

ALTERAÇÕES MORFOESTRUTURAIS EM ÓRGÃOS DE *RATTUS NORVEGICUS* DECORRENTES DE PUTREFAÇÃO NO INTERVALO DE 96 HORAS *POST MORTEM*

Marcus Alexandre Mendes LUZ¹

Luz, M.A.M. Alterações morfoestruturais em órgãos de *Rattus norvegicus* decorrentes de putrefação no intervalo de 96 horas *post mortem*. *Saúde, Ética & Justiça*, 2(2):109-14, 1997

Resumo: Estudos sobre a ação degradativa da putrefação em estruturas tissulares de *Rattus norvegicus*, permitiram uma observação sistemática envolvendo os fenômenos autolíticos que se sucedem no núcleo e no citoplasma. As observações foram realizadas 96 horas *post mortem* (HPM) e o material coletado foi processado e corado por técnicas histológicas de rotina - H.E. Comparando-se com tecidos normais, constatou-se a presença de sombra celular e cariólise no fígado, baço, intestino e fibras musculares da língua. Especificamente, verificou-se no fígado que a homogeneização acarretou a modificação estrutural das trabéculas de Remak, juntamente com a vacuolização do lóbulo. No pulmão os alvéolos apresentaram-se compactados originando uma imagem homogênea e amorfa com lacerações. No baço observou-se a cromatólise e a alteração da basofilia e acidofilia das células em relação ao corante. No intestino houve tumefação das vilosidades. A túnica submucosa mostrou-se praticamente desintegrada. Das estruturas musculares analisou-se a língua e o miocárdio, constatando-se na primeira as faixas isotrópicas e anisotrópicas preservadas. No miocárdio houve tumefação nuclear e maior preservação dos tecidos.

Unitermos: Autólise. Biodegradação. Tanatologia. Medicina legal. Ratos. Técnicas histológicas.

1 Introdução

A autólise compreende fundamentalmente o processo de fermentação *post mortem* sem a participação de bactérias¹⁸, originado a partir da interrupção das trocas metabólicas orgânicas entre os tecidos e com o meio extracelular. Todas as organelas sofrem alterações, o meio intracelular acidifica-se produzindo lesões lisossomais acompanhadas pela liberação de enzimas, que ativam as hidrolases ácidas iniciando a auto-digestão celular e promovendo a redução do pH do meio para níveis bastante baixos nos primeiros estágios da putrefação^{4,5,21}. Progressivamente, o pH de 4.5 – nível ótimo para autólise – eleva-se acima de 8.0

paralisando o processo e desencadeando a catálise de diversas enzimas, como a tripsina por exemplo, que passam a atuar sobre os tecidos⁴. Dentre as alterações morfoestruturais, constata-se fenômenos citoplasmáticos como a tumefação celular (decorrente do acúmulo intracelular de sódio) e diversos fenômenos nucleares como picnose, hipercromatose, cromatólise, desnaturação cromatínica, cariólise e cariorréxis são observados⁷. O núcleo depois de desintegrado apresenta-se como uma mancha clara e amorfa. A opacidade nucleolar também pode ser observada.

A célula como um todo cede lugar a uma

¹ Biólogo, Mestrando em Morfologia, Departamento de Anatomia IB/ UNICAMP

Endereço para correspondência. Av. Arthur Nonato, 5459. 15091-180 - São José do Rio Preto, SP. e-mail: marcus-luz@zipmail.com.br

estrutura indistinta denominada de sombra celular, que pode perdurar por variável período de tempo até a citólise. Estudos sobre a putrefação em animais realizados por Zink et al.²², demonstraram uma retração inicial das células, seguida de inchaço e desintegração das junções intercelulares. Observações do núcleo revelaram condensação da cromatina e preservação do envoltório nuclear por mais de quatro meses (em sepulturas na terra), atingindo até um ano em casos isolados. Juntamente com o processo autolítico desenvolve-se a proliferação de bactérias putrefativas. A suscetibilidade da célula à ação bacteriana está relacionada à integridade do sistema de membranas da mesma, uma vez que células intactas constituem uma barreira à penetração de tais agentes^{12,20}. Deve-se considerar ainda no desenvolvimento do processo autolítico, a influência de fatores extrínsecos como temperatura, umidade do ar e variações ambientais. A autólise torna-se mais severa à temperaturas de 37° e 40°C, e pode ser inibida através de baixas temperaturas ou por congelamento da estrutura^{1,6,7,9,13}. A constituição diferencial de cada órgão que integra o organismo e a velocidade do desenvolvimento da autólise complementada pela susceptibilidade dos mesmos à ação das bactérias e pelas variáveis abióticas exige uma análise particular de cada estrutura envolvida, uma vez que a ação degenerativa produzida pela morte processa-se de modo específico.

Baseando-se nesses dados, o objetivo deste trabalho é estabelecer uma correlação com as observações de diversos autores, através de experimentos realizados em tecidos autolisados de língua, miocárdio, fígado, baço, intestino e pulmão de *Rattus norvegicus* transcorridas 96 horas *post mortem* dentro das condições que nos são pertinentes.

2 Material e métodos

Os experimentos foram realizados com animais da espécie *Rattus norvegicus* com peso de 290-300g, divididos em dois grupos: o experimental, com 10 animais, e o controle, com três animais.

Os animais experimentais foram sacrificados por asfixia mecânica e expostos sobre prancha de dissecação por um período de quatro horas para a constatação dos sinais cadavéricos, sendo posteriormente depositados em caixas de madeira de proporções limítrofes ao corpo e enterrados em solo argiloso. Transcorridas 96 HPM, os animais foram desenterrados e submetidos à dissecação, a partir da qual obteve-se fragmentos de língua, miocárdio, fígado, baço, intestino e pulmão, que foram fixados em solução de formol 10%, e processados pelas técnicas histológicas de rotina – H.E16, seguindo a metodologia de Splitter & McGavin¹⁷.

Os animais controle foram sacrificados do mesmo modo e imediatamente dissecados, coletando-se os fragmentos dos órgãos selecionados. O material coletado foi fixado e processado pelos mesmos métodos.

A temperatura média do período experimental foi de 36.7° C, e a umidade foi verificada pelo método do cloreto de cobalto, indicando tempo seco.

3 Resultados e discussão

As análises realizadas ao microscópio de luz revelaram as seguintes alterações após 96 HPM:

a) fígado: verificou-se a homogeneização do citoplasma e a formação de sombra celular, conferindo às trabéculas de Remak um aspecto uniforme e indiferenciado. Todos os núcleos sofreram cariólise e juntamente com os nucléolos desintegraram-se, originando manchas opacas no local. As margens celulares apresentaram-se pouco nítidas e a maioria não pode ser

discriminada. O quadro observado assemelha-se ao da necrose de coagulação, denotando intensa eosinofilia. O lóbulo hepático como um todo, apresentou-se acentuadamente vacuolizado na porção mediana (fígado enfisematoso, produto da ação de *Clostridium*) em contraste com as regiões próximas às veias centro lobulares e aos espaços porta. Nestas regiões as células apresentaram-se mais preservadas. Este padrão foi mantido em todas as observações;

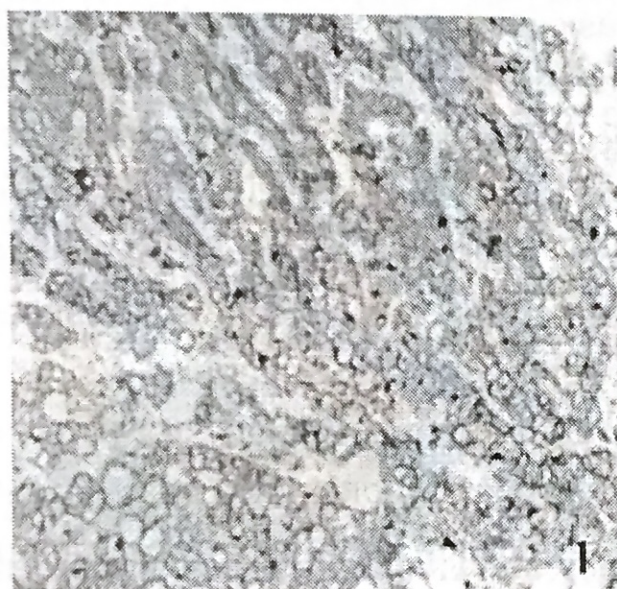


Figura 1- Fígado: cariólise de hepatócitos, sombra celular e alteração estrutural das trabéculas de Remak e vacuolização. H.E. 250X

b) língua: as estruturas fibrilares da musculatura da língua foram preservadas, apesar da evidente desintegração do tecido conjuntivo. As faixas isotrópicas e anisotrópicas, ainda distinguíveis, foram observadas em meio a formação discreta de sombra celular. Constatou-se cariólise nos mionúcleos e opacidade nos do epitélio. Pode ser observado também, nos interstícios dos tecidos, focos de *Clostridium*;

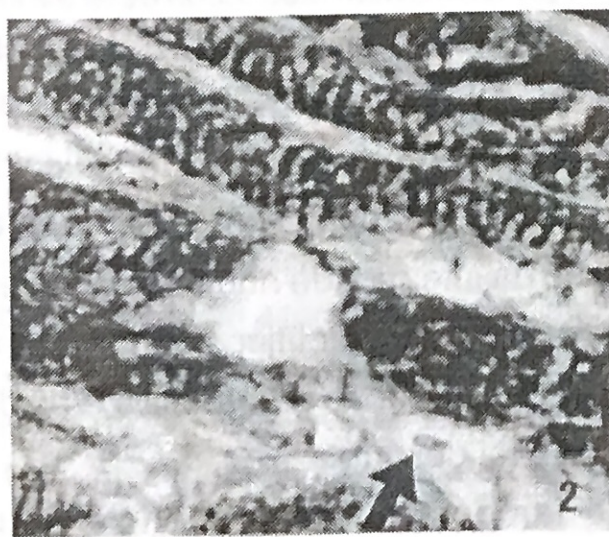


Figura 2 - Língua: preservação das faixas isotrópicas e anisotrópicas, cariólise e dissociação

c) miocárdio: constatou-se a tumefação nos núcleos das fibras mas não observou-se cariólise. Houve retenção de elementos sanguíneos e preservação das faixas isotrópicas e anisotrópicas assim como as demais estruturas fibrilares do órgão. A distribuição das fibras e a integridade dos discos intercalares não foram comprometidos;

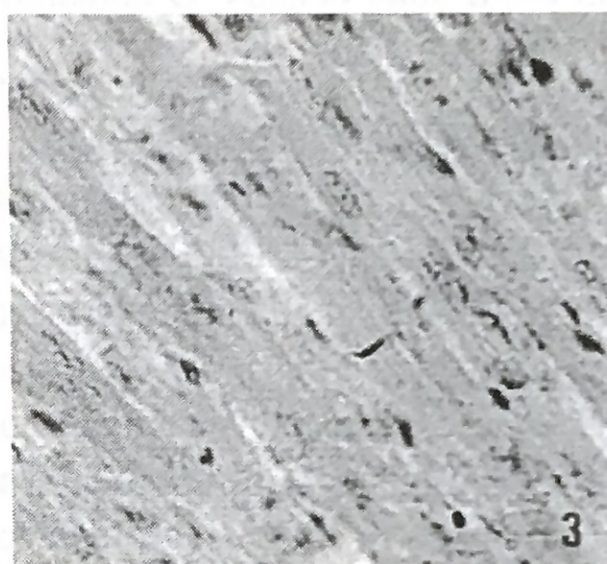


Figura 3 - Miocárdio: integridade das fibras e discreta tumefação nuclear. H.E. 400X

d) baço: apresentou tumefação dos linfócitos e alteração do caráter basófilo/acidófilo das células corticais. O citoplasma celular, reagiu diferencialmente diante da coloração com H.E., apesar do tempo de exposição ao corante ter sido uniforme em todas as amostras. Os septos conjuntivos apresentaram-se pouco definidos, e o centros germinativos não foram observados;

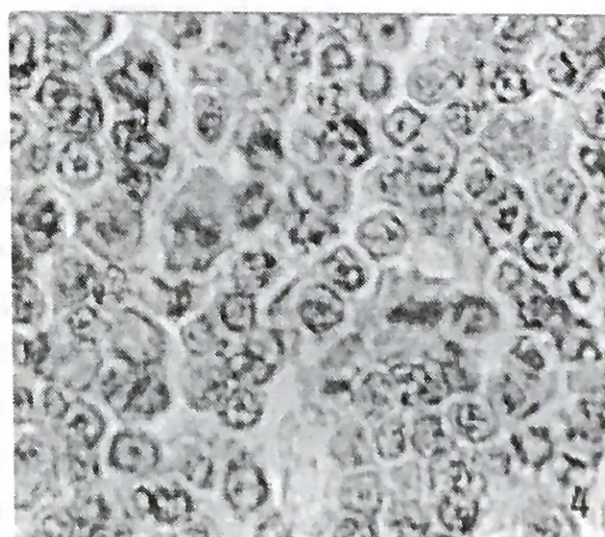


Figura 4 - Baço: linfócitos intumescidos, núcleo visível. H.E. 400X

e) intestino delgado: as células epiteliais apresentaram formação de sombra celular, ao

contrário das caliciformes, que estavam preservadas. Constatou-se delaminação da camada mucosa da submucosa, mantendo-se íntegra a estrutura muscular. As vilosidades apresentaram-se dilatadas e houve coagulação dos elementos do córion. As glândulas de Lieberkühn evidenciaram a formação de grandes vesículas entre suas células. O conjuntivo da estrutura foi desintegrado;

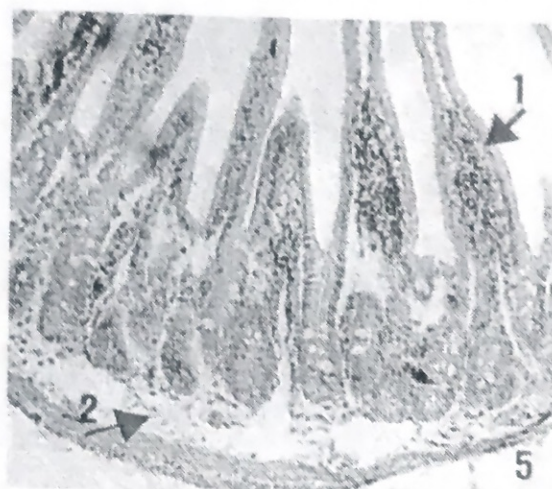


Figura 5- Intestino delgado: coagulação dos elementos do córion com retenção de sangue no interior da vilosidade (Seta 1) e dissociação do conjuntivo (Seta 2). H.E. 40X

f) pulmões: a estrutura foi comprimida totalmente, formando uma massa compacta, entremeada de lacerações provavelmente originadas a partir do acúmulo de gás no interior da estrutura. A musculatura dos vasos e brônquios foi preservada, o mesmo não ocorrendo com os epitélios.

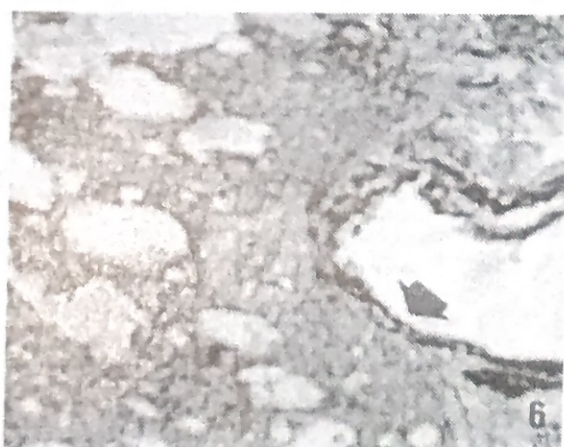


Figura 6 - Pulmão: compactação dos alvéolos entremeada por lacerações. Preservação da musculatura dos brônquios (seta). H.E. 400X

De acordo com as observações de diversos autores, pode se estabelecer uma correlação entre alguns dos resultados obtidos.

A análise do fígado revelou precocidade na lise dos núcleos diante dos resultados oferecidos por Muller¹⁴ e Splitter & McGavin¹⁷. De acordo com o primeiro, a lise total dos hepatócitos só foi relatada oito dias *post mortem*, decorrente de processo iniciado a 6 HPM; pelo segundo, 25% dos núcleos dos hepatócitos sofreram cariólise a 48 HPM, sob temperatura de 20° C e umidade de 50%. Os resultados obtidos neste experimento revela a lise de todos os hepatócitos em todas as amostras colhidas na extensão total do órgão no prazo de 96 HPM, mesmo estando o animal inumado, fator este que retarda a putrefação. Uma vez que o peso dos animais utilizados nos outros trabalhos é similar aos deste trabalho, o fator que pode exercer influência direta nos resultados é abiótico-temperatura e umidade.

A mesma precocidade de fenômenos autolíticos pode ser constatada nas estruturas da língua, sendo que a cariólise dos mionúcleos ocorreu anteriormente ao prazo de 10 dias descrito por Bernhein et al.³. A opacidade que precede o fenômeno também foi constatada, porém não houve desfibrilação da estrutura, como relata o mesmo autor.

Ao contrário dos demais órgãos, o coração resistiu integralmente à autólise. Arminger¹, relata alterações ultraestruturais à 6 HPM. Nicolas et al.¹⁵, descrevem núcleos hipercromáticos e picnóticos nos miócitos entre 6 e 12 HPM com predominância no quadro a partir de 18 HPM, lise e homogeneização das fibras cardíacas após três dias PM. Nenhum desses fenômenos foi observado.

O quadro observado no baço foi coincidente com o descrito por Tappero¹⁹, no que se refere à preservação da integridade nuclear e à sucessão lenta dos fenômenos autolíticos estruturalmente constatáveis. A alteração na basofilia e acidofilia do órgão não foi descrita.

Houve também correspondência entre os resultados obtidos por Loehry & Creamer¹⁰, com a análise do intestino delgado; e com o quadro

obtido por Strassmann¹⁸ e Bernardi & Tappero², na análise do pulmão, exceto no que se refere ao acúmulo de resíduos orgânicos no interior dos alvéolos.

4 Conclusões

Houve precocidade nas alterações *post mortem* ocorridas em alguns órgãos, como a lise dos hepatócitos e miócitos da língua no prazo de 96 HPM, ao mesmo tempo que pode-se constatar a resistência das estruturas cardíacas por intervalo de tempo superior ao descrito nos demais trabalhos.

Ao contrário do ocorrido nesses órgãos, a maior parte dos fenômenos autolíticos que se desenvolveram nos pulmões, intestino delgado e baço foram coincidentes com as observadas nos modelos experimentais e na casuística oferecida pelos autores consultados. No entanto, não foi possível estabelecer uma identidade com todos os dados oferecidos na literatura, não havendo portanto coincidência total de resultados obtidos.

Dessa forma, podemos inferir que:

- não há isocronismo na autólise tissular dentro de um organismo, sendo que cada órgão apresenta velocidade e padrão específico na sucessão dos processos autolíticos. A suscetibilidade de cada tecido é distinta, sendo que a predominância de determinados constituintes – celulares ou fibrosos – na estrutura é fator condicionante na análise. Observou-se de modo geral que as estruturas fibrilares são mais resistentes à putrefação do que as não fibrilares, e que em determinados locais, os elementos conjuntivos podem apresentar suscetibilidade distinta ao processo;
- os fatores abióticos – temperatura e umidade – considerados no experimento podem contribuir para um quadro diagnóstico diferencial de acordo com alterações nessas variáveis;
- os resultados obtidos não são compatíveis com as informações relatadas em outros trabalhos mencionados na literatura; desde que as variáveis abióticas não sejam padronizadas não se pode estabelecer parâmetro de identidade com os quadros autolíticos descritos.

Agradecimentos: À Profa. Dra. Iara Maria S. De Luca, IB/UNICAMP e ao Centro Universitário de São José do Rio Preto, SP - UNIRP.

Luz, M.A.M. Morpho-structural alterations in the organs of *Rattus norvegicus* as a result of putrifaction at 96 hours *post mortem*. *Saúde, Ética & Justiça*, 2(2):109-14, 1997

Abstract. Studies about the gradual putrifaction of tissue structure of the species *Rattus norvegicus*, allow a systematic observation involving the autolytic phenomenae which takes place in the nucleus and in the cytoplasm. The observations were made at 96 hours *post mortem* (HPM) and the material collected was processed and stained with routine histological techniques-H.E. Compared to normal tissues of the same animal, was observed the presence of shadow cells and cariolysis in the liver, spleen, intestine and the muscle fibres of the tongue. Homogenization of the cytoplasm was observed in the liver and in the muscle structure of the tongue. Specifically, it was found that the homogenization brought about changes the Remak trabecular structure, together with the vacuuming of the lobules. In the lungs, the alveolus showed compaction originating a shapeless homogenization mixing with lacerations. In the spleen chromatolysis was observed and an alteration of the basophilia and acidophilia of the cells in relation to the staining. In the intestines there was swelling of the villus. The submucosa layer was practically disintegrated and stripped of the mucosa. The tongue and miocardic muscle structures were analysed and it was reported that in the first, the isotropic and anisotropic strips were preserved. In the miocardic muscle, there was a nuclear swelling and greater preservation of the tissues.

Keywords: Autolysis. Biodegradation. Thanatology. Forensic medicine. Rats. Histological techniques.

Referências Bibliográficas

1. Arminger, L.C.; Seelye, R.N. et al. Morphologic and biochemical changes in autolysing dog heart muscle. **Lab. Invest.**, 34 (4):257-62, 1976.
2. Bernardi, A.; Tappero, P. Gli aspetti microfluoroscopici dell edema polmonare. Il possibilità de una diagnose differenziale con il liquame putrefattivo. **Minerva Med.**, 84:14, 1964.
3. Bernheim, P.; Willot, M.; Muller, P. Quelsques aspects de l'autolys du muscle strié humain aux microscopes optique et électronique. **Ann. Med. Leg.**, 46:447, 1966.
4. Bradley, H.C. Studies of autolysis. **J. Biol. Chem.**, 52:467-84, 1922.
5. Fávero, F. **Medicina legal**. 12.ed. Belo Horizonte, Villa Rica, 1991. p. 562-3.
6. Greuer, W.; Hess, E.; Rostek, I. Endogene proteolytische fermente und ihre Bedeutung. **Arzneim. Forsch.**, 6:269, 1966.
7. Janssen, W. **Forensic histopathology**. Berlin, Springer-Verlag, 1984. p.5-46.
8. Kitaev, Y. On postmortem changes of the fibrillar apparatus of the skeletal muscles. **Sud. Med. Ekspert**, 5:34, 1962.
9. Krejci, J.; Hradil, J. Ein fall wetgehender postmortaler verwesung netch 12 studen. **Soud. Lek.**, 7:10, 1962.
10. Lorehry, C.A.; Creamer, B. Post mortem study of small intestinal mucosa. **Br. Med. J.**, 1:827, 1969.
11. Mackie, F.P. The microscopical changes occurring in organs after death. **Ind. J. Med. Res.**, 16:827, 1929.
12. Merkel, H. Leichen-und Fäunisercheinungen an menschlichen Leichen. **Ergeb. Pathol.**, 33:1, 1937.
13. Müller, E. **Der zelltod**. Berlin, Springer, 1955. p.613.
14. Muller, P.H.; Willot, M. et al. Aspects histologiques de l'autolyse hépatique. **Acta. Med. Leg. Soc. (Liège)**, 18:243; 1965.
15. Nicolas, G.; Leroux, M.J. et al. Etude de l'autolyse du myocarde humain. **Med. Leg. Dom. Corp.**, 2:120, 1969.
16. Romeis, B. **Mikroskopische technik**. 16.Aufl. München, R. Oldenbourg, 1968.
17. Splitter, G.A.; McGavin, M.D. Sequence and rate of postmortem autolysis in guinea pig liver. **Am. J. Vet. Res.**, 35(12):1591-6, 1974.
18. Strassmann, G. Über Leichenveränderungen, autolytische Fäulnis-und Verwesungsvorgänge. **Dtsch. Z. Gerichtl. Med.**, 3:359, 1924.
19. Tappero, P. Contributo allo studio tanatologico della milza. **Minerva Med. Leg. (Torino)**, 89:12, 1969.
20. Walker, K. Studien über die Leichenfäulnis mit besonderer berücksichtigung der histologie derselben. **Zentralbl. Allg. Pathol.**, 39:1, 1927.
21. Zacharias, M.; Zacharias, E. **Dicionário de medicina legal**. 2.ed. São Paulo, Ibrasa-Champagnat, 1991. p.51.
22. Zink, P.; Reinhardt, G. Zur histologischen Beurteilung faulender organe. **Beitr. Gerichtl. Med.**, 36:333, 1978.