

Mestrado Integrado em Medicina

Determinação do intervalo *postmortem*: ficção ou realidade?

Maria Francisca Macedo de Sousa

M

2019



DETERMINAÇÃO DO INTERVALO POSTMORTEM: FICÇÃO OU REALIDADE?

Artigo de Revisão Bibliográfica

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE
EM MEDICINA SUBMETIDA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Autora:

Maria Francisca Macedo de Sousa

Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Correio eletrónico: franciscasousa.17-12@hotmail.com

Orientadora:

Mestre Sofia Manuela Lalanda Maia Frazão

Assistente Convidada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
Assistente de Medicina Legal na Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Coorientadora:

Prof.ª Doutora Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa

Professora Associada Convidada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Chefe de Serviço de Medicina Legal na Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Porto
Junho de 2019

Autora: Maria Francisca Macedo de Sousa

Maria Francisca Macedo de Sousa

Orientadora: Mestre Sofia Manuela Landa Maia Frazão

Sofia Manuela Landa Maia Frazão

Coorientadora: Prof.^a Doutora Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa

Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa

Dedico este trabalho
aos meus pais e avós

Agradecimentos

À Dr.^a Sofia Frazão, professora e orientadora, e à Dr.^a Maria José Pinto da Costa, professora e coorientadora, por terem despertado em mim o interesse pela Medicina Legal. As suas aulas foram, sem dúvida, um marco na minha passagem pelo ICBAS. Agradeço o facto de me terem aceite nesta que é a última etapa do meu percurso, como estudante de Medicina. Agradeço, ainda, toda a atenção, apoio e disponibilidade prestados durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, por terem acreditado sempre nas minhas capacidades e por fazerem com que todo este percurso fosse possível. Agradeço todos os esforços que fizeram por mim, bem como toda a dedicação e apoio. Espero que esta nova etapa vos encha de orgulho.

Aos meus irmãos, avós e padrinhos, por todo o carinho e reconhecimento.

Aos melhores amigos do mundo, pela presença em todos os momentos, o apoio incondicional e a grande fonte de motivação. Vocês tornaram esta viagem inesquecível.

Ao Fernando, por ser o meu ponto de equilíbrio, a minha paz.

Resumo

A cronotanatognose é a determinação do intervalo de tempo que decorre entre o momento da morte de um indivíduo e o momento em que o cadáver é encontrado, também denominado intervalo *postmortem* (IPM). A sua determinação assume grande importância tanto a nível penal como civil, sendo um dos componentes essenciais no decorrer de uma investigação forense. Todavia, a determinação do IPM é variável e dependente de diversos fatores, daí ser um dos principais desafios enfrentados na perícia médico-legal.

Classicamente, avaliam-se os denominados fenómenos *postmortem* que incluem o arrefecimento corporal (*algor mortis*), os livores cadavéricos (*livor mortis*), a rigidez (*rigor mortis*) e a decomposição. Para além destes fenómenos, avalia-se, em alguns casos, a concentração de potássio e/ou hipoxantina no humor vítreo, embora este seja um método que nunca conseguiu aceitação suficiente para se tornar uma ferramenta de rotina.

Ao longo das últimas décadas, e apesar dos inúmeros avanços científicos e tecnológicos, a capacidade para estimar o momento da morte mantém-se aquém das expectativas, ao contrário daquilo que a ficção nos possa fazer crer. Os métodos existentes na atualidade apresentam uma margem de erro significativa, o que dificulta a determinação do IPM, sobretudo para cadáveres cuja morte tenha ocorrido há alguns dias. Existem variações biológicas consideráveis, o que significa que a hora exata da morte não pode ser determinada por nenhum método, sendo possível definir apenas um intervalo de tempo aproximado.

Recentemente, têm-se desenvolvido novos métodos laboratoriais que se baseiam em alterações bioquímicas e genéticas que ocorrem após a morte. O desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas tem contribuído para determinação de um IPM cada vez mais preciso. Com esta dissertação pretende-se fazer uma revisão bibliográfica dos estudos existentes relativos às técnicas de determinação do IPM, e perceber em que ponto estamos relativamente aos novos métodos – perto da ficção ou da realidade?

A fim de concretizar este objetivo, foi efetuada uma pesquisa da literatura mais recente em bases de dados eletrónicas, nomeadamente o PubMed-MEDLINE e Google Scholar. A pesquisa dos artigos científicos baseou-se em termos MeSH, designadamente “postmortem changes”, mas também na utilização de termos não incorporados neste sistema, particularmente “postmortem interval” e “time since death”. Foram incluídos artigos científicos publicados nos últimos 10 anos, em língua inglesa, sendo que artigos anteriores a este limite temporal foram seletivamente incluídos, quando considerados particularmente relevantes.

Palavras-chave: alterações postmortem; intervalo postmortem; patologia forense.

Abstract

Chronotanatognosis is the determination of the time interval that elapses between the time of death of an individual and the time the body is found, also called the *postmortem* interval (PMI). Its determination is of great importance, both at the criminal and civil levels, and is one of the essential components in the course of a forensic investigation. However, the determination of PMI is variable and dependent on several factors, hence one of the main challenges faced in medical-legal expertise.

Classically, the PMI determination relies on the so-called *postmortem* phenomena that include body cooling (*algor mortis*), lividity (*livor mortis*), rigidity (*rigor mortis*) and decomposition. In addition to these phenomena, the concentration of potassium and/or hypoxanthine in the vitreous humor is sometimes evaluated, although this is a method that has never been sufficiently accepted to become a routine tool.

Over the last few decades, and despite countless scientific and technological advances, the ability to estimate the moment of death remains below expectations, contrary to what fiction can make us believe. The existing methods present a significant margin of error, which makes it difficult to determine the PMI, especially for corpses whose death occurred a few days ago. There are considerable biological variations, which means that the exact time of death cannot be determined by any method, and it is only possible to define an approximate time interval.

Recently, new laboratory methods have been developed, based on biochemical and genetic changes that occur after death. The development of more sophisticated techniques has contributed to the determination of an increasingly accurate PMI. This dissertation intends to make a bibliographical review of the existing studies on the techniques of PMI determination, and to understand at what point we are in relation to the new methods – closer to fiction or reality?

In order to achieve this goal, a research of the most recent literature in electronic databases was carried out, namely on PubMed-MEDLINE and Google Scholar. The research of scientific papers was based on MeSH terms, specifically “postmortem changes”, but also on the use of terms not incorporated in this system, particularly “postmortem interval” and “time since death”. This review is based on scientific papers published in the last 10 years, in the English language. Articles prior to this time limit were selectively included when considered particularly relevant.

Keywords: postmortem changes; postmortem interval; forensic pathology.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

% – Percentagem
≈ – Aproximadamente igual
[K⁺] – Concentração de potássio
ABVT – Azoto básico volátil total
ACE – Acetato
ALA – Alanina
AMP – Adenosina monofosfato
AST – Aspartato aminotransferase
ATP – Adenosina trifosfato
BUT – Butirato
CE – Eletroforese capilar
cTnT – Troponina-T cardíaca
DNA – Ácido desoxirribonucleico
e.g. – *exempli gratia*
fTMA – Trimetilamónio livre
GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
H-MRS – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
hpm – Horas *postmortem*
HV – Humor vítreo
Hx – Hipoxantina
i.e. – *id est*
IPM – Intervalo *postmortem*
IPM_{min} – Intervalo *postmortem* mínimo
K⁺ – Ião potássio
LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LCR – Líquido cefalorraquidiano
LDH – Lactato desidrogenase
MeSH – Medical Subject Headings
mRNA – RNA mensageiro
miRNA – microRNA
ml – Mililitros
mmol/L – Milimol por litro
n – Tamanho da amostra
Na⁺ – Ião sódio
NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NH₄⁺ – Ião amónio
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PMI – *Postmortem* interval
PROP – Propionato
qPCR – PCR em tempo real
RNA – Ácido ribonucleico
RT-qPCR – Reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	iv
Lista de tabelas.....	vi
Lista de figuras	vi
1. Introdução	1
2. Objetivos	2
3. Metodologia	2
4. Desenvolvimento.....	3
4.1. Alterações Físicas.....	3
4.1.1. Algor mortis	3
4.1.2. Livor mortis.....	4
4.2. Alterações Físico-químicas	5
4.2.1. Rigor mortis	5
4.2.1. Reatividade supravital	6
4.3. Alterações Bioquímicas.....	6
4.3.1. Alterações no humor vítreo.....	7
4.3.2. Alterações no líquido cefalorraquidiano	9
4.3.3. Alterações no sangue	10
4.4. Decomposição	11
4.5. Entomologia	13
4.6. Alterações Oftalmológicas	14
4.7. Genética	14
5. Conclusões.....	16
6. Apêndice	18
7. Bibliografia	21

Lista de tabelas

Tabela I – Dados da literatura (1905–1963) referentes à relação da hipóstase com o IPM (hpm). 18	
Tabela II – Dados da literatura (1811-1969) referentes ao desenvolvimento temporal da rigidez cadavérica (hpm).....	18

Lista de figuras

Figura 1 – Sequência de fenômenos postmortem ao longo do tempo.....	19
Figura 2 – Nomograma que relaciona a temperatura rectal com o IPM, em temperaturas ambiente até 23°C.....	19
Figura 3 – Redistribuição dos lívres após manipulação do cadáver.....	20
Figura 4 – Regressões lineares para o cálculo do IPM, em diferentes estudos, baseado na medição da concentração de potássio no humor vítreo.	20
Figura 5 – Regressão não linear para o cálculo do IPM, baseado na medição da concentração de potássio no humor vítreo.....	20

1. Introdução

A cronotanatognose é a determinação do intervalo de tempo que decorre entre o momento da morte de um indivíduo e o momento em que o cadáver é encontrado, também denominado intervalo *postmortem* (IPM). A sua determinação assume grande importância tanto a nível penal como civil, sendo um dos componentes essenciais no decorrer de uma investigação forense.^{1,2}

Do ponto de vista do direito penal, uma estimativa precisa do IPM pode ajudar a definir a hora de um homicídio, verificar as declarações das testemunhas e limitar o número de suspeitos.^{2,3} Tem também uma importância crucial para os peritos criminais, especialmente quando estão a reunir provas que podem apoiar ou contestar as declarações dos suspeitos de um crime, por exemplo, determinar se a hora da morte é consistente com o seu alibi.² Para além disso, o conhecimento da hora exata da morte parece ser um fator muito importante no processo de luto e gestão emocional dos familiares e amigos da vítima.⁴ De facto, a determinação do IPM é um passo crítico nas investigações de morte não testemunhada (incluindo mortes hospitalares), embora continue a ser uma das variáveis mais difíceis de quantificar, apesar da vasta literatura existente sobre este assunto.^{5,6}

A determinação do IPM assume igual importância do ponto de vista do direito civil, uma vez que pode ter impacto na ordem de heranças, ou outros compromissos decorrentes da ordem de falecimentos. Tais dilemas podem ocorrer se os cadáveres de duas ou mais pessoas relacionadas forem encontrados simultaneamente (e.g. no caso de múltiplos homicídios ou acidentes com vários mortos).⁷

Atualmente, existem várias abordagens para a determinação do IPM que incorporam métodos de quase todas as áreas das ciências forenses. Entre estes, avaliam-se processos físicos (*algor mortis*, *livor mortis*), físico-químicos (*rigor mortis*, reatividade supravital), bioquímicos (concentração de eletrólitos, atividade enzimática), microbiológicos (decomposição) e entomológicos.^{3,6} Estes fenómenos ocorrem numa sequência temporal, podendo ser usados para chegar a uma hora aproximada da morte (Figura 1).² Atualmente, o *gold standard* na determinação do IPM é o denominado método composto que alia o nomograma de Henssge (baseado no arrefecimento corporal) às reações supravitais, *livor mortis*, e *rigor mortis*.⁸ Relativamente aos marcadores bioquímicos, o método mais preciso é a medição do potássio no humor vítreo.⁹

No entanto, todos os métodos atualmente usados para avaliar o IPM são afetados por algum grau de imprecisão. Estes métodos fornecem apenas uma mera aproximação do IPM, já que existem diversas variáveis (e.g. temperatura ambiente, causa de morte, localização do corpo)

que podem influenciar o ritmo de progressão dos fenómenos *postmortem*.⁶ Para além disso, existem variações biológicas consideráveis em casos individuais, portanto, a hora da morte é calculada como um intervalo de tempo aproximado, ao invés de um momento exato no tempo.^{2,3,10}

A avaliação do IPM torna-se particularmente desafiante quando o cadáver permanece mais de 24 horas sem ser encontrado. Nestas circunstâncias, os indicadores habituais do IPM (e.g. *rigor mortis*, *livor mortis*, *algor mortis*) terão atingido o estado estacionário, na maioria dos casos, o que significa que deixam de ser úteis para a sua avaliação.^{4,11} A determinação da concentração de determinados analitos no humor vítreo é frequentemente usada para este fim, particularmente quando os métodos usados na fase precoce da investigação já não podem ser aplicados.¹² O parâmetro mais estudado no humor vítreo é o potássio e, hoje em dia, são muitos os artigos publicados sobre o aumento do potássio vítreo, no período *postmortem*, com propostas de novos métodos analíticos e avaliações estatísticas.¹³

Recentemente, métodos laboratoriais mais sofisticados, como a espectrofotometria, eletroforese capilar, espectroscopia de ressonância magnética e PCR quantitativo em tempo real, têm sido propostos para avaliar as alterações *postmortem*. Embora essas abordagens não tornem, por si só, a determinação do IPM mais precisa, a combinação de diferentes métodos tem sido proposta para diminuir as margens de erro associadas a métodos individuais.⁶

2. Objetivos

Do anteriormente exposto resulta que existe uma verdadeira dissociação entre os vários autores, relativamente ao método mais adequado para determinar o IPM. Apesar dos numerosos métodos descritos, a determinação do IPM permanece em estudo, devido à falta de um método validado que seja considerado preciso e universal.¹⁴

Assim, com esta dissertação, pretende-se fazer uma revisão bibliográfica dos estudos existentes relativos às técnicas de determinação do IPM e perceber em que ponto estamos relativamente aos novos métodos – perto da ficção ou da realidade?

3. Metodologia

A fim de concretizar os objetivos previamente descritos, foi efetuada uma pesquisa da literatura mais recente em bases de dados eletrónicas, nomeadamente o PubMed-MEDLINE e Google Scholar. A pesquisa dos artigos científicos baseou-se em termos MeSH, designadamente,

“postmortem changes”, mas também na utilização de termos não incorporados neste sistema, particularmente “postmortem interval” e “time since death”. Foram incluídos artigos científicos publicados nos últimos 10 anos, em língua inglesa, sendo que artigos anteriores a este limite temporal foram seletivamente incluídos, quando considerados particularmente relevantes.

4. Desenvolvimento

4.1. Alterações Físicas

4.1.1. *Algor mortis*

O *algor mortis* (ou arrefecimento cadavérico) é uma alteração física correspondente ao decréscimo da temperatura corporal que ocorre após a morte, resultando, sobretudo, dos processos de convecção e condução. A taxa de arrefecimento corporal depende de várias condições: ambientais (temperatura, movimento do ar e humidade), peso corporal, postura do corpo e peças de vestuário e/ou cobertura.^{3,15} Tendo em conta o seu uso potencial na determinação do intervalo *postmortem*, o *algor mortis* tem-se como um dos tópicos mais estudados na medicina forense.¹⁵

De todos os métodos usados para estimar o IPM, o mais preciso e fidedigno é o método do nomograma ^{3,9,14-16} (Figura 2), que consiste numa representação gráfica da fórmula de Marshall e Hoare, com os parâmetros de Henssge.^{1,16-18} Atualmente, é considerado o método *gold standard* na determinação do IPM.³ Este método baseia-se na medição da temperatura rectal, com ajustes para a temperatura ambiente e peso corporal, entre outras variáveis.¹⁴⁻¹⁶ A leitura do nomograma permite aferir a média do IPM, em horas *postmortem* (hpm), com um intervalo de confiança de 95%.^{1,3} Este método apresenta uma margem de erro de $\pm 1,5$ horas às 7 hpm e $\pm 2,5$ horas às 11 hpm.⁹

Infelizmente, o nomograma só pode ser utilizado antes de se estabelecer o equilíbrio térmico entre a temperatura do cadáver e a temperatura ambiente, fenómeno este que ocorre habitualmente antes das 24 hpm.¹² De facto, a magnitude do erro aumenta, quando se utilizam alterações físicas para estimar o IPM, pois estes parâmetros são rapidamente afetados pelo ambiente externo.¹⁹

Hubig et al.²⁰ investigaram, recentemente, a precisão do método do nomograma utilizando cadáveres cuja hora da morte era conhecida. De acordo com os resultados obtidos, concluíram que a validade deste método, particularmente dos intervalos de confiança de 95%, é problemática, pois o desvio padrão calculado a partir dos dados experimentais excede

consideravelmente o pressuposto no método do nomograma. Para além disso, este método demonstra uma tendência clara de sobrestimação do IPM em casos com peso corporal elevado e grande área de superfície.²⁰

Para tentar reduzir a margem de erro associada ao método do nomograma, alguns investigadores têm vindo a associar outros métodos independentes da temperatura, como o *livor mortis*, o *rigor mortis*, a estimulação elétrica do músculo esquelético e a reação das pupilas a fármacos (atividade supravital).^{3,12,15,16} Contudo, até mesmo estes métodos só podem ser utilizados durante o período *postmortem* precoce.¹²

4.1.2. *Livor mortis*

O *livor mortis* (ou livores cadavéricos) é a alteração que surge mais precocemente no período *postmortem*.³ Representa a mudança de coloração na superfície da pele do cadáver, e é resultante da hipóstase que ocorre, quando a circulação sanguínea cessa.^{3,15,21} A hipóstase, por sua vez, define-se como a sedimentação dos fluídos corporais sob influência da gravidade.¹⁵

A disposição dos livores depende da posição do cadáver.¹⁵ O sangue acumula-se nas zonas mais baixas do corpo, com exceção das áreas de maior pressão (zonas de suporte), onde a pele permanece branca.^{3,15} Numa fase inicial (i.e. até às 6 hpm), os livores são móveis e desaparecem ao serem pressionados. Contudo, com o aumento do IPM, os livores tendem a fixar-se, sendo que após as 12 hpm deixam de se redistribuir, mesmo com mudanças na posição do cadáver (Figura 3).³ A ausência de concordância entre a disposição dos livores e a posição em que o corpo foi encontrado é um dado sugestivo de que o corpo tenha sido manipulado, transportado ou mudado de local, assumindo uma grande relevância nas investigações criminais.³

Os livores cadavéricos podem ser visíveis 20 a 30 minutos após a morte^{2,15}, surgindo como manchas cor de rosa ténues, nos estágios iniciais. Com o aumento do IPM, as manchas coalescem gradualmente e mudam de coloração, passando a uma cor arroxeadada.³

A Tabela I apresenta os dados da literatura, recolhidos entre 1905 e 1963, referentes à relação da hipóstase com o IPM.¹⁶ Similarmente, Salam et al.² demonstraram, mais recentemente, a existência de uma correlação significativa entre a hipóstase e o IPM. Nesse estudo (n=70), a hipóstase foi categorizada em quatro fases, de acordo com o movimento dos livores à pressão digital. A maioria dos casos com score 3 (livores difíceis de mobilizar à pressão digital) apresentava um IPM inferior a 12 horas, enquanto que todos os casos com score 4 (livores fixos, não mobilizáveis à pressão digital) apresentavam um IPM superior a 12 horas.

A espectrofotometria tem sido estudada como um método para medir quantitativamente a mudança de cor e intensidade dos livores em diferentes tecidos, com o intuito de determinar o

IPM.^{15,21} No entanto, este método mostrou-se impreciso e inadequado devido às grandes variações na ocorrência, coloração e distribuição do *livor mortis*, em diferentes cadáveres.^{5,21}

4.2. Alterações Físico-químicas

4.2.1. Rigor mortis

Sabe-se que, imediatamente após a morte, há uma flacidez muscular generalizada, geralmente seguida por um período de rigidez parcial ou total que, por sua vez, se extingue à medida que surgem os sinais de decomposição. Esta sequência de eventos é despoletada por processos físico-químicos⁶, nomeadamente o decréscimo da concentração de ATP, abaixo dos 85% do normal.¹⁵ A diminuição de ATP, e aumento do ácido láctico, resulta numa ligação irreversível entre as fibras de actina e miosina, o que justifica a rigidez cadavérica.²²

O *rigor mortis* (ou rigidez cadavérica) começa a instalar-se 3 a 4 horas após a morte, atingindo um pico máximo entre as 6 e as 12 hpm. O período de rigidez completa pode persistir durante 18 a 36 horas, dependendo da temperatura ambiente. Após este período de tempo, a massa muscular começa a sofrer autólise, libertando a rigidez gradualmente.^{3,10,15} A rigidez cadavérica não se instala simultaneamente em todas as fibras musculares, tendendo a progredir, sucessivamente, numa direção craniocaudal. Este fenómeno pode ser útil para estabelecer uma estimativa aproximada do IPM.³

Tendo por base estes fundamentos teóricos, Salam et al.² categorizaram o *rigor mortis* em cinco fases, de acordo com o aparecimento e resolução da rigidez, numa amostra de 70 cadáveres com intervalos *postmortem* conhecidos. Os autores demonstraram a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre a rigidez e o IPM, o que vai de encontro à literatura existente.

Existem, no entanto, muitas exceções para a generalização dos intervalos temporais supracitados. O tempo de instalação da rigidez é muito variável (Tabela II), tornando o *rigor mortis* um indicador impreciso do IPM.^{3,15,16} O aparecimento, duração e resolução do *rigor mortis* dependem de vários fatores, incluindo a temperatura ambiente e o estado metabólico do corpo, no momento da morte²² (e.g. quantidade de glicogénio no músculo³). Portanto, a rigidez pode desenvolver-se de forma mais rápida em temperaturas ambiente baixas, bem como em pessoas que morrem durante, ou logo após o esforço físico ou exaustão.^{3,22}

4.2.1. Reatividade supravital

As reações supravitais são reações, induzidas por excitação, que ocorrem desde o momento da morte até à completa cessação das funções celulares.²³ Algumas reações supravitais têm uma grande relevância prática na medicina forense, porque podem ser facilmente examinadas no local do crime e fornecem um resultado imediato. Estas reações incluem a excitabilidade mecânica e elétrica do músculo esquelético e a excitabilidade da íris induzida por fármacos.^{3,7}

A contração idiomuscular é a contração localizada dos músculos esqueléticos no local da estimulação mecânica.²⁴ A excitabilidade mecânica do músculo esquelético é examinada batendo com força num músculo (e.g. bíceps braquial) com o cabo de uma faca.³ Até ao momento, poucos estudos foram publicados neste âmbito e os dados disponíveis relativamente aos limites temporais para este fenómeno são escassos e inconsistentes.²⁴

Warther et al.²⁴ investigaram a contração idiomuscular, após estimulação mecânica, no músculo esquelético de 270 cadáveres. Os investigadores verificaram que o limite temporal para uso deste método são as 13 hpm. Estudos anteriores apontaram um intervalo de 8-12 hpm para o limite da contração idiomuscular, por estimulação mecânica.³

Relativamente à excitabilidade elétrica do músculo esquelético, a maioria dos estudos refere o músculo *orbicularis oculi* como sendo o mais apropriado e acessível, uma vez que os movimentos deste músculo são facilmente visíveis. Para caracterizar a resposta muscular à excitação (i.e. contração muscular) os autores fazem uma descrição verbal e classificação subjetiva, de acordo com a força da contração e a propagação do movimento para áreas distantes dos elétrodos. Com um aumento do IPM, a contração enfraquece e a resposta muscular passa a ser confinada ao local da excitação.³

Comparativamente ao músculo esquelético, o músculo liso da íris é excitável por um período mais longo.^{3,10} Em alguns casos, a excitabilidade despoletada por injeção subconjuntival de norepinefrina ou acetilcolina pode ser observada até 46 hpm. Neste caso, a reação mede-se através do efeito no diâmetro pupilar, sendo que uma reação positiva pode ser caracterizada tanto por um aumento como por uma diminuição desse diâmetro.³

4.3. Alterações Bioquímicas

A tanatoquímica é o campo das ciências forenses destinada a descrever as mudanças que ocorrem na composição química do corpo humano, no período *postmortem*, podendo facultar dados quantitativos que auxiliam na determinação do IPM.²

Ao longo dos últimos 50 anos, têm sido propostos vários métodos químicos para estimar o IPM.¹⁴ Entre essas abordagens, o estudo das alterações bioquímicas dos fluídos biológicos, tornou-se uma das principais estratégias.^{19,25} Os perfis metabólicos nos diferentes fluídos biológicos refletem alterações endógenas tanto que, após a morte, verificam-se alterações nesses perfis.²³

Atualmente, os métodos bioquímicos avaliam a formação de compostos orgânicos voláteis, variação na concentração de proteínas, mudanças na atividade de enzimas e alterações na produção de metabolitos.⁵ Os estudos realizados neste âmbito utilizam amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), humor vítreo (HV), líquido sinovial e líquido pericárdico. Dentre estas amostras, o HV ganhou a maior popularidade.^{19,25-27}

4.3.1. Alterações no humor vítreo

O HV tem sido utilizado em investigações *postmortem* há várias décadas, com o objetivo de clarificar questões forenses, nomeadamente a determinação do IPM.^{14,15,25,28,29} Consiste num gel hidrofílico, incolor e gelatinoso, armazenado no corpo vítreo, numa quantidade de cerca de 4 a 5 ml.²⁹

O HV é um meio adequado para o estudo das alterações químicas, pois é isolado, relativamente inerte, bem protegido anatomicamente e de fácil amostragem.^{13,14,27,30} É passível de ser estudado mesmo após traumatismo craniano grave.^{14,26} Para além disso, está menos sujeito a contaminação e putrefação, comparativamente a outras matrizes biológicas (sangue e LCR).^{13,14,19,28,30} No HV, as alterações químicas ocorrem de forma lenta, o que permite estender o período de tempo para fins de determinação do IPM.^{2,13,14,19,25,26,28-30}

Os analitos que podem ser quantificados no HV são sobretudo iões, cujas concentrações variam devido aos processos autolíticos *postmortem* – aumento da concentração de potássio e diminuição das concentrações de sódio e cloro no compartimento extracelular. Para além disso, as alterações metabólicas, ocorridas no período *postmortem*, são responsáveis pelo aumento de moléculas de baixo peso molecular como a amónia, ácido láctico e hipoxantina, bem com o decréscimo da concentração de glicose.^{3,19,25,28-30} Entre estes parâmetros, o mais estudado é o potássio (K⁺).^{13,15,26,30}

Sob condições fisiológicas, a concentração intracelular de K⁺ é elevada (≈150 mmol/L) em todas as células do corpo.¹² Após a morte, e com a disrupção do transporte ativo e da permeabilidade seletiva das membranas, devido aos fenómenos de autólise, inicia-se a difusão passiva do K⁺ intracelular para o fluído extracelular.^{2,12,19,26,27} Portanto, no período *postmortem*, a concentração deste ião no humor vítreo aumenta gradualmente devido à sua migração das

células da retina e da coroide para o corpo vítreo, até se atingir o equilíbrio entre os compartimentos intra e extracelulares.^{2,12,29,30}

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a utilidade da determinação dos níveis de potássio no humor vítreo para estimar o IPM.^{2,12,32,14,15,19,25,26,28,29,31} Contudo, a aplicabilidade deste método tem sido limitada devido às grandes discrepâncias existentes entre diferentes investigadores, relativamente à equação mais precisa para descrever o aumento de K^+ no HV, e estimar o IPM.^{12,29,30} Estas divergências podem ser atribuídas a inúmeros fatores, tais como: temperatura ambiente, causa de morte, idade, duração do período de agonia, existência de doenças crónicas, condições de armazenamento dos cadáveres, modos de coleção de amostras e diferentes técnicas analíticas usadas pelos autores.^{8,13,14,30}

Apesar dos conflitos existentes na literatura sobre qual a equação mais adequada para pôr em prática a determinação do IPM, existe um amplo consenso no que toca ao aumento linear do K^+ no HV, com o aumento do IPM (Figura 4).^{2,8,12,29,33} Em contrapartida, Zilg et al.¹² demonstraram, recentemente, que o aumento da concentração de K^+ no HV segue uma curva não-linear (Figura 5). Para além disso, e em concordância com Rognum et al.³¹, Zilg mostrou que existe um aumento da $[K^+]$ em resposta a um aumento da temperatura ambiente.¹² Demonstrou, ainda, que a idade do indivíduo influencia significativamente o aumento da $[K^+]$ – verifica-se um declive mais acentuado em crianças, comparativamente aos adultos. A fórmula desenvolvida por Zilg et al.¹², para estimar o IPM, inclui as variáveis $[K^+]$, idade e temperatura ambiente.

Em 1991, introduziu-se a hipoxantina (Hx) como um novo marcador.^{31,34} Desde então, a utilidade da sua determinação no HV, com o fim de estimar o IPM, já foi demonstrada em vários estudos.^{2,14,26,31,32} A Hx é um produto da degradação da adenosina monofosfato (AMP)³⁴ e, à semelhança do K^+ , a sua concentração também aumenta no período *postmortem*.^{2,14,26,31,35,36} Pensa-se que este aumento se deva ao aumento da concentração de AMP, diminuição da transformação de Hx em ácido úrico e inibição da xantina oxidase.^{2,35} Para Zilg et al.¹², a desvantagem da Hx prende-se com o facto de que a determinação da sua concentração requer mais tempo, bem como procedimentos mais sofisticados. Para além disso, a Hx pode representar um marcador de hipóxia³⁴, de modo que o estado *antemortem* do indivíduo e as circunstâncias da sua morte devem ser bem esclarecidas antes de interpretar os resultados.³⁵

Com o intuito de diminuir as margens de erro associadas ao IPM, Rognum et al.³¹ estudaram o IPM, combinando as concentrações de K^+ e Hx, com ajustes para a temperatura ambiente. As regressões lineares apresentadas neste estudo estimam o IPM com um intervalo de confiança de 95%. Na mesma ordem de ideias, Cordeiro et al.¹⁴ desenvolveram e validaram, recentemente, cinco modelos matemáticos simples que integram os valores analíticos do HV, temperatura ambiente, temperatura retal e peso corporal. O tamanho da amostra (n=331) é um

dos maiores entre as publicações relacionadas com este tema. De todos os modelos desenhados e testados, o que melhor estima o IPM utiliza a temperatura retal, peso corporal e as concentrações de Hx, K^+ e ureia, presentes no HV.¹⁴

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a quantificação de K^+ e Hx no humor vítreo.^{26,32,36} Atualmente, as técnicas mais utilizadas para este fim são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), a eletroforese capilar (CE) e a fotometria de chama.^{14,26,31,32,35,36} A LC-MS tem vindo a tornar-se cada vez mais importante na toxicologia forense como uma técnica para análises de rotina. Para além da quantificação de K^+ e Hx, esta técnica tem sido empregue na identificação e quantificação de drogas de abuso, fármacos e venenos, em amostras *postmortem* de sangue, plasma, urina, LCR, HV, fígado e cabelo.³²

Contudo, e apesar de todos os avanços feitos nesta área, permanecem os problemas relativos à calibração e validação, bem como o uso de diferentes metodologias e instrumentação, em diferentes laboratórios, o que pode levar à obtenção de concentrações díspares de uma mesma amostra.^{28,32}

O aumento da concentração de amónio (NH_4^+), no período *postmortem*, é um facto conhecido^{23,25,30}. No entanto, existem muito poucos estudos que correlacionem este facto com o IPM. Na prática, este analito tem sido negligenciado ao longo dos anos devido aos variáveis fenómenos de putrefação que ocorrem nos cadáveres, dificultando a sua análise.³⁰ Assim sendo, Gottardo et al.³⁰ estudaram recentemente a variação da concentração de NH_4^+ no HV, através do método de CE. Neste estudo, verificou-se que a concentração de NH_4^+ aumentou, de forma linear, até às 250 hpm, intervalo de tempo mais alargado do que aquele oferecido pela análise do K^+ (limitado a cerca de 90-100 hpm). Deste modo, validou-se um novo método para a determinação de NH_4^+ no HV, com o objetivo de fornecer uma nova ferramenta para estudos tanatoquímicos. No seguimento deste estudo, Musile et al.²⁵ desenvolveram um dispositivo baseado na difusão de gases para a deteção de NH_4^+ , no HV, passível de ser utilizado no local de crime, para estimar o IPM. O dispositivo é simples e pouco dispendioso, não requer pessoal qualificado e fornece resultados em poucos minutos.

Vários autores concluíram que as concentrações de sódio, cálcio, cloro e glicose, no humor vítreo, não desempenham um papel importante na determinação do IPM.^{28,29,33,37,38}

4.3.2. Alterações no líquido cefalorraquidiano

Vários estudos, ao longo dos anos, demonstraram a utilidade das alterações bioquímicas no LCR para a determinação do IPM, contudo, nenhum estudo havia comparado os resultados

entre LCR e HV. Swain et al.¹⁹ compararam a análise bioquímica *postmortem* dos dois fluidos biológicos e estudaram quais os parâmetros que melhor se correlacionam com o IPM. Os parâmetros estudados foram o potássio, glicose, sódio, cálcio, ureia e creatinina. O autor concluiu que, tanto no LCR como no HV, a concentração de K⁺ é a que melhor se correlaciona com o IPM. Porém, demonstrou que o humor vítreo é uma amostra mais adequada do que o LCR, para uma estimativa precisa do IPM.

4.3.3. Alterações no sangue

Historicamente, a análise da composição do sangue, no período *postmortem*, foi extensivamente estudada, uma vez que o sangue transporta a maioria das substâncias existentes no corpo.⁵ Contudo, eventualmente demonstrou-se que os fenômenos autolíticos ocorrem de forma mais rápida no sangue, comparativamente ao LCR e HV.³ Esse pressuposto levou a um grande aumento de interesse no estudo dessas matrizes biológicas, em detrimento do sangue.³

Muitas das pesquisas sobre o uso de marcadores bioquímicos no sangue, para determinar o IPM, foram realizadas há décadas atrás. Alguns desses marcadores, como a hipoxantina, fósforo, amônia, AST e LDH, mostraram ser altamente promissores. Contudo, existem poucos artigos atuais sobre esse assunto. As técnicas mais recentes, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, mais sensível e específica do que os métodos usados no passado, possibilitam uma grande margem aos investigadores para revisitarem alguns dos marcadores bioquímicos e reexaminá-los.⁵

Donaldson e Lamont²³ avaliaram as alterações metabólicas do sangue, resultantes da degradação dos tecidos, no período *postmortem*. Os parâmetros estudados foram o pH e as concentrações de ácido láctico, hipoxantina, ácido úrico, amônia, NADH e formato. Os autores realizaram um estudo *in vivo* (retirando sangue diretamente dos cadáveres de ratos e porcos) e um estudo *in vitro* (com amostras de sangue de ratos e humanos). Dos marcadores avaliados, a hipoxantina, amônia e NADH são os mais promissores na determinação do IPM, já que este estudo demonstrou que as suas concentrações aumentam linearmente com o IPM. No entanto, são necessários estudos confirmatórios *in vivo* para perceber se estes resultados são representativos do sangue humano.

No mesmo seguimento, Dinis-Oliveira et al.³⁹ avaliaram as alterações de 46 parâmetros bioquímicos no sangue humano, incluindo substratos, proteínas, enzimas, eletrólitos e lípidos. Os resultados deste estudo identificaram a bilirrubina total e direta, ureia, ácido úrico, transferrina, imunoglobulina M, creatina quinase, aspartato aminotransferase, cálcio e ferro como potenciais biomarcadores na determinação do IPM. Estes parâmetros bioquímicos foram usados para

desenvolver modelos matemáticos que poderão ser usados como procedimentos complementares às metodologias já utilizadas, no âmbito do IPM.

Mais recentemente, Kumar et al.⁴⁰ estudaram a degradação da troponina-T cardíaca (cTnT) e a sua associação com o IPM, em humanos. Os resultados obtidos demonstram que existe uma correlação direta entre as duas variáveis. Assim sendo, os autores concluíram que a degradação da cTnT pode ser útil para estimar o IPM, num intervalo de tempo alargado (i.e. até 8 dias *postmortem*). Estes resultados estão de acordo com estudos precedentes.⁴⁰ Após validação, esta técnica pode ser usada, em combinação com outros métodos estabelecidos, para melhorar a determinação do IPM.

4.4. Decomposição

O processo de decomposição cadavérica consiste na destruição dos tecidos moles do cadáver, por ação de bactérias, fungos e insetos.^{22,41} Fundamentalmente, dois processos são responsáveis pelos fenómenos de decomposição: a autólise de células individuais (por alterações químicas internas) e a autólise de tecidos (por libertação de enzimas e por ação de bactérias e fungos com origem no intestino e no meio ambiente).¹⁵ Ambos os processos iniciam-se imediatamente após a morte.⁴²

As principais alterações decorrentes dos tecidos em decomposição são alterações de cor, evolução de gases e liquefação.⁴¹ A decomposição torna-se visível externamente como uma descoloração da pele azul-esverdeada. Geralmente, começa na fossa ilíaca direita e daí progride para o resto do corpo.⁴² Posteriormente, o abdómen distende-se devido à formação de gás nos intestinos, por fermentação microbiana.⁴³ Em consequência da desidratação, a pele fica com aparência de couro, descolorada, escurecida e endurecida. À medida que o processo de decomposição avança, partes do esqueleto ficam expostas.⁴²

Não existe uma clara delimitação entre as várias fases da decomposição, mas sim uma sobreposição.⁴² Sendo um processo contínuo, a definição de estádios é, de certa forma, arbitrária.⁴³ A decomposição pode apresentar variações de evolução de cadáver para cadáver, de ambiente para ambiente e até mesmo em regiões diferentes do mesmo cadáver (e.g. uma parte do cadáver pode apresentar-se mumificada, enquanto o restante está em estado de putrefação).¹⁵

A velocidade dos processos de decomposição é muito variável, mas é sobretudo influenciada por quatro fatores amplamente reconhecidos: temperatura, humidade, pH e pressão parcial de oxigénio.⁴² A ação de animais vertebrados no cadáver também pode acelerar o processo de decomposição.^{9,15} Além disso, os fatores variam geograficamente e localmente.⁴⁴ Em

circunstâncias específicas, por exemplo, em ambientes quentes e secos, pode ocorrer mumificação dos tecidos, enquanto que a formação de adipocera pode acontecer quando o cadáver se encontra num meio alcalino e anaeróbio (i.e. ambientes aquáticos).⁴² A maioria dos cadáveres não embalsamados sofre um processo de putrefação, no qual os tecidos se liquefazem até ao esqueleto.¹⁵

Os sinais de decomposição podem auxiliar na determinação do IPM.⁴⁵ O uso de fórmulas, para este efeito, requer uma quantificação numérica da decomposição.⁴² No entanto, essa estimativa é sempre subjetiva e incerta, mesmo quando realizada por patologistas forenses experientes.^{42,45-47} Atualmente, não existe um sistema de pontuação padronizado para a decomposição corporal.⁹ A maioria das abordagens tenta quantificar o processo de decomposição tendo em conta a aparência externa do cadáver.⁹

Em contrapartida, tecnologias desenvolvidas recentemente têm sido usadas para avaliar, de forma quantitativa, os processos de decomposição e a sua associação com o IPM.^{3,13} A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (H-MRS) tem sido aplicada na identificação de metabolitos provenientes da decomposição do tecido cerebral.^{3,4,7,11,13,45} A H-MRS possibilita uma análise química não invasiva, *in situ*, utilizando o equipamento de ressonância magnética. Como o tecido cerebral apresenta apenas pequenas variações metabólicas interindividuais, e está protegido das influências ambientais pelo crânio, espera-se que o aparecimento de metabolitos siga um cronograma reproduzível.^{3,4,13,45}

Ith et al. utilizaram a H-MRS, num modelo animal, para identificar substâncias envolvidas no processo de decomposição do tecido cerebral que mostrassem alterações inequívocas e significativas da sua concentração, sendo, por isso, úteis na determinação do IPM.^{4,11,45} O objetivo seria estimar o IPM até 3 semanas *postmortem*, período de tempo em que os métodos clássicos (i.e. *livor mortis*, *rigor mortis* e *algor mortis*) já não têm utilidade.¹¹ Os padrões de metabolitos obtidos neste modelo foram comparados com quatro casos humanos selecionados, para averiguar se o modelo animal é qualitativamente representativo da espécie humana.^{4,11} Alguns metabolitos foram encontrados, no período *postmortem*, tanto no modelo animal como no modelo humano.¹¹ Concluiu-se que a estimativa do IPM, combinando cinco metabolitos (ACE, ALA, BUT, fTMA e PROP), apresenta uma forte correlação com o IPM verdadeiro, até às 250 hpm.^{4,13}

Embora apenas poucos investigadores tenham acesso a este tipo de metodologia, é de esperar que o trabalho contínuo aumente o conhecimento sobre os processos químicos da decomposição, podendo levar a novas ideias potencialmente úteis na prática forense.¹⁵ As investigações futuras poderão debruçar-se sobre a identificação de novos metabolitos, bem como a determinação da influência das variações de temperatura na decomposição.³

Recentemente, tem surgido um interesse crescente no estudo de metabolitos com propriedades voláteis.⁴⁷⁻⁵⁰ Xia et al.⁴⁸ estudaram o conteúdo de azoto básico volátil total (ABVT) nos tecidos moles de cadáveres, usando a técnica de titulação conductométrica. Li et al.⁴⁷ analisaram a presença de trimetilamina (TMA) nos tecidos de cadáveres, usando a técnica de cromatografia gasosa. Pelletti et al.⁴⁹ determinaram os níveis de putrescina e cadaverina, em amostras de córtex cerebral humano, usando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Todos estes marcadores bioquímicos revelaram uma relação significativa com o IPM.⁴⁷⁻⁴⁹

4.5. Entomologia

A entomologia forense estuda o ciclo de vida dos insetos, para fins forenses e legais.^{7,51-53} O principal objetivo é a determinação do IPM.⁵¹⁻⁵³ Dependendo da acessibilidade e das condições ambientais, os insetos necrófagos rapidamente colonizam um cadáver fresco.⁵¹

A decomposição, como resultado da atividade de insetos no cadáver, é um processo contínuo, que pode ser medido, permitindo estimar o IPM até vários meses após a morte, dependendo das circunstâncias. Segundo Hayman e Oxenham⁹, a partir das 48 hpm, a entomologia forense é, com frequência, a única forma de determinar o IPM com alguma precisão. De facto, calculando a idade dos insetos em desenvolvimento no cadáver, é possível inferir um IPM mínimo (IPM_{min}), ou seja, o tempo decorrido desde a colonização inicial dos insetos.⁵¹ Como os primeiros insetos a colonizar o cadáver são, geralmente, as *Calliphoridae* (família de moscas), estas são usadas, com frequência, para estimar o IPM_{min}.^{51,52} As moscas têm um ciclo de vida com quatro etapas morfológicas: ovo, larva, pupa e adulto.⁵¹

A entomologia é particularmente útil quando o cadáver é encontrado no exterior, em climas quentes, mas recentemente mostrou-se que os métodos entomológicos também podem ser aplicados em climas frios.⁷ Isto indica que estes métodos podem ser usados para determinar o IPM numa variedade de condições climáticas.⁴³ Para além disso, a entomologia pode ajudar a determinar se um corpo foi transferido para o local onde foi encontrado, a partir de outro local,^{51,53} tendo em conta a existência de espécies de insetos típicas para determinados ambientes.⁷

A genética também tem demonstrado um papel preponderante na área da entomologia.⁵¹ Os estudos de expressão génica têm permitido determinar, de forma precisa, a idade das moscas que se encontram em estádios precoces do desenvolvimento (i.e. pupa), altura em que as características morfológicas não são suficientes para determinar a idade do inseto.⁵⁴

Este método representa uma ferramenta importante na prática da entomologia forense, pois permite obter uma estimativa mais precisa do IPM.^{7,54}

Contudo, como em qualquer abordagem, a entomologia forense tem as suas limitações. Por exemplo, vários parâmetros podem levar a um atraso da colonização (e.g. se o cadáver estiver embrulhado, baixas temperaturas, chuva), o que pode subestimar o IPM_{min} . Para além disso, o período de atividade dos insetos nem sempre corresponde ao IPM⁵⁵, uma vez que a infestação pode ter ocorrido *antemortem* (i.e. Miíase).⁵¹

4.6. Alterações Oftalmológicas

Os estudos que relacionam as alterações oftalmológicas com o IPM são poucos, e tendem a basear-se apenas na avaliação dos componentes bioquímicos do humor vítreo.⁵⁶ Contudo, já se demonstrou que determinadas alterações morfológicas e histológicas, em diferentes componentes do olho, podem ser ferramentas úteis e complementares para estimar o IPM.^{2,56}

A opacificação da córnea é um fenómeno *postmortem* importante. Pensa-se que este fenómeno é secundário à desidratação cadavérica. Atribuindo uma pontuação numérica (1 – 4), de acordo com o grau de opacidade da córnea, Salam et al.² demonstraram a existência de uma correlação positiva significativa entre este fenómeno e o IPM. Este resultado está em concordância estudos precedentes.

Para avaliar a utilidade do cristalino na determinação do IPM, Prieto-Bonete et al.⁵⁶ examinaram 80 lentes de coelho, enucleadas às 24, 48, 72 e 96 hpm. Avaliaram alterações na esfericidade e absorbância, a diferentes comprimentos de onda, e alterações histológicas. Tanto a esfericidade como a absorbância diminuíram de forma estatisticamente significativa. Houve ainda uma perda gradual da estrutura interna e organização dos componentes da lente, em função do IPM. Estas alterações no cristalino foram consideradas úteis na determinação do IPM, entre as 24 e 96 hpm. Estudos futuros, em humanos, poderão fornecer mais informações sobre o método proposto.

4.7. Genética

Para ser o mais precisa possível, a determinação do IPM requer a avaliação de parâmetros que se alterem com o tempo, no período *postmortem*. Esta definição parece encaixar-se no perfil dos ácidos nucleicos. De facto, com os avanços da biologia molecular, a análise da degradação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) tornou-se um foco de investigação na área das ciências forenses.^{6,7,57-63}

Acredita-se que o RNA seja mais suscetível à degradação do que o DNA, por ser menos estável e extremamente lábil.^{61,62,64} De facto, a degradação do RNA, no período *postmortem*, parece ser rápida e dependente do tempo.⁶⁵ Após a morte, o RNA é degradado por ribonucleases já existentes na célula e/ou com origem em bactérias.⁶⁵ Nesse sentido, a ideia de quantificar a degradação de RNA, como um possível indicador do IPM, já foi apresentado por alguns autores.^{6,59,61-63,65,66} A RT-qPCR é considerada um método apropriado para a detecção de perfis de mRNA devido à sua elevada sensibilidade e especificidade.^{64,65}

Contudo, e apesar do enorme potencial, existem várias variáveis que tornam a degradação do RNA imprevisível e difícil de quantificar. Um dos principais problemas relacionados com as amostras de tecidos humanos é a sua heterogeneidade, uma vez que os parâmetros *ante* e *postmortem* não podem ser controlados e, normalmente, não são inteiramente conhecidos.^{57,62} Para além das ribonucleases endógenas e exógenas, responsáveis pela rápida degradação do RNA *in vivo*, as condições ambientais e de armazenamento também influenciam a qualidade e integridade do RNA.^{6,66}

Não obstante, vários grupos concluíram que existe uma correlação estatisticamente significativa entre a degradação do RNA e o IPM.^{59,60,62,67,68} Esta ideia vai de encontro a Sampaio-Silva et al.⁶ que, usando diferentes tecidos de roedores (coração, fígado e quadríceps femoral), estudaram a degradação de RNA ao longo do IPM, usando a técnica de qPCR. A análise quantitativa de transcritos, nos diferentes tecidos, permitiu a identificação de 4 genes (*Actb*, *Gapdh*, *Ppia* e *Srp72*), no músculo quadríceps femoral, que se correlacionam significativamente com o IPM. Estes resultados permitiram desenvolver um modelo matemático para estimar o IPM. Contudo, salienta-se a necessidade de estudar, no futuro, a aplicabilidade destas estratégias em tecidos humanos.⁶

Várias evidências apontam que os sistemas de relógio biológico funcionam na maioria das células, e vários genes têm sido associados a este fenómeno. Se o relógio biológico para no momento da morte, a sua leitura pode ser valiosa para estimar o IPM. Kimura et al.⁶⁹ investigaram a expressão génica de moléculas envolvidas nos sistemas de oscilação do relógio circadiano (*Bmal1*, *Per2* e *Rev-Erb α 1*), em ratos e humanos, usando RT-qPCR. A autora defende a aplicabilidade deste método para estimar o IPM, embora sejam necessários mais estudos neste âmbito.

Os micro-RNAs (miRNAs) são uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificadoras, com um comprimento de 18 a 24 nucleótidos, que desempenham um papel regulador essencial em muitos processos celulares,^{61,64} nomeadamente na regulação de genes a nível pós-transcricional.⁷⁰ Apresentam características interessantes para uso em ciências forenses, como a expressão específica de tecido e maior resistência à degradação, em comparação com os

mRNAs.^{61,64,70} Para além disso, vários miRNAs têm sido relacionados com o ritmo circadiano, em modelos animais. Portanto, em teoria, a análise de miRNAs poderá ser útil para estimar algumas condições ambientais no momento da morte e, eventualmente, o IPM.⁷⁰ Para esse efeito, Odriozola et al.⁷⁰ analisaram os níveis de miRNA no humor vítreo, no período *postmortem*, contudo, não encontraram qualquer correlação com o IPM.

5. Conclusões

A vasta literatura existente, especialmente sobre os métodos químicos para estimar o IPM, continua em crescimento. Todavia, a vertente prática desmoraliza qualquer afirmação de avanços significativos na determinação do IPM por métodos químicos. Isto deve-se sobretudo aos processos subjacentes altamente variáveis (i.e. processos metabólicos, autólise e putrefação). De facto, a maioria destes métodos nunca ganhou relevância prática, uma vez que não correspondem às necessidades básicas – serem precisos, confiáveis e darem resultados imediatos. De um modo geral, os estudos apresentam desvios-padrão elevados, resultados amplamente divergentes entre autores e reduzida investigação sistemática das variáveis influenciadoras.

Contudo, no decorrer dos últimos anos, verificou-se que as alterações *postmortem* podem ser quantificadas recorrendo ao uso de novos métodos, mais sensíveis e específicos do que aqueles usados no passado. No entanto, deve-se ter em mente que a quantificação objetiva das alterações *postmortem* contribui apenas em pequena parte para uma determinação precisa do IPM. As novas tecnologias não completam a estimativa por si só. Somente quando estudos longitudinais, a longo prazo, analisarem a influência de determinados fatores, como a temperatura ambiente, será possível aumentar a precisão do IPM. A H-MRS possibilita uma excelente oportunidade para estudar esses fatores.

Embora os métodos analíticos tenham demonstrado vantagens claras comparativamente às abordagens tradicionais, baseadas apenas no arrefecimento corporal, avaliação de livores, rigidez e outros sinais de transformação, a sua adoção ainda está longe de ser amplamente difundida. De facto, estas abordagens exigem instrumentos caros e pessoal altamente qualificado, disponíveis apenas em poucos centros especializados. Isto impede o seu uso no local do crime, altura em que uma indicação preliminar do IPM poderia ser da maior importância para a investigação.

Os trabalhos de campo são um bom indicador do valor prático de um método, mas inexistem na maioria dos métodos, estando praticamente ausentes na literatura, à exceção do arrefecimento corporal. Assim, a generalidade das técnicas propostas para estimar o IPM são de

interesse meramente acadêmico, uma vez que descrevem apenas a dependência temporal de um analito ou parâmetro e utilizam, frequentemente, modelos animais. Estes métodos poderão vir a adquirir a devida relevância prática, no futuro, se uma série de critérios forem cumpridos – medições quantitativas, descrições matemáticas, ter em consideração a existência de fatores com influência quantitativa e confirmação de precisão.

Não obstante, já foram publicados bons artigos no âmbito da determinação do IPM. O principal intento será sempre o de fornecer provas científicas verídicas, evitando o insucesso da justiça, a todo o custo. Estimar o IPM não é uma ciência exata. O melhor que podemos obter é um palpite fundamentado, tendo em conta todos os fatores conhecidos. O objetivo deve ser limitar a margem de erro inerente à avaliação dos efeitos desses mesmos fatores.

Do anteriormente exposto conclui-se que a determinação do intervalo *postmortem* subsiste como uma questão utópica no âmbito da Patologia Forense. Nesse sentido, reforça-se a necessidade de desenvolver métodos validados por trabalho de campo, com o intuito de comprovar a exatidão e a confiabilidade dos métodos. Uma alienação ficcionada na interpretação dos dados só poderá ser evitada se a investigação tender, a longo prazo, para planeamentos rigorosos e objetivos.

6. Apêndice

Tabelas

Tabela I – Dados da literatura (1905–1963) referentes à relação da hipóstase com o IPM (hpm).

Stage	Mean	Standard deviation	Limits	
			Lower	Upper
Beginning	0.75	0.5	0.25	3
Confluence	2.50	1.0	1.00	4
Maximum	9.50	4.5	3.00	16
Thumb pressure	5.50	6.0	1.00	20
Complete shifting	3.75	1.0	2.00	6
Incomplete shifting	11.00	4.5	4.00	24

Retirado de Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Sci Int [Internet]*. 2004;144(2-3):167–75.

Tabela II – Dados da literatura (1811-1969) referentes ao desenvolvimento temporal da rigidez cadavérica (hpm).

Rigor state	Average hpm and standard deviation	Range of scatter in hours (2 s)		Number of quotations
		Lower limit	Upper limit	
Beginning	3 ± 2	–	7	26
Maximum	8 ± 1	6	10	28
Duration	57 ± 14	29	85	27
Complete resolution	76 ± 32	12	140	27

Retirado de Madea B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci Med Pathol*. 2016;12(4):451–85.

Figuras

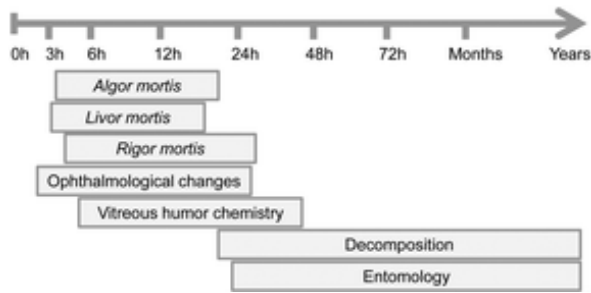


Figura 1 – Sequência de fenômenos postmortem ao longo do tempo.

Retirado de Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Costa I, Silvestre R, Magalhães T, Guedes de Pinho P. Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval. *Toxicol Res (Camb)* [Internet]. 2015;4:1443–52.

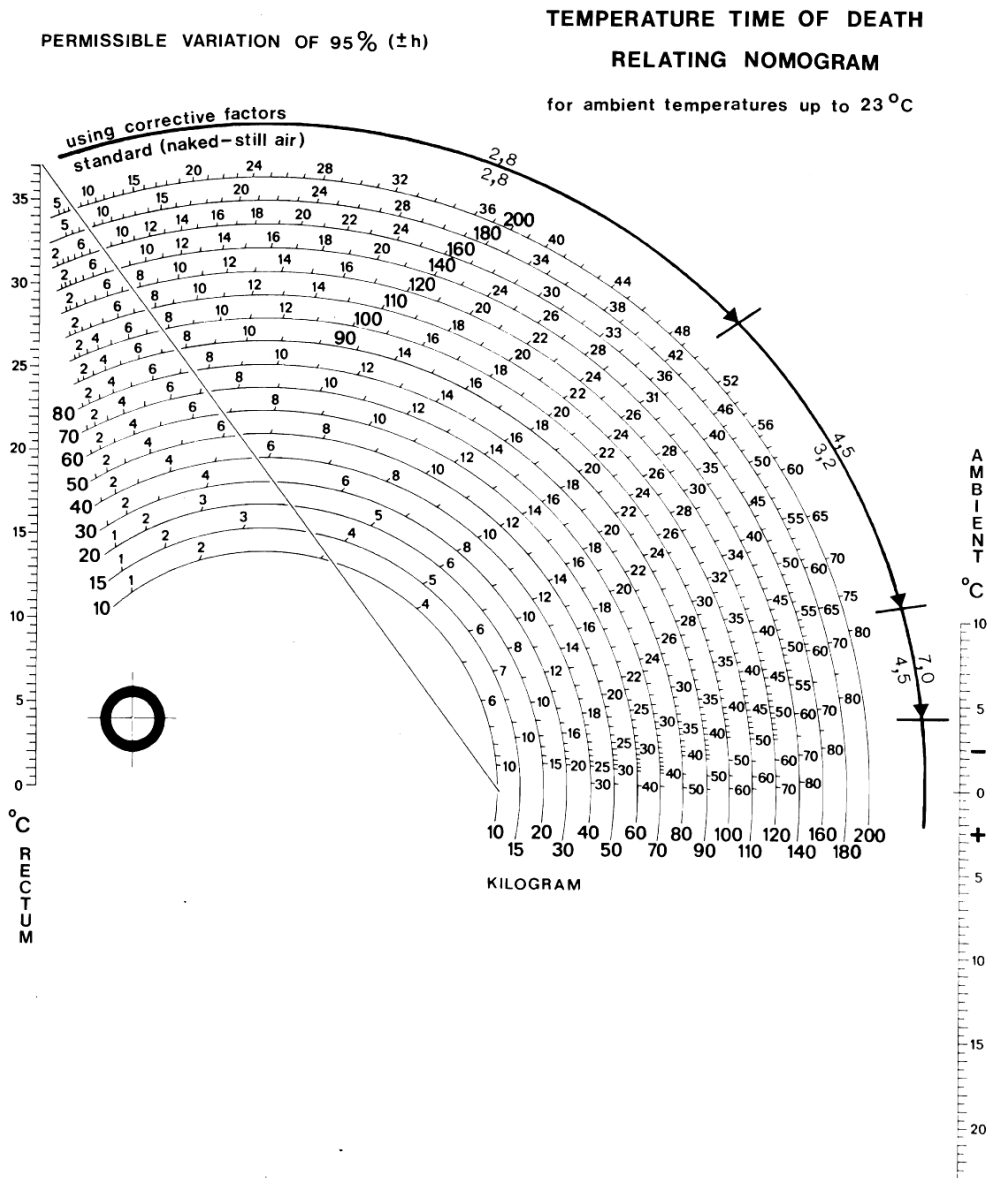


Figura 2 – Nomograma que relaciona a temperatura rectal com o IPM, em temperaturas ambiente até 23°C.

O nomograma pode ser descarregado do site do Instituto de Medicina Forense, Universidade de Bonn (https://www.rechtsmedizin.uni-bonn.de/dienstleistungen/for_Med/todeszeit/)

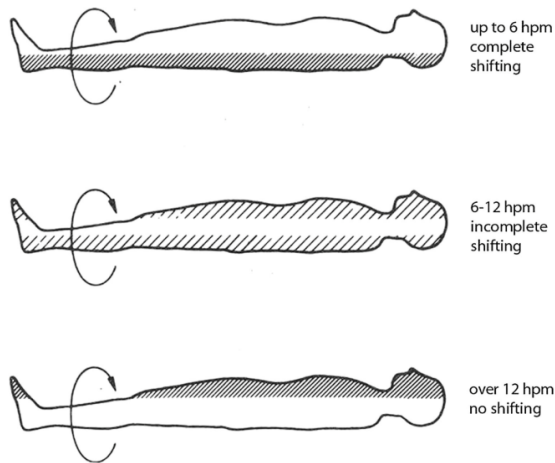


Figura 3 – Redistribuição dos livores após manipulação do cadáver.

Retirado de Madea B. *Methods for determining time of death. Forensic Sci Med Pathol.* 2016;12(4):451–85.

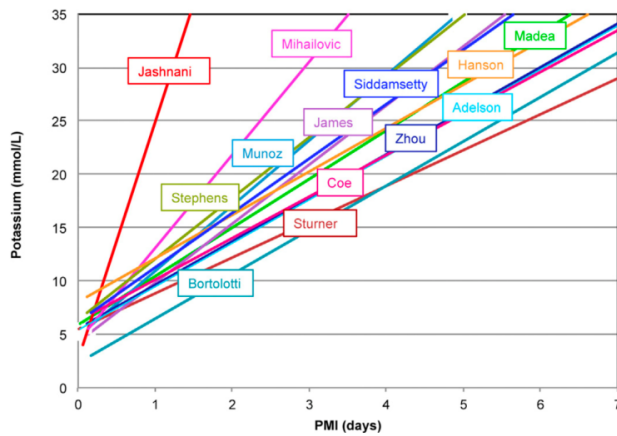


Figura 4 – Regressões lineares para o cálculo do IPM, em diferentes estudos, baseado na medição da concentração de potássio no humor vítreo.

Retirado de Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. *A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. Forensic Sci Int [Internet].* 2016;254:158–66.

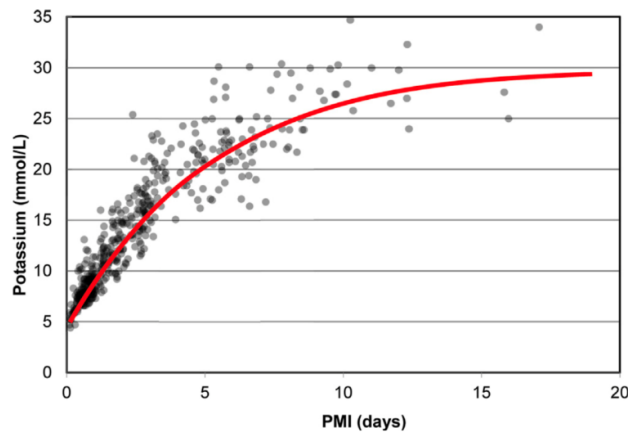


Figura 5 – Regressão não linear para o cálculo do IPM, baseado na medição da concentração de potássio no humor vítreo.

Retirado de Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. *A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. Forensic Sci Int [Internet].* 2016;254:158–66.

7. Bibliografia

1. Hubig M, Muggenthaler H, Mall G. Confidence intervals in temperature-based death time determination. *Leg Med.* 2015;17(1):48–51.
2. Salam HA, Shaat EA, Aziz MHA, MoneimSheta AA, Hussein HASM. Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes. *Alexandria J Med.* 2012;48(4):335–44.
3. Madea B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci Med Pathol.* 2016;12(4):451–85.
4. Scheurer E, Ith M, Dietrich D, Kreis R, Hüsler J, Dirnhofer R, et al. Statistical evaluation of time-dependent metabolite concentrations: Estimation of post-mortem intervals based on in situ ¹H-MRS of the brain. *NMR Biomed.* 2005;18(3):163–72.
5. Donaldson AE, Lamont IL. Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. *Aust J Forensic Sci.* 2014;46(1):8–26.
6. Sampaio-Silva F, Magalhães T, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ, Silvestre R. Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval. *PLoS One.* 2013;8(2).
7. Kaliszan M, Hauser R, Kernbach-Wighton G. Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. *Leg Med.* 2009;11(3):111–7.
8. Ortman J, Markwerth P, Madea B. Precision of estimating the time since death by vitreous potassium—Comparison of 5 different equations. *Forensic Sci Int.* 2016;269:1–7.
9. Hayman J, Oxenham M. Estimation of the time since death in decomposed bodies found in Australian conditions. *Aust J Forensic Sci.* 2017;49(1):31–44.
10. Poposka V, Gutevska A, Stankov A, Pavlovski G, Jakovski Z, Janeska B. Estimation of Time Since Death by using Algorithm in Early Postmortem Period. *Glob J Med Res Interdiscip.* 2013;13(3):17–26.
11. Ith M, Bigler P, Scheurer E, Kreis R, Hofmann L, Dirnhofer R, et al. Observation and identification of metabolites emerging during postmortem decomposition of brain tissue by means of in situ ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2002;48(5):915–20.
12. Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic Sci Int.* 2016;254:158–66.
13. Madea B. Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry? *Forensic Sci Int.* 2005;151(2–3):139–49.
14. Cordeiro C, Ordóñez-Mayán L, Lendoiro E, Febrero-Bande M, Vieira DN, Muñoz-Barús JI. A reliable method for estimating the postmortem interval from the biochemistry of the vitreous humor, temperature and body weight. *Forensic Sci Int.* 2019;295:157–68.
15. Saukko P, Knight B. *KNIGHT's Forensic Pathology.* 4th ed. CRC Press; 2016. 55–93 p.
16. Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Sci Int.* 2004;144(2–3):167–75.
17. Potente S, Kettner M, Ishikawa T. Time since death nomographs implementing the nomogram, body weight adjusted correction factors, metric and imperial measurements. *Int J Legal Med.* 2019;133(2):491–9.
18. Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death. *Forensic Sci Int.* 2007;165:182–4.
19. Swain R, Kumar A, Sahoo J, Lakshmy R, Gupta SK, Bhardwaj DN, et al. Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry. *J Forensic Leg Med.* 2015;36:144–8.
20. Hubig M, Muggenthaler H, Sinicina I, Mall G. Temperature based forensic death time estimation: The standard model in experimental test. *Leg Med.* 2015;17(5):381–7.
21. Usumoto Y, Kudo K, Tsuji A, Ihama Y, Ikeda N. Predictive equation for post-mortem interval using spectrophotometric values of post-mortem lividity: A pilot study. *Forensic Sci Int.*

- 2019;297:47–55.
22. Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M, editors. Current concepts in forensic entomology. 1st ed. Springer, Dordrecht; 2010. 1–376 p.
 23. Donaldson AE, Lamont IL. Biochemistry changes that occur after death: Potential markers for determining post-mortem interval. PLoS One. 2013;8(11):1–10.
 24. Warther S, Sehner S, Raupach T, Püschel K, Anders S. Estimation of the time since death: Post-mortem contractions of human skeletal muscles following mechanical stimulation (idiomuscular contraction). Int J Legal Med. 2012;126(3):399–405.
 25. Musile G, Gottardo R, Palacio C, Shestakova K, Raniero D, De Palo EF, et al. Development of a low cost gas diffusion device for ammonia detection in the vitreous humor and its preliminary application for estimation of the time since death. Forensic Sci Int. 2019;295:150–6.
 26. Passos MLC, Santos AM, Pereira AI, Rodrigo Santos J, Santos AJC, Saraiva MLMFS, et al. Estimation of postmortem interval by hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous humor with a sequential injection system. Talanta. 2009;79(4):1094–9.
 27. Madea B, Musshoff F. Postmortem biochemistry. Forensic Sci Int. 2007;165(2–3):165–71.
 28. Thierauf A, Musshoff F, Madea B. Post-mortem biochemical investigations of vitreous humor. Forensic Sci Int. 2009;192(1–3):78–82.
 29. Jashnani KD, Kale SA, Rupani AB. Vitreous humor: Biochemical Constituents in Estimation of Postmortem Interval. J Forensic Sci. 2010;55(6):1523–7.
 30. Gottardo R, Palacio C, Shestakova KM, Moskaleva NE, Bortolotti F, Tagliaro F. A new method for the determination of ammonium in the vitreous humour based on capillary electrophoresis and its preliminary application in thanatochemistry. Clin Chem Lab Med. 2019;57(4):504–9.
 31. Rognum TO, Holmen S, Musse MA, Dahlberg PS, Stray-Pedersen A, Saugstad OD, et al. Estimation of time since death by vitreous humor hypoxanthine, potassium, and ambient temperature. Forensic Sci Int. 2016;262:160–5.
 32. Lendoiro E, Cordeiro C, Rodríguez-Calvo MS, Vieira DN, Suárez-Peñaranda JM, López-Rivadulla M, et al. Applications of Tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS) in estimating the post-mortem interval using the biochemistry of the vitreous humour. Forensic Sci Int. 2012;223(1–3):160–4.
 33. Tumram NK, Bardale RV, Dongre AP. Postmortem analysis of synovial fluid and vitreous humour for determination of death interval: A comparative study. Forensic Sci Int. 2011;204(1–3):186–90.
 34. Rognum TO, Hauge S, Øyasaeter S, Saugstad OD. A new biochemical method for estimation of postmortem time. Forensic Sci Int. 1991;51(1):139–46.
 35. Madea B, Käferstein H, Hermann N, Sticht G. Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid - a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. Forensic Sci Int. 1994;65(1):19–31.
 36. Muñoz JI, Costas E, Rodríguez-Calvo MS, Suárez-Peñaranda JM, López-Rivadulla M, Concheiro L. A high-performance liquid chromatography method for hypoxanthine determination in vitreous humour: application to estimation of post mortem interval. Hum Exp Toxicol. 2006;25(5):279–81.
 37. Siddamsetty AK, Verma SK, Kohli A, Puri D, Singh A. Estimation of time since death from electrolyte, glucose and calcium analysis of postmortem vitreous humour in semi-arid climate. Med Sci Law. 2014;54(3):158–66.
 38. Chandrakanth H V., Kanchan T, Balaraj BM, Virupaksha HS, Chandrashekar TN. Postmortem vitreous chemistry-An evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death). J Forensic Leg Med. 2013;20(4):211–6.
 39. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Costa I, Silvestre R, Magalhães T, Guedes de Pinho P. Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval. Toxicol

- Res (Camb). 2015;4:1443–52.
40. Kumar S, Ali W, Singh US, Kumar A, Bhattacharya S, Verma AK, et al. Temperature-Dependent Postmortem Changes in Human Cardiac Troponin-T (cTnT): An Approach in Estimation of Time Since Death. *J Forensic Sci.* 2016;61(January):241–5.
 41. Mathur A, Agrawal YK. An overview of methods used for estimation of time since death. *Aust J Forensic Sci.* 2011;43(4):275–85.
 42. Vass AA. The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic Sci Int.* 2011;204(1–3):34–40.
 43. Metcalf JL. Estimating the postmortem interval using microbes: Knowledge gaps and a path to technology adoption. *Forensic Sci Int Genet.* 2019;38(July 2018):211–8.
 44. Ferreira MT, Cunha E. Can we infer post mortem interval on the basis of decomposition rate? A case from a Portuguese cemetery. *Forensic Sci Int.* 2013;226(1–3):298.e1-298.e6.
 45. Ith M, Kreis R, Scheurer E, Dirnhofer R, Boesch C. Using ¹H-MR Spectroscopy in Forensic Medicine to Estimate the Post-Mortem Interval: A Pilot Study in an Animal Model and its Application to Human Brain. *Proc Int Soc Magn Reson Med.* 2001;9:388.
 46. Gelderman HT, Kruiver CA, Oostra RJ, Zeegers MP, Duijst WLJM. Estimation of the postmortem interval based on the human decomposition process. *J Forensic Leg Med.* 2019;61(July 2018):122–7.
 47. Li W, Chang Y, Han L, Liu X, Cai J, Zha L, et al. Trimethylamine in postmortem tissues as a predictor of postmortem interval estimation using the GC method. *Leg Med.* 2018;35(August):80–5.
 48. Xia Z, Zhai X, Liu B, Mo Y. Conductometric titration to determine total volatile basic nitrogen (TVB-N) for post-mortem interval (PMI). *J Forensic Leg Med.* 2016;44:133–7.
 49. Pelletti G, Garagnani M, Barone R, Boscolo-Berto R, Rossi F, Morotti A, et al. Validation and preliminary application of a GC–MS method for the determination of putrescine and cadaverine in the human brain: a promising technique for PMI estimation. *Forensic Sci Int.* 2019;297:221–7.
 50. Perrault KA, Stefanuto PH, Dubois LM, Varlet V, Grabherr S, Focant JF. A minimally-invasive method for profiling volatile organic compounds within postmortem internal gas reservoirs. *Int J Legal Med.* 2017;131(5):1271–81.
 51. Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJR. Forensic entomology: Applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol.* 2011;7(4):379–92.
 52. Davies K, Harvey ML. Internal Morphological Analysis for Age Estimation of Blow Fly Pupae (Diptera: Calliphoridae) in Postmortem Interval Estimation. *J Forensic Sci.* 2013;58(1):79–84.
 53. Bugelli V, Forni D, Bassi LA, Di Paolo M, Marra D, Lenzi S, et al. Forensic Entomology and the Estimation of the Minimum Time Since Death in Indoor Cases. *J Forensic Sci.* 2015;60(2):525–31.
 54. Zehner R, Amendt J, Boehme P. Gene expression analysis as a tool for age estimation of blowfly pupae. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2009;2(1):292–3.
 55. Wells JD. A Forensic Entomological Analysis Can Yield an Estimate of Postmortem Interval, and Not Just a Minimum Postmortem Interval: An Explanation and Illustration Using a Case. *J Forensic Sci.* 2019;64(2):634–7.
 56. Prieto-Bonete G, Perez-Carceles MD, Luna A. Morphological and histological changes in eye lens: Possible application for estimating postmortem interval. *Leg Med.* 2015;17(6):437–42.
 57. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1–3):71–5.
 58. Vennemann M, Koppelkamm A. Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1–3):76–82.
 59. Birdsill AC, Walker DG, Lue LF, Sue LI, Beach TG. Postmortem interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank.* 2011;12(4):311–8.

60. Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M. RNA integrity in post-mortem samples: Influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med.* 2011;125(4):573–80.
61. Courts C, Madea B. Micro-RNA - A potential for forensic science? *Forensic Sci Int.* 2010;203(1–3):106–11.
62. Lv YH, Ma JL, Pan H, Zhang H, Li WC, Xue AM, et al. RNA degradation as described by a mathematical model for postmortem interval determination. *J Forensic Leg Med.* 2016;44:43–52.
63. Wang H, Ma J, Xu H, Lyu Y, Tao L, Li W, et al. Early postmortem interval (EPMI) estimation using differentially expressed gene transcripts. *Leg Med.* 2019;38(April):83–91.
64. Li WC, Ma KJ, Lv YH, Zhang P, Pan H, Zhang H, et al. Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Sci Justice.* 2014;54(4):307–10.
65. Ma J, Pan H, Zeng Y, Lv Y, Zhang H, Xue A, et al. Exploration of the R code-based mathematical model for PMI estimation using profiling of RNA degradation in rat brain tissue at different temperatures. *Forensic Sci Med Pathol.* 2015;11(4):530–7.
66. Sidova M, Tomankova S, Abaffy P, Kubista M, Sindelka R. Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomol Detect Quantif.* 2015;5:3–9.
67. Young ST, Wells JD, Hobbs GR, Bishop CP. Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. *Forensic Sci Int.* 2013;229(1–3):163.e1-163.e6.
68. Lv YH, Ma KJ, Zhang H, He M, Zhang P, Shen YW, et al. A time course study demonstrating mRNA, microRNA, 18S rRNA, and U6 snRNA changes to estimate PMI in deceased rat's spleen. *J Forensic Sci.* 2014;59(5):1286–94.
69. Kimura A, Ishida Y, Hayashi T, Nosaka M, Kondo T. Estimating time of death based on the biological clock. *Int J Legal Med.* 2011;125(3):385–91.
70. Odriozola A, Riancho JA, De La Vega R, Agudo G, García-Blanco A, De Cos E, et al. MiRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: A proof-of-concept pilot study. *Int J Legal Med.* 2013;127(3):573–8.