORE, C.N., ed. **Biochemistrh of the eye**. London, Academic, 1970.
5. BITO, L.Z. Intraocular fluid dynamics. steady-state concentration gradients of magnesium, potassium and calcium in relation to the sites and mechanismus of ocular cation transport processes. **Expl Eye Res.**, 10: 102, 1970.
6. _____. The physiology and pathophysiology of intraocular fluids. In: _____.; DAVSON, H.; FENSTERMACHER, J.D., eds. **The ocular and cerebrospinal fluids**. London, Academic, 1977. p.273-89.
7. _____. & DAVSON, H. Steady-state concentrations of potassium in the ocular fluids. **Expl Eye Res.**, 3: 283, 1964.
8. BLUMENFELD, T.A. et al. Postmortem vitreous humor chemistry in sudden infant death syndrome and in other causes of death in childhood. **Am. J. clin. Path.**, 71: 219-23, 1979.
9. BOTING, S.L. CARAVAGGIO, L.L.; HAWKINS, N.M. Studies on sodium-potassium activated adenosine-triphosphatase. Its role in cation transport in the lens of cat, calf an rabbit. **Archs Biochem.**, 101: 47, 1963.
10. BURINI, R.C; CAMPANA, A. D. Padronização da metodologia para análise do sódio e do potássio em soluções eletrolíticas semelhantes ao plasma, pela fotometria de chama. **Rev. Bras. Pes. Med. Biol.**, 3: 25-36, 1970.

11. CASTREN e LAAMANEN. In: MADEA *et al.* **The estimation of the time since death in the early post-mortem period.** London, Arnold, 1996.
12. COE, J.I. **Definition and time of death: modern legal medicine, psychiatry and forensic science.** Philadelphia, F.A. Davis, 1980.
13. COE, J.I. Postmortem biochemistry of blood and vitreous humour in pediatric practice. In: MASON, J.K.; ed. **Pediatric forensic medicine and pathology.** London, Chapman & Hall, 1989. p. 191-203.
14. _____. Postmortem chemistries on blood with particular reference to urea nitrogen, electrolytes and bilirubin. **J. forens. Sci.**, **19**(1): 33-42, 1974.
15. _____. Postmortem chemistries on vitreous humor. **Am. J. Path.**, **51**: 741-50, 1969.
16. _____. Postmortem chemistry of blood, cerebrospinal fluid and vitreous humour. **Leg. Med. A.**, 53-91, 1976.
17. FARMER, J.G. et al. Magnesium, potassium, sodium and calcium in postmortem vitreous humor from humans. **Forens. Sci. int.**, **27**: 1-13, 1985.
18. FOERCH, J.S.; FORMAN, D. T.; VYE, M.V. Measurement of potassium in vitreous humor as an indication of the postmortem interval. **Am. J. clin. Path.**, **72**: 651-2, 1979.
19. FORMAN, D.T.; BUTTS, J. Eletrolitytes of the vitreous humour as a measure of the postmortem interval. **Clin. Chem.**, **26**: 1024, 1980.
20. FOWLKS, N.L. Meridional flow from the corona ciliaris through the paretinal zone of the rabbit vitreous. **Invest. Ophthal.**, **2**: 63-71, 1963.
21. GAMERO, J.J. et al. Incremento de la concentracion de potassio en humor vitreo en funcion del tiempo postmortem. **Riv. ital. Med. leg.**, **12**: 789-801, 1990.
22. GREGORI, Z. et al. The amouth of proportion of potassium and calcium in the vitreous body relation to the time of death. **Soudní Lék.**, **23**(1): 1-7, 1978.
23. HANSSON, L.M.A. et al. Potassium content of the vitreous body as an aid in determining the time of death. **J. forens. Sci.**, **11**: 390-94, 1966.

24. HARPER, D.R. A comparative study of the microbiological contamination of post-mortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. **Forens. Sci. int.**, **43**: 37-44, 1989.
25. HONDA, Y.; NEGI, A.; KAWANO, S. Mode of ion movements into vitreous. **Archs Ophthal.**, **101**: 105-11, 1983.
26. HUGHES, W. Levels of potassium in the vitreous humour after death. **Medicine Sci. Law**, **150**: 150-6, 1965.
27. JAFFE, F. A. Chemical post-mortem changes in the intra-ocular fluid. **J. forens. Sci.**, **7**: 231-7, 1962.
28. KOMURA, S. & OSHIRO, S. Potassium levels in the aqueous and vitreous humour after death. **Tohoku J. exp. Med.**, **122**: 65-8, 1977.
29. KRAUSE, D. et al. Die Bedeutung der Kaliumkonzentration im Glaskörper menschlicher Augen für die Todeszeitbestimmung. **Z. ärztl. Fortbild.**, **65**(6): 345-8, 1971.
30. LEAHY, M.S. & FARBER, R. Postmortem chemistry of human vitreous humour. **J. forens. Sci.**, **12**: 214-22, 1967.
31. LIE, J.T. Changes of potassium concentration in the vitreous humour after death. **Am. J. Med. Sci.**, **254**: 136-43, 1967.
32. MADEA, B. et al. References for determining the time of death by potassium in vitreous humour. **Forens. Sci. int.**, **8**: 231-43, 1989.
33. MARTCHENCO, H.P. Veränderungen des Kaliumgehaltes der Glaskörperflüssigkeit in Abhängigkeit von der Todeszeit. **Gerichtl. Med.**, **61**: 295, 1966.
34. MONTALO, B. et al. La determinazione della concentrazione del potassio nell'umor vitreo: verifica di un metodo strumentale tanatocronologico. **Riv. ital. Med. leg.**, **11**: 180-99, 1989.
35. PRESTE, E. & TRAVERSO, G. Le variazioni di concentrazione del potassio e del rapporto $K^+ Na^+/Ca^{++}$ nel vitreo del coniglio prima e dopo la morte. **Annali Ottal. Clin. ocul.**, **8**: 589-94, 1966.
36. REDDY, D.V.N. & KINSEY, V. E. Composition of the vitreous humour in relation to that plasma and aqueous humors. **Archs Ophthal.**, **63**: 167, 715-20, 1960.
37. ROGNUM, T.O. et al. A new biochemical method for estimation of postmortem time. **Forens. Sci. int.**, **51**: 139-46, 1991.

38. SCHLEYER, F. Determination of the time since death in the early postmortem interval. **Meth. forens. Sci.**, **2**: 253-93, 1963.
39. SPARKS D.L. *et al.* Comparasion of chemical methods for determining the postmortem interval. **J. For Sci** **34**: 197-206, 1989.
40. STURNER, M.Q. The vitreous humour: postmortem potassium changes. **Lancet**, 807-8, 1963.
41. WURSTER, U.; HOFFMANN, K. Glaskörper. In: HOCKWIN, O., ed. **Biochemie des Auges**. Stuttgart, Enke, 1985. p.100-34.