

MESTRADO EM MEDICINA-LEGAL

Determinação do intervalo post-mortem através do estudo de micro-RNA's extraídos de manchas de sangue colhidas a cadáveres.

Mónica Figueiredo Dias

M
2017

Mónica Figueiredo Dias. Determinação do intervalo post-mortem através do estudo de micro-RNA's extraídos...



Determinação do intervalo post-mortem através do estudo de micro-RNA's extraídos de manchas de sangue colhidas a cadáveres.

Mónica Figueiredo Dias



MÓNICA FIGUEIREDO DIAS

**DETERMINAÇÃO DO INTERVALO *POST-MORTEM*
ATRAVÉS DO ESTUDO DE MICRO-RNA'S EXTRAÍDOS
DE MANCHAS DE SANGUE COLHIDAS A CADÁVERES**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientadora - Doutora Maria de Lurdes Pontes Rebelo

Categoria - Professora associada convidada

Afiliação - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO: Determinação do intervalo *post-mortem* (PMI) através do estudo de micro-RNA's (miRNA's) extraídos de manchas de sangue colhidas a cadáveres

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

AUTOR: Mónica Figueiredo Dias

DATA: 18 de Dezembro de 2017

EDITOR: Mónica Figueiredo Dias

MORADA: Rua do Vale Maior, nº 76

LOCALIDADE: Póvoa de Varzim

CÓDIGO POSTAL: 4570 - 477 S. Pedro de Rates, Póvoa de Varzim

ENDEREÇO ELETRÓNICO: monica.fig.dias@gmail.com

2ª EDIÇÃO: 18 de Dezembro de 2017

**“What the mind can conceive and believe,
it can achieve.”**

Napolean Hill

AGRADECIMENTOS

Perto do culminar de uma das fases mais importantes da minha formação académica é imprescindível agradecer a todos os que contribuíram para a sua realização, tanto de forma direta como indireta.

À Doutora Lurdes Rebelo pela orientação, conhecimentos transmitidos e por todo o apoio demonstrado ao longo da elaboração da minha tese. Agradeço também toda a paciência demonstrada ao longo deste percurso.

Gostaria de agradecer também à Doutora Maria João Anjos por me ter permitido realizar o estágio no SGBF-N.

A todos os doutores e restante equipa do Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte (SGBF-N) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP (INMLCF, IP) por se mostrarem sempre disponíveis para ajudar e por me terem recebido bem no serviço.

Aos Doutores Rui Medeiros e Ana Luísa Teixeira e, também, à Francisca, por tão bem me acolherem no Instituto Português de Oncologia (IPO) do Porto e me terem transmitido os conhecimentos e técnicas essenciais para a concretização dos objetivos pretendidos nesta tese.

À professora Doutora Maria José Pinto da Costa por toda a disponibilidade e apoio prestado ao longo de todo o mestrado.

À Doutora Sofia Frazão, do Serviço de Patologia Forense, por disponibilizar as manchas de sangue utilizadas neste trabalho.

Ao meu namorado por me dar a força e coragem para enfrentar todas as dificuldades, sem nunca desanimar, e por me ajudar a acreditar que tudo era possível. Agradeço toda a paciência demonstrada neste último ano.

Por último, mas não menos importante, um enorme obrigada à minha família por tudo o que fazem por mim! Em especial, agradeço aos meus pais por todos os

esforços que fizeram nestes últimos anos, sem eles não seria possível estar prestes a concluir este mestrado.

A todos, o meu muito obrigada!

ABREVIATURAS

°C: graus Celsius;

°F: graus Fahrenheit ($^{\circ}\text{F} = ^{\circ}\text{C} \times 1,8 + 32$);

μL: microlitros;

ADN: ácido desoxirribonucleico;

ATP: adenosina trifosfato;

cDNA: DNA complementar;

COX: citocromo-c oxidase;

C_t: valor de *cycle threshold* (obtido na quantificação por PCR);

HIV: vírus da imunodeficiência humana;

INMLCF, IP: Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP;

LDH: lactato desidrogenase;

mRNA: RNA mensageiro;

miRNA ou miR: micro-RNA;

MDH: malato desidrogenase;

mL: mililitros;

Nt: nucleótidos;

PCR: reação em cadeia de polimerase;

PMI: intervalo *post-mortem*;

Pre-miRNA: precursor de micro-RNA;

Pri-miRNA: micro-RNA primário;

RNA: ácido ribonucleico;

RQ: quantificação relativa;

RT: transcriptase reversa;

SGBF-N: Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP;

STR's: *short tandem repeats*;

XPO-5: exportina-5.

CONTEÚDOS

Informação técnica	i
Agradecimentos	v
Abreviaturas	vii
Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
1.1 Estimativa do intervalo <i>post-mortem</i>	11
1.1.1 Métodos clássicos	12
1.1.1.1 Processos físicos	12
1.1.1.2 Processos físico-químicos	14
1.1.1.3 Processos tanatoquímicos	15
1.1.1.4 Processos microbiológicos	17
1.1.1.5 Processos entomológicos	18
1.1.1.6 Evidências botânicas	19
1.1.2 Novas metodologias	19
1.1.2.1 Ácidos nucleicos	19
1.2 Potencial do micro-RNA nas ciências forenses	20
1.2.1. Os micro-RNA's na diferenciação de fluídos biológicos com interesse forense	22
1.2.2 Os micro-RNA's na determinação da causa de morte	24
1.2.3 Os micro-RNA's na estimativa do intervalo <i>post-mortem</i>	24
Objetivos	27
2.1 Objetivo principal	29
2.2 Objetivos específicos	29
Material e métodos	31
3.1 Seleção de micro-RNA's a estudar	33
3.2 Obtenção de manchas de sangue	33

3.3 Fase I – Utilização do <i>kit “miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR”</i> (Exiqon)	36
3.3.1 Extração de micro-RNA’s	36
3.3.2 Determinação da concentração do micro-RNA	37
3.3.3 Síntese de DNA complementar e quantificação dos micro-RNA’s por PCR em tempo-real	37
3.4 Fase II – Utilização do <i>kit “miScript®II RT”</i> (Qiagen)	38
3.4.1 Extração de micro-RNA’s	38
3.4.2 Conversão em DNA complementar	39
3.4.3 Quantificação relativa por PCR em tempo-real	39
3.5 Análise estatística	40
Resultados	41
4.1. Fase I – Utilização do <i>kit “miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR”</i> (Exiqon)	43
4.1.1 Resultados obtidos na quantificação relativa por PCR em tempo-real	44
4.2 Fase II – Utilização do <i>kit “miScript®II RT”</i> (Qiagen)	47
4.2.1 Resultados obtidos na quantificação relativa por PCR em tempo-real	48
Discussão	51
Considerações finais	55
6.1 Conclusões	57
6.2 Perspetivas futuras	58
Referências bibliográficas	59
Anexos	67

✓ Lista de figuras:

Figura 1. Livor <i>mortis</i> num cadáver na posição de supino. Há acumulação de sangue nas zonas inferiores do corpo, que estão em contato com a superfície. Adaptado de [11]	13
---	----

Figura 2. Rigor <i>mortis</i> – a posição que o cadáver apresenta corresponde àquela em que se encontrava aquando a morte. Acedido a: 22 de maio de 2017, em: https://plus.google.com/+RubenMartin11955781/posts/5jVWSnHHHhe	14
Figura 3. Coloração escura na esclerótica dos olhos de um cadáver, que surge devido à secagem que ocorre após a morte. Adaptado de [11]	15
Figura 4. Cadáveres em diferentes momentos da decomposição. Acedido a: 23 de maio de 2017, em: http://www.malthus.com.br/mg_imagem_mapa.asp#setmenu	18
Figura 5. Biogénese de miRNA's – esta ocorre no núcleo e no citoplasma. Adaptado de [42]	21
✓ <u>Lista de esquemas:</u>	
Esquema 1. Momentos de decomposição que ocorrem ao longo do PMI. Adaptado de [12]	17
✓ <u>Lista de tabelas:</u>	
Tabela 1. miRNA's (ou miR's) específicos para os fluídos biológicos mais importantes para as ciências forenses. Adaptado de: [9], [51]-[56]	23
Tabela 2. Registo das amostras pertencentes ao grupo de estudo – manchas de sangue colhidas a cadáveres (A: o mais próximo possível da hora da morte; PT.P: no momento da autópsia médico-legal)	34
Tabela 3. Registo das amostras pertencentes ao grupo-referência – manchas de sangue colhidas a indivíduos voluntários e saudáveis	35
Tabela 4. Valores de C_T obtidos na primeira quantificação relativa realizada por PCR em tempo-real para o gene de referência miR-103a-3p	44
Tabela 5. Resumo dos resultados dos C_T 's e ΔC_T 's obtidos na primeira quantificação relativa realizada por PCR em tempo-real. $\Delta C_T = C_T(\text{alvo}) - C_T(\text{referência}) = C_T(\text{miR-106a-5p ou miR185a-5p}) - C_T(\text{miR-103a-3p})$	45

Tabela 6. Cálculos efetuados com os valores de C_T obtidos na primeira quantificação relativa para estudo da eficiência da PCR em tempo-real.	
$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(PT.P) - \Delta C_T(A)$	46
Tabela 7. Resumo dos resultados dos C_T 's obtidos na segunda quantificação relativa realizada por PCR em tempo-real	48

RESUMO

O intervalo *post-mortem* (PMI) corresponde ao intervalo de tempo que decorre entre a morte de um indivíduo e a descoberta do respetivo cadáver.

A sua determinação tem sido foco de muitos estudos na área da medicina-legal, uma vez que é uma ferramenta crucial para a obtenção de informação acerca das circunstâncias da morte. Estas informações podem auxiliar na validação de *alibis* associados com o crime, bem como na sua resolução e, principalmente, permitem a distinção de uma morte recente de uma morte mais antiga.

Na prática habitual, o PMI é determinado através dos fenómenos cadavéricos que acompanham o processo da morte. No entanto, estas metodologias clássicas não facultam PMI's fiáveis, uma vez que os parâmetros observados não se alteram de forma linear e constante em PMI's longos.

Uma determinação mais fiável do PMI deverá recorrer a parâmetros que sofram alteração contínua no decorrer do *post-mortem*, que envolvam metodologias de quantificação simples e económica. A degradação dos ácidos nucleicos, que ocorre após a morte, parece possuir esta característica.

Os micro-RNA's (miRNA's) poderão constituir os ácidos nucleicos de importante relevância em diversos estudos forenses, uma vez que permanecem estáveis em condições adversas, presentes na maioria dos casos onde haverá necessidade do seu estudo.

Quando ocorre a morte de um indivíduo, inicia-se um processo de desintegração celular, que promove a libertação dos miRNA's para o espaço extracelular. Estes vão sofrendo alterações no decurso do PMI, possíveis de observar pelo aumento ou diminuição da sua expressão.

Neste trabalho, efetuou-se a comparação entre dois métodos de quantificação, que utilizou dois *kits* comerciais diferentes, de forma a selecionar o método mais fiável e inovador para a determinação do PMI, recorrendo à quantificação de

miRNA's extraídos de manchas de sangue colhidas a cadáveres, o mais próximo possível da hora da morte e no momento da autópsia.

Neste estudo foram utilizadas manchas de sangue, uma vez que estas constituem a prática habitual de preservação de amostras forenses durante longos períodos de tempo. Os miRNA's foram extraídos destas manchas e, posteriormente, foram sujeitos a uma quantificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo-real.

Esta quantificação possibilitou a observação do comportamento de três miRNA's (miR-106a-5p, miR-144-5p e miR-185-5p), em dois momentos *post-mortem* distintos (imediatamente após a morte e no momento da autópsia médico-legal), usando uma amostra de 14 indivíduos (10 cadáveres e 4 indivíduos voluntários que constituem um grupo de controlo).

Os resultados obtidos não são suficientemente claros, mas parecem indicar que nenhum dos miRNA's estudados será útil para a estimativa do PMI. Embora sofram um decréscimo da sua expressão com o decurso do tempo *post-mortem*, este não é estatisticamente significativo.

No entanto, para que este estudo possa ser validado seria necessária a sua replicação num maior número de amostras. Idealmente deveria também ser estudada a influência do género e da idade neste decréscimo de expressão. A concentração de miRNA's presente nas amostras extraídas também deverá ser determinada, para que se possam adaptar os procedimentos de forma a obter melhores resultados.

Palavras-chave: micro-RNA; intervalo *post-mortem*; reação em cadeia da polimerase em tempo real; manchas de sangue; fenómenos cadavéricos.

ABSTRACT

Post-mortem interval (PMI) refers to the interval between the time when an individual's body was found and the time of death.

The PMI determination is a major focus of many studies in legal medicine, since it provides information about the circumstances of death. This information can help to validate *alibis* in criminal cases, as well as in its resolution, and allows to differentiate an ancient death from a modern death.

Currently, PMI is determined through the visual observation of cadaverous phenomenon that follows the death process. However, all methods commonly in use are some degree unreliable and inaccurate, since they do not change constantly and linearly, specially concerning in long PMI's.

A more reliable determination of PMI requires parameters that present continuous change in this interval, and, if possible, involving methodologies with simple and inexpensive quantification. The post-mortem degradation of nucleic acids fits well in this definition.

Micro-RNA's (miRNA's) will be the nucleic acids with major relevance in future forensic studies, since they remain stable in adverse conditions present in most of the studied cases when is necessary.

When death occurs, a cellular disintegration process begins, which promotes the release of miRNA's into the extracellular space. These undergo changes during PMI, which may be observed by the increase or decrease in their expression.

In this work, a comparison was made between two methods, in order to select the most reliable and innovative method for PMI determination, using quantification of miRNA's extracted from bloodstains collected from corpses, immediately after death and during the medico-legal autopsy.

Bloodstains were used, since this is the usual method of preserving forensic samples for long periods. miRNA's were extracted from these stains and

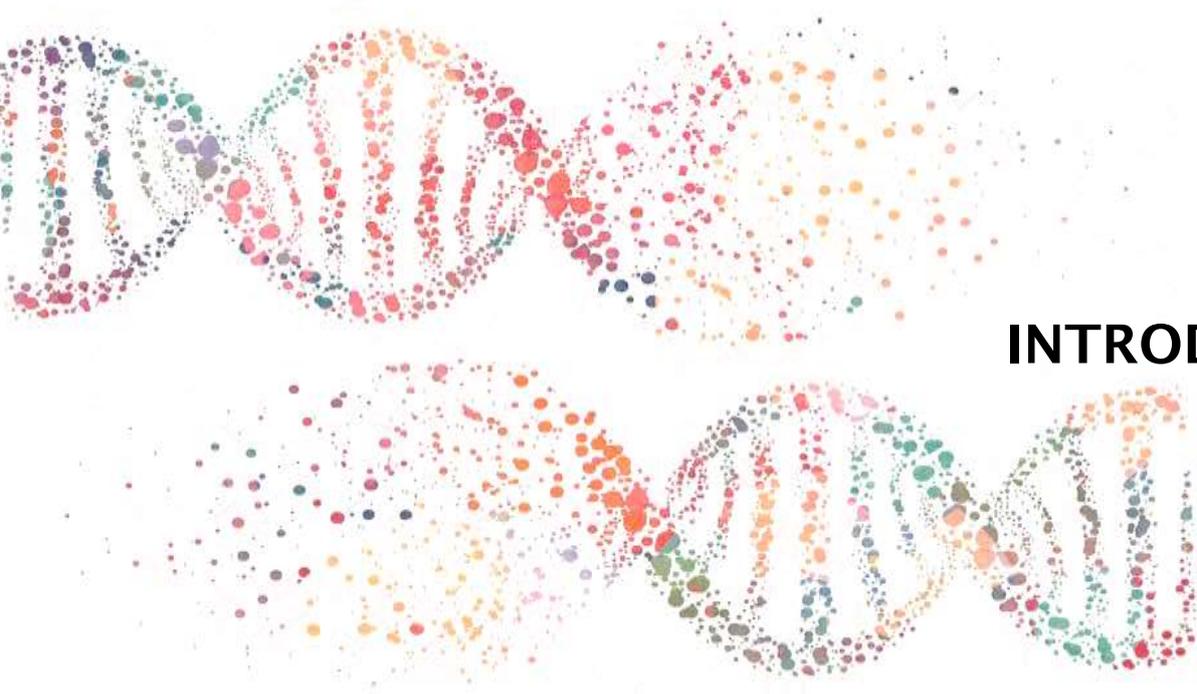
subsequently quantified using a relative quantification method, by real-time polymerase-chain-reaction (qPCR).

This relative quantification allows the observation of behavior of three miRNA's (miR-106a-5p, miR-144-5p e miR-185-5p) expression in two distinct moments after death (immediately after death and at the time of the medico-legal autopsy), in a sample of 14 individuals (10 corpses and 4 volunteers as a control group).

The obtained results are not very clear but allow to believe that none of the studied miRNA's will be useful for the estimation of PMI, because they suffer a non-statistical significant decrease in its expression during the post-mortem process.

However, for the validation of this study, replication in a larger number of samples will be required. The influence of age and gender in this process should also be investigated. The determination of the miRNA's concentration present in extracted samples is also useful in order to adapt all the procedures and get better results.

Keywords: micro-RNA; *post-mortem* interval; real-time polymerase-chain-reaction; bloodstains; cadaverous phenomena.



INTRODUÇÃO

1.1 ESTIMATIVA DO INTERVALO *POST-MORTEM*

O intervalo *post-mortem* (PMI) corresponde ao intervalo de tempo que decorre entre a morte de um indivíduo e a descoberta do respectivo cadáver. No seu decurso, ocorre a alteração da estrutura e da composição do corpo humano devido à paragem da circulação, à alteração nas reações enzimáticas, à degradação celular e à cessação da produção anabólica de metabolitos [1], [2].

O seu estudo é bastante relevante para as ciências forenses, na medida em que possibilita a obtenção de informação acerca das circunstâncias da morte e pode auxiliar na validação de *alibis* em situações de crime, bem como na sua resolução. Além disso, pode fornecer informação crucial para a distinção de uma morte recente de uma morte mais antiga e fornecer também dados úteis para a identificação da vítima ou do suspeito, na medida em que permite a confirmação de testemunhos colhidos [3], [4]. No entanto, a sua determinação é bastante complexa, uma vez que as alterações que ocorrem no cadáver são condicionadas quer por fatores intrínsecos, como a idade e o género, quer por fatores extrínsecos, como a temperatura e a humidade [5], [6].

Atualmente, os métodos utilizados pelos patologistas forenses para estimar o PMI baseiam-se na observação de fenómenos cadavéricos que acompanham a morte, nomeadamente: fenómenos físicos, físico-químicos, bioquímicos, entomológicos e botânicos [6], [7]. No entanto, os resultados obtidos com a sua utilização nem sempre são fiáveis, pois estes parâmetros não se alteram de forma linear e constante nos casos que envolvem PMI's longos [8]. Apenas se conseguem obter intervalos precisos em mortes que ocorreram de forma natural e nas quais o cadáver é encontrado imediatamente após a morte. Ou seja, quanto maior o PMI, menos precisão há na sua estimativa [9].

Por essa razão, têm sido desenvolvidos novos métodos como a citometria de fluxo e a eletroforese capilar que permitem estudar alguns marcadores que sofrem alterações *post-mortem* e, conseqüentemente, determinar há quanto tempo ocorreu a morte. Não obstante, estes métodos, por si só, não conferem uma maior precisão na referida determinação [6].

Um método eficaz para a determinação do PMI terá de recorrer a parâmetros que sofram alteração contínua após a morte. A degradação dos ácidos nucleicos, como o mRNA que, segundo alguns autores, ocorre no *post-mortem*, parece possuir esta característica e a sua análise constituirá um papel fundamental nas ciências forenses [10]. Pela mesma ordem de ideias, o estudo da expressão de miRNA's também será promissor.

1.1.1 MÉTODOS CLÁSSICOS

Na prática habitual, os patologistas forenses recorrem ao estudo de processos físicos (livor e algor *mortis*), físico-químicos (rigor *mortis*), tanatoquímicos (humor vítreo, fluídos sinovial e cérebrospinal, alterações oftalmológicas, alterações hematológicas e atividade enzimática), microbiológicos (decomposição), entomológicos e botânicos, para determinar o PMI.

1.1.1.1 PROCESSOS FÍSICOS

O **livor *mortis* ou hipóstase** inicia-se 1 hora após a morte, atingindo o seu máximo após 3 a 4 horas. A sua fixação dá-se entre 9 a 12 horas *post-mortem* [10]. Caracteriza-se pela coloração vermelho-arroxeadas que surge nas zonas onde há acumulação de sangue, devido à cessação da circulação sanguínea e à ação da força da gravidade (figura 1) [11]. Durante as 12 horas decorrentes da morte os livores podem-se deslocar com a pressão do polegar na pele ou com a movimentação do cadáver para uma posição diferente daquela em que se encontrava aquando a ocorrência da morte. Após a fixação dos livores, estes não podem ser alterados por qualquer ação externa [10].

Este não se trata de um método muito preciso para a estimativa do PMI, já que a coloração da lividez pode ser alterada por diversos fatores, entre os quais a idade e o sexo do cadáver, a posição em que este se encontra, as condições ambientais a que esteve exposto e, ainda, a diminuição da quantidade de sangue no corpo pela ocorrência de hemorragias. Por exemplo, quando o corpo está exposto a ambientes frios, os livores adquirem uma cor vermelho-cereja devido ao aumento na concentração de hemoglobina oxigenada [12], [13].



Figura 1. Livor *mortis* num cadáver na posição de supino. Há acumulação de sangue nas zonas inferiores do corpo, que estão em contato com a superfície. Adaptado de [11].

O **algor *mortis*** ocorre 8 a 12 horas após a morte, à superfície da pele, e quando o clima é temperado. Caracteriza-se pela redução da temperatura do cadáver, até atingir os valores do meio envolvente, com base na lei do arrefecimento de Newton – “a taxa de diminuição da temperatura de um corpo é proporcional à diferença de temperaturas entre o corpo e o meio envolvente” [12]. Existem variados fatores que intervêm no arrefecimento do corpo e que facilmente influenciam a taxa a que o mesmo ocorre, sendo o principal fator o tamanho do cadáver (quanto mais pequeno este é, mais rapidamente a sua temperatura atinge os valores da temperatura ambiente) [11].

Este método constitui também um método muito limitado de determinação do PMI, uma vez que a temperatura varia de acordo com vários fatores, entre os quais: o local onde é efetuada a sua medida (podendo ser oral, retal, do cérebro ou do fígado), a altura do dia, a temperatura do meio ambiente, a causa de morte e,

também, fatores individuais [14]. A taxa de arrefecimento é calculada através da fórmula: **PMI (em horas)** = $\frac{98.6 \times \text{Temperatura do corpo (em } ^\circ\text{F)}}{1.5}$ [10].

1.1.1.2 PROCESSOS FÍSICO-QUÍMICOS

O **rigor mortis** ou **rigidez cadavérica** surge de 2 a 3 horas após a morte, estabelecendo-se totalmente 8 a 12 horas *post-mortem*. Este processo permanece visível durante 36 horas, desaparecendo decorridos 2 a 3 dias. Corresponde ao endurecimento dos músculos do corpo, devido ao desaparecimento da adenosina trifosfato (ATP), que é crucial para a contração muscular. Inicia-se nos músculos da face e do pescoço e, de seguida, afeta os do tronco, membros superiores e membros inferiores [14], [15]. Enquanto este processo acontece é impossível mover o cadáver, sendo que este só volta a ficar flexível quando ocorre o relaxamento dos músculos (figura 2) [11].



Figura 2. Rigor *mortis* – a posição que o cadáver apresenta corresponde àquela em que se encontrava aquando a morte. Acedido a: 22 de maio de 2017, em: <https://plus.google.com/+RubenMartin11955781/posts/5jVWSnHHHhe>

Tal como os anteriores, trata-se de um método que não nos fornece estimativas precisas do PMI, visto que os seus resultados são influenciados pela temperatura e pela situação metabólica do indivíduo [11]. O seu estudo é fundamental para se determinar se o local onde o cadáver foi encontrado corresponde ao local da morte,

pois o endurecimento do corpo ocorre imediatamente e, sendo assim, se este for movido, a posição do cadáver não será compatível com o cenário [15].

1.1.1.3 PROCESSOS TANATOQUÍMICOS

As **alterações oftalmológicas** observam-se 10 a 12 horas após a morte. Neste período, a parte exposta da córnea seca e adquire uma coloração escura, denominada de “*tache noire*” (figura 3) [11]. A córnea torna-se opaca decorridas 2 horas e vai adquirindo maior opacidade com o decorrer do PMI. Este método só apresenta alguma utilidade nos cadáveres que apresentam os olhos abertos, pois quando estes estão fechados a córnea fica turva mais rapidamente. Os resultados fornecidos não são precisos, já que estas alterações são influenciadas pela temperatura, idade, género, entre outros fatores [16].

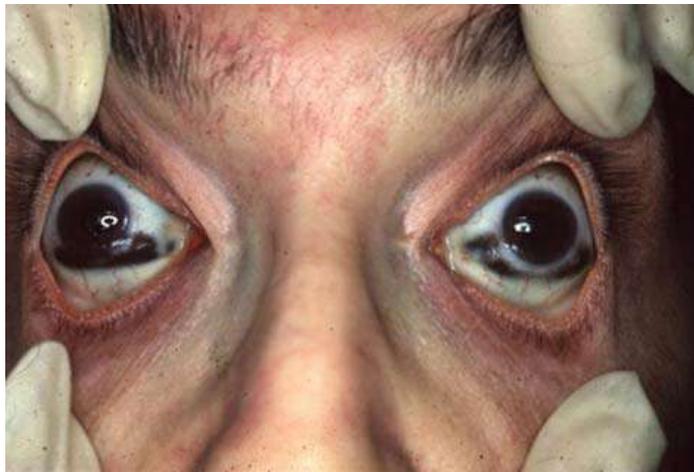


Figura 3. Coloração escura na esclerótica dos olhos de um cadáver, que surge devido à secagem que ocorre após a morte. Adaptado de [11].

O **humor vítreo** é a substância gelatinosa e transparente que preenche a câmara posterior dos olhos, localizada entre o cristalino e a retina. Tem uma função mecânica, sendo responsável por manter a retina no lugar e pela manutenção da forma e tónus do globo ocular [17]. É um fluído bastante utilizado em estudos bioquímicos *post-mortem* pois, devido à sua localização anatômica, é de fácil colheita e, também, por ser bastante resistente à contaminação bacteriana e à

putrefação. O seu conteúdo em potássio vai aumentando com o tempo que decorre após a morte. No entanto, a sua monitorização não nos permite obter resultados fiáveis e precisos para o cálculo do PMI [18].

Da mesma forma, os **fluidos sinovial e cerebrospinal**, embora sendo de fácil obtenção, visto que se localizam em espaços confinados, como as articulações e o cérebro (respetivamente), também não permitem a obtenção de um PMI muito exato, visto que algumas proteínas que o compõem não se alteram após a morte [19].

As **alterações hematológicas** permitem estimar o tempo que decorre da morte, uma vez que os glóbulos brancos presentes no sangue sofrem alterações degenerativas facilmente observáveis – nos glóbulos brancos corados com técnicas padrão estas alterações surgem cerca de 6 horas após a morte; por sua vez, nos linfócitos estas surgem decorridas 24 horas da morte [20]. No entanto, as amostras de sangue colhidas no cadáver são difíceis de avaliar, já que ocorre a perda da integridade celular e, em simultâneo, o transporte transmembranar, dependente de energia e responsável pela redistribuição de eletrólitos e produtos químicos, é interrompido [21]. Esta metodologia também é influenciada por fatores externos e, por esta razão, também não possibilita a obtenção de um PMI preciso [22].

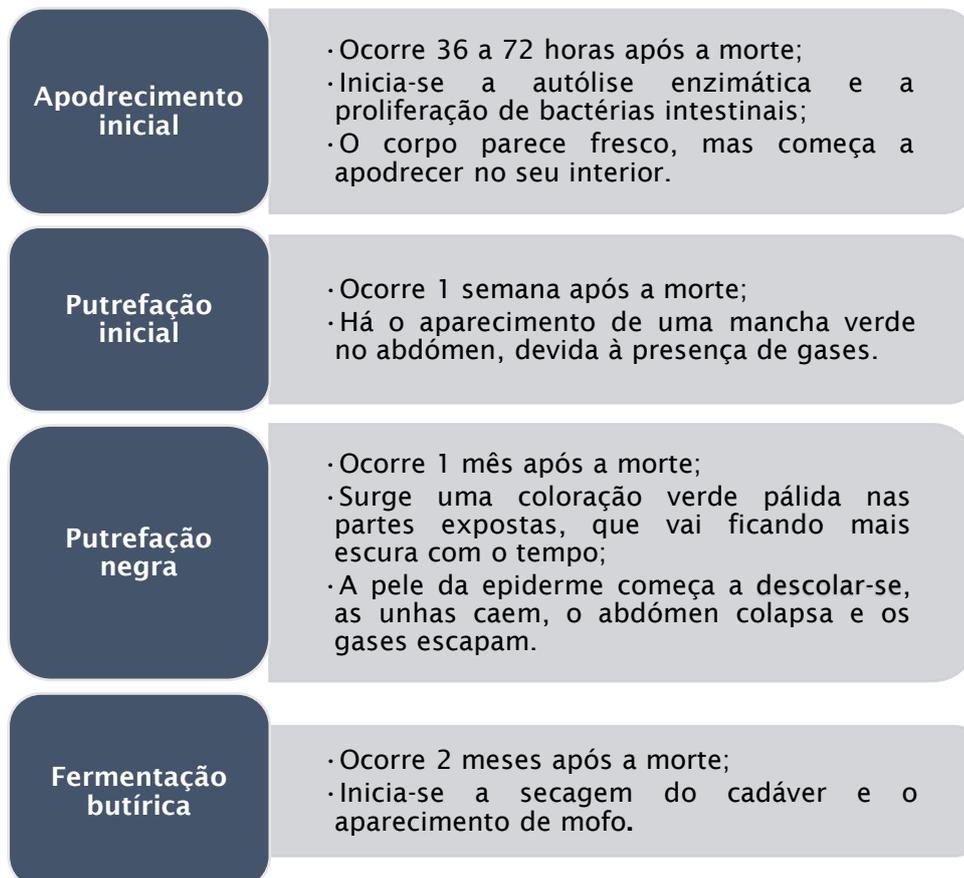
Por outro lado, a **atividade enzimática** da citocromo-c oxidase (ou COX), no coração humano, e das lactato- e malato-desidrogenase (LDH e MDH, respetivamente), no fígado humano, possibilitam a estimativa do PMI. A COX é uma enzima-chave da cadeia respiratória que ocorre nas mitocôndrias dos mamíferos, crucial na geração de ATP, e que sofre um decréscimo gradual da sua atividade com o avançar do intervalo *post-mortem*; no entanto, esta diminuição não está estatisticamente relacionada com o PMI, visto que é influenciada por diversos fatores. As enzimas LDH e MDH são mais úteis para longos PMI's; no entanto, a avaliação da sua atividade também não permite obter resultados precisos [23].

1.1.1.4 PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS

A **decomposição** baseia-se em dois mecanismos: a autólise e a putrefação. A autólise diz respeito à destruição das células, por parte das enzimas presentes no seu interior. Por sua vez, a putrefação ocorre devido à destruição dos tecidos moles do cadáver, por parte de bactérias, fungos e outros microrganismos; as bactérias do trato gastrointestinal percorrem o corpo através dos vasos sanguíneos e do sistema linfático, degradando o material orgânico complexo em fluídos e gases mais simples, que se vão tornando evidentes em determinadas zonas do corpo [24].

Este processo ocorre em 5 momentos distintos durante o PMI (esquema 1 e figura 4) e depende do método e intervalo de tempo no qual ocorre a inumação, das características específicas do cadáver (como peso, género e idade) e das condições do local onde este se encontra sepultado (por exemplo, do tipo de solo e do pH do mesmo) [25], [26].

Esquema 1. Momentos de decomposição que ocorrem ao longo do PMI. Adaptado de [12].



Secagem e esqueletização

- Ocorre meses a anos após a morte;
- Há o progressivo desaparecimento de tecidos moles.



Figura 4. Cadáveres em diferentes momentos da decomposição. Acedido em: 23 de maio de 2017, em: http://www.malthus.com.br/mq_imagem_mapa.asp#setmenu

1.1.1.5 PROCESSOS ENTOMOLÓGICOS

A **entomologia forense** constitui o método mais sólido para se estimar o PMI de cadáveres que já se encontram em putrefação, oferecendo resultados fiáveis para a determinação de PMI's até 72 horas [27]. Neste método, fiável e de fácil aplicação, procede-se ao cálculo da fase de desenvolvimento de insetos e, especialmente, de espécies necrófagas que se alimentam do cadáver e, deste modo, fazer a estimativa dos PMI's, com intervalos de variação de 1 dia a várias semanas. Imediatamente após a morte, os insetos são atraídos pelos gases e odores libertados pelo cadáver, sendo as moscas os primeiros insetos colonizadores. No entanto, dentro dos insetos que podem ser estudados, os necrófagos são os mais importantes para a estimativa do PMI, pois reproduzem-se e completam o seu ciclo de vida exclusivamente neste ambiente. A família *Calliphoridae*, mais conhecida por mosca-varejeira, tem sido a mais utilizada em investigações forenses, uma vez que apresenta boa dispersão, adapta-se facilmente e é predadora de larvas de outras moscas [28], [29].

1.1.1.6 EVIDÊNCIAS BOTÂNICAS

A **botânica** é útil quando os cadáveres se encontram em avançado estado de decomposição ou completamente esqueletizados, permitindo apenas obter resultados com um limite mínimo de PMI ou determinar o ano da morte. Recorre-se ao seu estudo quando os cadáveres são encontrados em áreas ricas em vegetação, nas quais estes se integram lenta e, por vezes, completamente no meio ambiente que os rodeia. Nestas circunstâncias, as plantas estão permanentemente ligadas a um substrato e demonstram alterações de crescimento associadas com os restos mortais. No entanto, o seu estudo não permite a determinação exata do PMI, pois não é possível determinar com precisão o início da colonização das mesmas [30], [31].

1.1.2 NOVAS METODOLOGIAS

1.1.2.1 ÁCIDOS NUCLEICOS

O **ácido desoxirribonucleico (DNA)** tem sido relatado como um método promissor para uma estimativa mais precisa e fiável do PMI. Tal como outros componentes de origem biológica, o DNA degrada-se química e fisiologicamente com o fenómeno da putrefação. Contrariamente aos métodos clássicos, esta degradação pode ocorrer de forma linear e constante no decurso do PMI, sendo esta uma condição ideal para se obter intervalos exatos [6], [8]. A autólise do DNA inicia-se imediatamente após a morte e prolonga-se por 72 horas, sendo afetada por fatores externos, como a temperatura ambiente – daí a que o estudo do DNA apenas forneça resultados fidedignos quando estamos perante PMI's curtos, ou seja, até 72 horas [32].

Da mesma forma, o **ácido ribonucleico (RNA)** também apresenta um elevado grau de degradação, sendo afetado por diversos fatores físicos e químicos que

ocorrem aquando a morte e no decurso desta, podendo fornecer resultados falso-negativos [8], [33]. O seu estudo é mais complexo que o do DNA, já que apresenta apenas uma cadeia única, facto este que o torna mais instável [34]. Em diversos estudos descritos na literatura, esta degradação foi avaliada através da análise do decaimento do RNA mensageiro (mRNA), com o objetivo de se estimar o PMI [33].

Atualmente, têm-se realizado estudos que se centram no potencial do miRNA para efetuar a mesma estimativa, uma vez que, pelo seu curto tamanho (entre 18 a 24 nucleótidos (nt)), este não é tão suscetível à degradação que acompanha o processo da morte. Consequentemente, o miRNA pode ser extraído com boa qualidade e em quantidade suficiente a partir de tecidos colhidos de cadáveres sujeitos a autópsia médico-legal [33], [35]. A integridade do RNA é influenciada por vários fatores, entre eles: a idade do indivíduo aquando a morte, o género, a desidratação, a hipoxia e o abuso de álcool e/ou drogas [33].

O estudo dos níveis de expressão génica em determinados intervalos de tempo após a morte possibilitará complementar os métodos que se utilizam atualmente para a determinação das causas e circunstâncias da morte e, adicionalmente, poderá fornecer alguma informação sobre o estado patológico dos indivíduos estudados [33].

Por essa razão, propõe-se o estudo da relação entre a expressão dos miRNA's extraídos de manchas de sangue colhidas a cadáveres e o PMI.

1.2 POTENCIAL DO MICRO-RNA NAS CIÊNCIAS FORENSES

O **miRNA** é uma dupla cadeia de RNA endógena, não codificante e composta por cerca de 18 a 24 nt. Este regula a expressão génica, tanto a nível da transcrição como da tradução. Nos humanos, regula aproximadamente 20 a 30% dos genes e está envolvido num elevado número de processos biológicos (como a hematopoiese, a morte e a proliferação celular) [35]-[39].

A sua síntese e processamento ocorrem no núcleo e no citoplasma (figura 5). Inicialmente, no núcleo, ocorre a transcrição do miRNA primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II; este pri-miRNA é posteriormente clivado pelo complexo Drosha/DGCR8, dando origem ao precursor de miRNA (pre-miRNA) que, posteriormente, é exportado para o citoplasma pela proteína exportina-5 (XPO5). No citoplasma irá sofrer uma clivagem pela enzima RNase Dicer; esta clivagem dá origem ao *duplex* de RNA, composto por duas cadeias, miRNA maduro (cadeia guia) e miRNA*. Por último, o miRNA maduro é incorporado no complexo RISC, silenciando genes alvo, a nível pós-transcricional, tanto através da clivagem de mRNA como através da inibição da tradução; por sua vez, o miRNA* é degradado. O silenciamento de genes é efetuado com base na complementaridade do miRNA com a sequência alvo [40], [41].

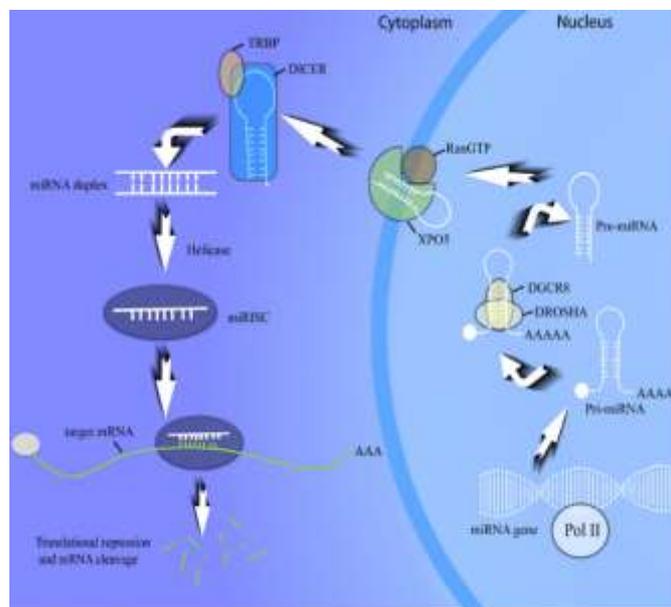


Figura 5. Biogénese de miRNA's - esta ocorre no núcleo e no citoplasma. Adaptado de [64].

Devido ao seu curto tamanho, este ácido nucleico é bastante estável e, conseqüentemente, não está tão sujeito à degradação *post-mortem* que afeta os fluídos biológicos com interesse forense - característica que o torna tão importante para vários estudos realizados na área da medicina legal e ciências forenses [39], [42].

Na sua grande maioria, os miRNA's encontram-se no interior das células; no entanto, ao contrário do que se pensava, estes também se encontram em circulação (como, por exemplo, em vários fluídos biológicos) onde a sua elevada expressão pode estar associada com diferentes tipos de cancro e outras patologias como a

diabetes e também pode estar relacionada com danos em vários órgãos [43]–[45]. Os miRNA's em circulação encontram-se protegidos no interior de microvesículas, também denominadas de exosomas [46].

Atualmente, o estudo de miRNA's tem sido aplicado nas ciências forenses, fundamentalmente com a finalidade de identificação de fluídos biológicos. Outras aplicações incluem a determinação da causa de morte através da detecção de determinadas patologias e a determinação da antiguidade das amostras, por monitorização das alterações na expressão de determinados genes. No entanto, devido às suas características, este estudo poderá também ser aplicado na determinação do PMI, através da quantificação da degradação do miRNA [6], [47], [48].

O estudo de miRNA's também tem sido muito relevante noutras áreas da medicina, permitindo o diagnóstico, prognóstico e a terapêutica de várias patologias – por exemplo, através do estudo dos miRNA's consegue-se detetar casos de infertilidade, a presença de casos de patologia cancerígena e de várias doenças infecciosas [37], [49], [50].

Os miRNA's são biomarcadores considerados ideais para estudos na área da medicina legal, uma vez que são estáveis em vários fluídos biológicos, apresentam sequências conservadas para as diferentes espécies, têm expressão específica associada a diferentes tecidos e a diferentes estádios de desenvolvimento biológicos. Acresce dizer que a sua expressão pode ser quantificada através de várias metodologias, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo-real, que é um método sensível, fiável, específico e robusto [43], [45].

1.2.1 OS MICRO-RNA'S NA DIFERENCIAÇÃO DE FLUÍDOS BIOLÓGICOS COM INTERESSE FORENSE

A determinação do tipo e origem dos fluídos biológicos encontrados nos locais de crime é essencial para as ciências forenses, uma vez que permite a obtenção de

informação que pode ser útil na resolução do crime, por estabelecimento do perfil genético das amostras encontradas no local. Este perfil é exclusivo de determinado indivíduo (exceto nos gêmeos homozigóticos) sendo, por essa razão, a ferramenta essencial para a reconstrução do crime [39].

Existem alguns fluídos biológicos estudados recorrentemente nas investigações forenses, como é o caso do sangue, da saliva, do sêmen, das secreções vaginais, entre outros [48]. Estes fluídos, que nem sempre são de fácil distinção à vista desarmada, podem ser identificados de forma mais fiável através do estudo da expressão de vários miRNA's, uma vez que estes apresentam níveis de expressão diferentes para cada fluído biológico (tal como descrito na tabela 1). [9], [51]-[56].

Tabela 1. miRNA's (ou miR's) específicos para os fluídos biológicos mais importantes para as ciências forenses. Adaptado de: [9], [51]-[56].

Fluídos biológicos	miRNA's expressos
<u>Sangue</u>	miR-142-5p, miR-219 [9] miR-16, miR-16-5p, miR-20a, miR-106a , miR-126-5p, miR-144-3p, miR-185 , miR-451, miR-451a, miR-486-5p [51] miR-144 [52] miR-126, miR-150 [53] miR-190a-5p, miR-454-3p [54] miR-103a-3p , miR-142-3p, miR-200a-3p, miR-301a-miR-26a-5p, miR-144-5p , miR-374-5p [55] 3p, miR-502-3p [56]
<u>Saliva</u>	miR-200c-3p, miR-203a-3p, miR-205, miR-205-5p, miR-223-3p, miR-658 [51] miR-208b, miR-583 [52] miR-200c, miR-203 [53] miR-935, miR-3168 [54]
<u>Sêmen</u>	miR-10a, miR-10b, miR-135a, miR-135b, miR-507, miR-943 [51] miR-135a-5p, miR-888-5p [54]
<u>Secreções vaginais</u>	miR-124a, miR-372 [51] miR-617, miR-891a [52] miR-31-3p, miR-3134 [54]

1.2.2. OS MICRO-RNA'S NA DETERMINAÇÃO DA CAUSA DE MORTE

Os miRNA's têm sido utilizados como biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica de várias patologias, entre elas as doenças infecciosas. Estes vão sofrendo alterações nos seus níveis de expressão à medida que há a evolução das patologias, pelo que podem auxiliar na identificação da causa de morte de um determinado cadáver [37].

Por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode ser identificado pela presença de miR-150 e de miR-146b-5p; por sua vez, os miR-208 e miR-499 encontram-se associados ao enfarte agudo do miocárdio [37], [40].

1.2.3 OS MICRO-RNA'S NA ESTIMATIVA DO INTERVALO *POST-MORTEM*

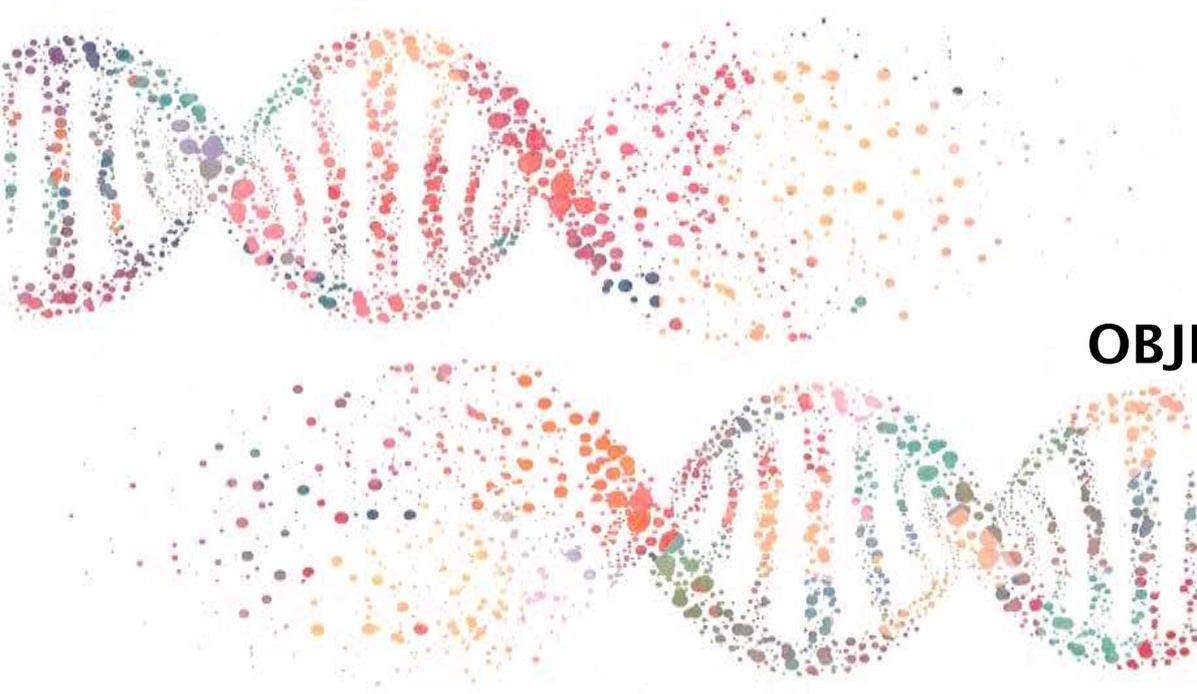
A determinação do PMI é um dos desafios com maior relevância na prática forense. Conforme referido anteriormente, esta determinação é essencial para a resolução de muitos casos criminais que originam cadáveres e, também, para a identificação de vítimas e/ou suspeitos, aceitação ou rejeição de *alibis*. Esta é uma via para auxiliar na distribuição de bens delegados em testamentos, nos atestados de óbito e no tempo decorrido da morte do indivíduo [4], [57]. No entanto, os resultados obtidos não são precisos nem fiáveis, visto que todos os métodos utilizados para esta determinação são suscetíveis à ação de fenómenos externos [6].

Uma estimativa ideal do PMI recorre ao uso de parâmetros que sofram uma alteração linear e constante após a morte, que envolvam metodologias de quantificação simples e económica. O miRNA assenta nestes princípios. Este permanece estável nos fluídos biológicos secos e pode ser colhido em quantidade e qualidade suficientes para análise, mesmo em condições adversas, como sejam as variações de pH, condições de armazenamento prolongado e múltiplos ciclos de congelação e descongelação [6], [35], [45], [48], [58], [59].

Quando ocorre a morte de um indivíduo, inicia-se um processo de desintegração celular e, com este, a libertação de miRNA's das microvesículas para o espaço extracelular [46].

No decorrer do *post-mortem*, os miRNA's vão sofrendo modificações que é possível observar pelo aumento ou diminuição da sua expressão. As alterações nos perfis de expressão dos miRNA's afetam as interações entre estes e destes com os seus alvos [37], [60]–[62].

A quantificação de miRNA's permite também a diferenciação de mortes diurnas de mortes noturnas, uma vez que existem miRNA's sensíveis aos ritmos circadianos. Por exemplo, o miR-142-5p e o miR-219 apresentam níveis de expressão diferentes no sangue entre indivíduos que morreram durante o dia e indivíduos que morreram durante a noite [9].



OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Com este trabalho pretende-se desenvolver um método mais preciso e fiável para a determinação de PMI's, procedendo à extração de miRNA's e estudando a sua expressão no decorrer deste intervalo de tempo, a partir de manchas de sangue colhidas a cadáveres, em dois tempos diferentes, imediatamente após a morte e no momento da autópsia Médico-Legal.

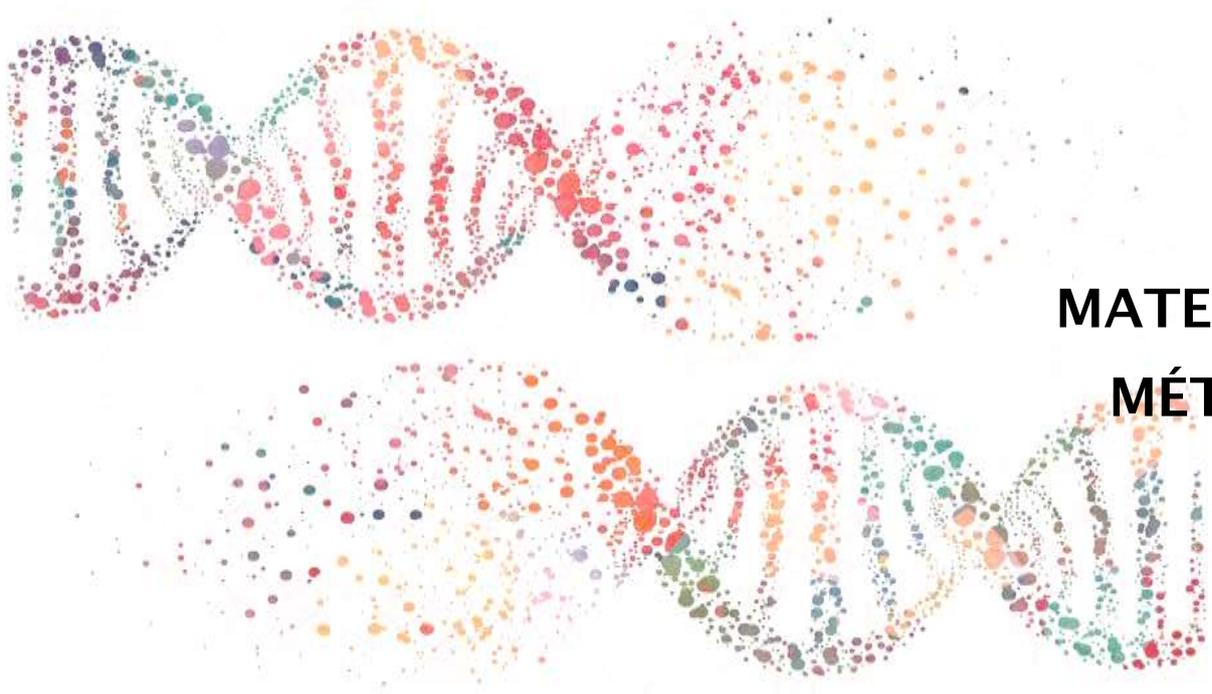
Este estudo foi realizado em duas fases distintas, em cada uma das quais se utilizaram *kits* diferentes, de forma a possibilitar a seleção do *kit* mais eficiente, por comparação entre as duas fases.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumprir o objetivo principal deste trabalho, após revisão sistemática da literatura relativa ao estudo de miRNA's na medicina legal e a sua relação com a determinação do PMI, procedeu-se a:

- Seleção de três miRNA's referidos na literatura e descritos como sendo expressos no fluído biológico sangue – miR-106a-5p, miR-185-5p e miR-144-5p, a fim de monitorizar a sua expressão em dois tempos após a morte.
- Verificar se é possível a extração do miRNA a partir de dois grupos de manchas de sangue:
 - A partir de amostras colhidas a cadáveres (imediatamente após a morte e no momento da autópsia médico-legal), pelo serviço de patologia forense;
 - A partir de amostras colhidas a um grupo controlo de indivíduos saudáveis, voluntários, por picada no dedo indicador direito, com lanceta, no serviço de genética e biologia forenses, após consentimento informado (de acordo com o formulário no anexo II);

- Analisar a expressão de miR-106a-5p, de miR-185-5p e de miR-144-5p em cada amostra em estudo, através da quantificação por PCR em tempo-real, com a utilização do controlo endógeno miR-103a-3p utilizando dois *kits* distintos e utilizando o UniSp6 e o *Universal primer* como *spike-in's* num dos kits utilizados;
- Comparar os resultados obtidos nas várias quantificações utilizando os dois *kits*, para verificar qual deles cumpre o objetivo de forma mais eficaz;
- Concluir acerca da relação da expressão dos vários miRNA's com o PMI.



MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DE MICRO-RNA'S A ESTUDAR

Os miRNA's a estudar foram escolhidos após revisão bibliográfica, especialmente da área médico-legal e forense, e que descreve miRNA's como sendo expressos especificamente em fluídos biológicos (ver tabela 2). Destes selecionamos três miRNA's específicos do sangue: miR-106a-5p, miR-144-5p e miR-185-5p.

Esta seleção baseou-se sobretudo nos resultados obtidos em estudos que estabeleceram uma relação entre a expressão de diferentes miRNA's com a distinção entre diferentes fluídos biológicos.

Numa das fases deste trabalho foi também utilizado o miR-103a-3p como controlo endógeno e o UniSp6 e o *Universal primer* como *spike-in's*.

3.2 OBTENÇÃO DE MANCHAS DE SANGUE

As manchas de sangue utilizadas neste estudo foram divididas em dois grupos: manchas de estudo e manchas-referência (tabelas 2 e 3; com registos fotográficos no anexo I), correspondendo, respetivamente, a manchas de sangue colhidas a cadáveres e a manchas de sangue colhidas a indivíduos saudáveis. Estes últimos constituem um grupo controlo, permitindo assim comparar a expressão dos miRNA's estudados. Após a colheita, todas as manchas foram armazenadas à temperatura ambiente.

Relativamente às manchas de estudo, estas foram recebidas no SGBF-N provenientes do Serviço de Patologia, integradas num projeto mais alargado, desenvolvido no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP (INMLCF, IP), denominado DipMor. Estas foram colhidas em cadáveres, de sexo masculino e feminino, autopsiados entre Maio e Julho de 2017. Todas as manchas

foram colhidas em cadáveres que deram entrada no instituto momentos após a morte (período que variou entre 1 a 11 horas), ou seja, que apresentam um PMI muito curto. Em todos eles foram colhidas duas manchas de sangue: na chegada do cadáver ao instituto e no momento da autópsia (que se realizou aproximadamente 24 horas após a entrada do cadáver).

Por sua vez, as manchas-referência foram colhidas a indivíduos voluntários, de sexo masculino e feminino, aparentemente saudáveis, após consentimento informado, através de punção com uma lanceta e registadas em cartões “*Human ID Bloodstain card*” da Whatman™, no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte do INMLCF, IP (SGBF-N). Estas manchas serviram de controlo, permitindo a verificação da existência ou não de diferenças na expressão dos miRNA’s seleccionados entre indivíduos saudáveis e cadáveres, como já foi referido.

Tabela 2. Registo das amostras pertencentes ao grupo problema – manchas de sangue colhidas a cadáveres (A: imediatamente após a morte; PT.P: no momento da autópsia médico-legal).

Referência da amostra	Identificação do dador	Data do óbito	Data da colheita
1 A	♀, 84 anos	10-05-2017 10:23 horas	10-05-2017 11:20 horas
1 PT-P			11-05-2017 11:00 horas
2 A	♂, 32 anos	15-05-2017 08:18 horas	15-05-2017 15:15 horas
2 PT-P			16-05-2017 14:00 horas
3 A	♀, 84 anos	01-06-2017 07:40 horas	01-06-2017 18:00 horas
3 PT-P			02-06-2017 09:30 horas
4 A	♂, 84 anos	11-07-2017 13:40 horas	11-07-2017 18:36 horas
4 PT-P			12-07-2017 09:30 horas
5 A	♂, 29 anos	12-07-2017 12:20 horas	12-07-2017 14:25 horas

5 PT-P			13-07-2017 12:00 horas
6 A	♂, 75 anos	12-07-2017 10:35 horas	12-07-2017 18:30 horas
6 PT-P			13-07-2017 09:30 horas
7 A	♂, 67 anos	14-07-2017 11:05 horas	14-07-2017 14:16 horas
7 PT-P			15-07-17 --
8 A	♂, 45 anos	17-07-2017 15:30 horas	17-07-2017 19:15 horas
8 PT-P			18-07-2017 --
9 A	♀, 19 anos	19-07-2017 04:55 horas	19-07-2017 09:45 horas
9 PT-P			19-07-2017 14:00 horas
10 A	♂, 24 anos	19-07-2017 04:55 horas	19-07-2017 09:30 horas
10 PT-P			19-07-2017 14:00 horas

Tabela 3. Registo das amostras pertencentes ao grupo de referência - manchas de sangue colhidas a indivíduos voluntários e saudáveis.

Referência da amostra	Identificação do dador	Data da colheita
11	♀, 23 anos	22/05/2017
12	♂, 23 anos	11/07/2017
13	♀, 50 anos	25/07/2017
14	♀, 88 anos	25/07/2017
15	♂, 52 anos	26/07/2017

Todas as amostras registadas nas tabelas anteriores foram utilizadas em todos os momentos deste estudo, com exceção das amostras 1 A e 1 PT.P. Estas foram excluídas da primeira fase do estudo, uma vez que as manchas eram muito mais ténues que as restantes (ver registo fotográfico no anexo I), o que poderá ser

sinónimo de pouca quantidade de material genético, incluindo de miRNA, provavelmente devido a problemas técnicos relacionados com a colheita.

Houve o cuidado de utilizar amostras provenientes de indivíduos de ambos os géneros. No entanto, a maioria das manchas obtidas pertenciam a cadáveres do género masculino.

3.3 FASE I – Utilização do kit “*miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*” (Exiqon)

3.3.1 EXTRAÇÃO DE MICRO-RNA'S

Para a extração dos miRNA's foi utilizado o kit “*mirPremier® microRNA Isolation*” da Sigma-Aldrich (referência SNC10), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante, referente à extração de pequenos RNA's em tecidos humanos (ver anexo III).

Este *kit* contém todos os reagentes necessários à extração dos miRNA's, com exceção do etanol 100% (EMSURE®).

Relativamente a equipamentos, foram utilizados: o vórtex “*press-to-mix 34524*”, da Snijders e a centrífuga “*Biofuge Pico*”, da Heraeus.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO MICRO-RNA

Para tentar determinar a concentração dos miRNA's obtidos após a primeira extração foi utilizado o *kit* "Qubit® RNA Assay", no Fluorímetro Qubit® e seguidos os procedimentos indicados pelo fabricante (ver anexo III).

Este *kit* contém todos os reagentes necessários à determinação da concentração do miRNA. Esta determinação permite avaliar a integridade do miRNA obtido em cada amostra sujeita à extração.

Relativamente a equipamentos, foram utilizados: o vórtex "*press-to-mix 34524*", da Snijders e o fluorímetro "*Qubit® 1.0*".

3.3.3 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR E QUANTIFICAÇÃO DOS MICRO-RNA'S POR PCR EM TEMPO-REAL

Para a primeira conversão do miRNA em DNA complementar (cDNA) recorre-se à utilização do *kit* "*miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*" (referência #203351, da Exiqon). Com este mesmo *kit* procedemos à quantificação relativa dos miRNA's em estudo por PCR em tempo-real. Foram seguidas as instruções do fabricante para ensaios individuais, descritas no protocolo A e com o reagente de amplificação SybrGreen® (ver anexo III).

Este *kit* possui todos os reagentes necessários à conversão em cDNA e à realização de PCR em tempo-real, incluindo os *primers* de miRNA essenciais ao estudo, nomeadamente: miR-106a-5p, miR-185-5p e os controlos UniSp6 (spike-in) e miR-103a-3p (controlo endógeno).

Relativamente a equipamentos, foram utilizados: o termociclador "*GeneAmp® PCR System 9700*" (Applied Biosystems); as centrífugas "*Centrifuge 5810*"

(Eppendorf) e “*Heraeus Pico 21 Centrifuge*” (Thermo Fisher Scientific); o vórtex “*Vortex-T Genie 2*” (Scientific Industries) e o equipamento de PCR “*7500 Real-Time PCR System*” (Applied Biosystems). A análise dos resultados foi efetuada utilizando o programa “*HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2*”.

Na PCR foi estudada a expressão ou a quantidade relativa de todos os miRNA's. Será realizada uma quantificação relativa (RQ), em que se procede a uma comparação de C_T 's, através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. O SYBR Green® é o fluoróforo utilizado neste *kit* e que emite fluorescência quando se intercala na sequência de cDNA, permitindo a visualização das curvas de amplificação.

3.4 FASE II – Utilização do *kit “miScript®II RT”* (Qiagen)

3.4.1 EXTRAÇÃO DE MICRO-RNA'S A PARTIR DAS MANCHAS DE SANGUE

Para a segunda fase de extração de miRNA's recorreu-se ao *kit “RNeasy® Micro Kit”* (referência 74004, da Qiagen). O procedimento foi adaptado a partir das recomendações do fabricante (ver anexo IV).

Este *kit* contém todos os reagentes necessários à extração dos miRNA's, com exceção do etanol 100% (EMSURE®). Este foi utilizado para a obtenção de etanol 70% e de etanol 80%, por diluição.

Relativamente a equipamentos, foram utilizados: o vórtex “*press-to-mix 34524*”, da Snijders e a centrífuga “*Biofuge Pico*”, da Heraeus.

Nesta fase foi efetuado um único processo de extração, no qual foram extraídas as amostras 1 a 10, A e PT.P, e as amostras 11 e 13 a 15.

3.4.2. CONVERSÃO EM DNA COMPLEMENTAR

A segunda conversão dos miRNA's em cDNA foi realizada com o *kit "miScript®II RT Kit"* (referência 218161, da Qiagen), de acordo com as indicações do fabricante (ver anexo IV).

O *kit* inclui todos os reagentes necessários à conversão dos miRNA's extraídos em cDNA's.

Relativamente a equipamentos, foram utilizados: o termociclador "*GeneAmp® PCR System 9700*" (Applied Biosystems); a centrífuga "*Heraeus Pico 21 Centrifuge*" (Thermo Fisher Scientific) e o vórtex "*Vortex-T Genie 2*" (Scientif Industries).

3.4.3. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR PCR EM TEMPO-REAL

A segunda quantificação por PCR em tempo-real foi realizada com o *kit "miScript SYBR® Green PCR"* (referência 218073, da Qiagen).

Nesta quantificação foram utilizados 2 *primers* de miRNA's, "*miScript Primer Assays*", específicos para o fluido biológico sangue e selecionadas a partir da literatura - miR-144 e miR-185 - e o corante SYBR Green®.

Foi seguido o procedimento indicado pelo fabricante (ver anexo IV), com duplicação do número de ciclos de PCR (executaram-se 80 ciclos, ao invés dos 40 indicados).

Nesta segunda fase foi realizada uma única quantificação por PCR em tempo-real, utilizando todas as amostras disponíveis, exceto a amostra 14.

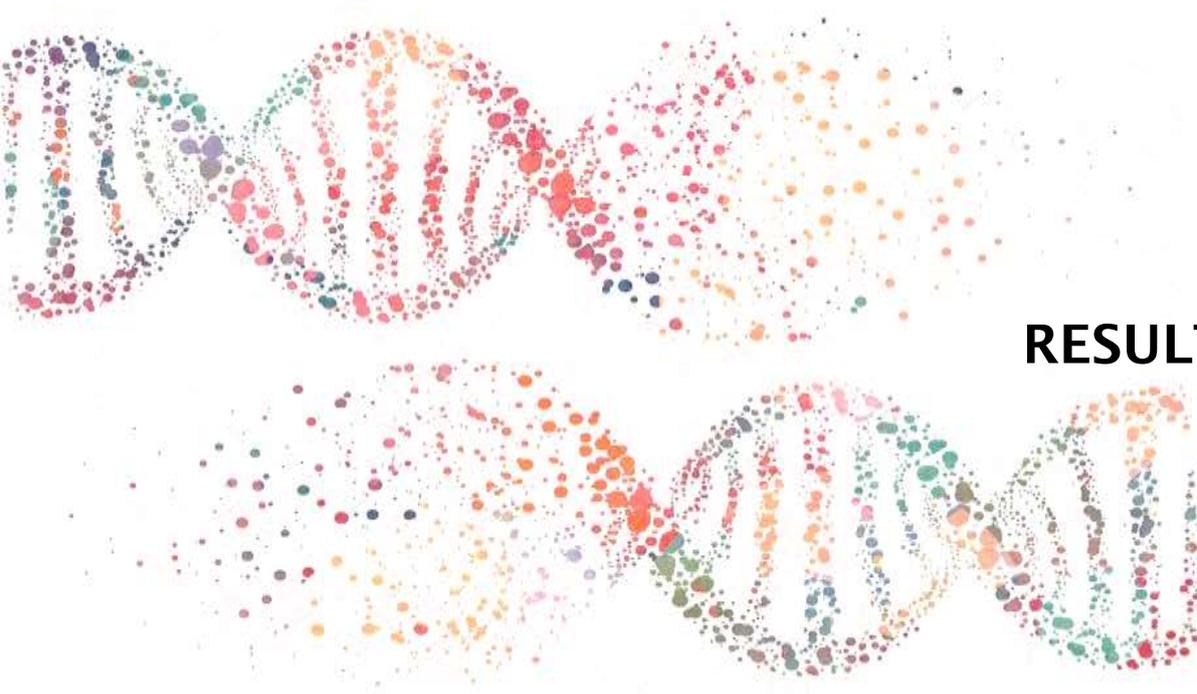
O *kit* é constituído por todos os reagentes necessários à realização de PCR em tempo-real, e pode incluir vários *primers* de miRNA à escolha; neste caso, incluiu os *primers* essenciais ao estudo da expressão do miR-144-5p e do miR-185-5p.

Foi utilizado o equipamento de PCR “7500 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) e a análise dos resultados foi efetuada utilizando o programa “*HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2*”.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a expressão relativa dos miRNA’s estudados, utilizou-se o chamado método de Livak [63], através do cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Este cálculo relaciona o aumento ou diminuição da expressão dos diferentes miRNAs estudados a partir dos C_T obtidos, no momento imediatamente após a morte (considerado o tempo zero) e no momento da autópsia médico-legal – quando os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ são superiores a 1 podemos concluir que houve aumento de expressão; por sua vez, quando o resultado é inferior a 1 podemos concluir que houve diminuição da mesma.

Os valores obtidos com o método de Livak foram analisados utilizando o *software* estatístico “*IBM® SPSS® Statistics 24*”, com execução de um teste *t-student*. O nível de confiança adotado foi de 95%, pelo que os resultados apenas apresentam significância estatística quando $p < 0.05$.



RESULTADOS

Este estudo foi executado em duas fases distintas, com recurso a diferentes *kits*. Em ambas as fases foram executados os mesmos procedimentos, com exceção da determinação da concentração de miRNA's, uma vez que esta não foi viável.

4.1. FASE I – Utilização do *kit* “*miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*” (Exiqon)

Em primeiro lugar, procedeu-se à extração de miRNA's a partir das manchas de sangue com o *kit* “*mirPremier® microRNA Isolation*” (Sigma-Aldrich). Tal como referido anteriormente, todas as amostras foram sujeitas a este procedimento, com exceção das amostras 1 A e 1 PT.P.

Como forma de verificar a integridade das amostras obtidas no procedimento anterior foi realizada a determinação da concentração de miRNA's extraídos das manchas de sangue. Foi utilizado o *kit* “*Qubit® RNA Assay*” e um fluorímetro “*Qubit 1.0*”, disponível no serviço. Não obtivemos sucesso, uma vez que o limite de deteção do aparelho não permitiu obter a concentração das amostras. Apenas foi possível determinar que estas apresentam concentrações inferiores a 20 ng/mL.

O passo seguinte, crucial para a resposta aos objetivos propostos neste estudo, consistiu na quantificação relativa dos miRNA's por PCR em tempo-real, segundo o protocolo fornecido pelo *kit* “*miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*”.

Num primeiro momento, efetuou-se a diluição do cDNA 80x em água livre de nucleases, tal como indicado no protocolo que acompanha o *kit*. No entanto, as curvas de quantificação obtidas não foram as esperadas. Uma possível explicação para esta observação terá sido devido à utilização do cDNA muito diluído. Este corresponderá a quantidades muito reduzidas de miRNA's, visto que este foi extraído a partir de manchas de sangue e não de tecidos com elevadas concentrações de material genético, como ocorre na prática habitual de estudos que envolvem este tipo de ácido nucleico.

Consequentemente, num segundo momento, efetuou-se uma adaptação ao protocolo, utilizando-se o cDNA mais concentrado. Assim, a quantificação relativa dos miRNA's foi processada recorrendo a uma diluição muito inferior do cDNA obtido com a utilização de 1.5 µL de cDNA e 2.5 µL de água livre de nucleases.

4.1.1. RESULTADOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR PCR EM TEMPO-REAL

Nas quantificações efetuadas procedeu-se ao estudo da expressão dos seguintes miRNA's: miR-103a-3p, miR-106a-5p e miR-185-5p, com o UniSp6 como controlo *spike-in*. O miR-103a-3p foi utilizado como gene referência.

As quantificações foram executadas em momentos distintos, de forma a ajustar as definições do aparelho à obtenção das curvas de amplificação pretendidas e respetivos valores de C_T (de acordo com o exemplo representado no anexo V). Estes são inversamente proporcionais à expressão dos genes – este fato permitirá o estudo da relação existente entre os miRNA's e o PMI, uma vez que as manchas utilizadas foram colhidas em diferentes intervalos de tempo após a morte.

Efetuuou-se o cálculo da média dos valores de C_T obtidos nas várias quantificações para cada uma das amostras. Também se procedeu ao cálculo do ΔC_T nas várias amostras, exceto nas do grupo de controlo, uma vez que estas apenas constituem um controlo positivo da amplificação. Os valores obtidos encontram-se registados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Valores de C_T obtidos na primeira quantificação relativa realizada por PCR em tempo-real para o gene de referência miR-103a-3p.

miR-103a-3p			
Amostras	Valor de C_T		
	A	PT. P	Controlo
2	Indeterminado	Indeterminado	---
3	12.5661	15.0500	

4	28.0449	19.5385	
5	20.8962	21.7555	
6	24.1000	46.9937	
11	---	---	Indeterminado
12	---	---	30.8566

Tabela 5. Resumo dos resultados dos C_T 's e ΔC_T 's obtidos na primeira quantificação relativa realizada por PCR em tempo-real. $\Delta C_T = C_T(\text{alvo}) - C_T(\text{referência}) = C_T(\text{miR-106a-5p ou miR185a-5p}) - C_T(\text{miR-103a-3p})$.

miR-106a-5p						
Amostras	Valor de C_T			ΔC_T		
	A	PT. P	Controlo	A	PT.P	Controlo
2	29.9227	29.0060	---	Indet.	Indet.	---
3	---	---		---	---	
4	26.0404	47.6854		-2.0045	28.1469	
5	29.7689	29.4059		8.8727	7.6504	
6	47.4592	48.8059		23.3592	1.8122	
11	---	---	28.9139			
12	---	---	41.8260			
miR-185a-5p						
Amostras	Valor de C_T			ΔC_T		
	A	PT. P	Controlo	A	PT.P	Controlo
2	43.8653	51.1797	---	Indet.	Indet.	---
3	21.4959	63.9117		8.9298	48.8617	
4	41.8537	46.6346		13.8088	27.0961	
5	36.4910	47.8112		15.5948	26.0557	
6	48.4110	38.5505		24.3110	-8.4432	
11	---	---	23.0625			
12	---	---	55.7851			

Por limitações quanto à quantidade de reagentes as seguintes amostras não foram quantificadas: amostras 7 a 10, A e PT. P, e amostras 13 a 15 (tabelas 2 e 3).

As curvas de amplificação para a amostra 3 com a sonda miR-106a-5p apresentaram erros, razão pela qual não foram consideradas para o estudo.

Analisando os valores de ΔC_T obtidos em A e em PT.P verifica-se que:

- ✓ O miR-106a-5p apresenta diminuição na sua expressão com o decurso do PMI, exceto nas amostras 5 e 6;
- ✓ Por sua vez, o miR-185-5p também apresenta diminuição da sua expressão com o decurso do PMI, exceto na amostra 6.

Os valores de C_T obtidos nas amostras do grupo de controlo (amostras 11 e 12) permitem confirmar que os miRNA's estudados sofrem alterações na sua expressão com o processo da morte.

Os ΔC_T 's de todas as amostras (exceto as do grupo de controlo e da amostra 3) foram comparados segundo a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, que constitui o método de Livak. Este método permite analisar a magnitude da variação da expressão dos miRNA's entre dois grupos.

Em primeiro lugar, procede-se ao cálculo das médias dos ΔC_T 's para cada miRNA em estudo; de seguida, calcula-se o valor de $\Delta\Delta C_T$, segundo a fórmula: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{PT.P}) - \Delta C_T(\text{A})$; e, por último, procede-se ao cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Estes cálculos encontram-se registados na tabela 6.

Tabela 6. Cálculos efetuados com os valores de C_T obtidos na primeira quantificação relativa para estudo da eficiência da PCR em tempo-real. $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{PT.P}) - \Delta C_T(\text{A})$.

miR-106a-5p		
Média de	A	10.0758
ΔC_T	PT.P	12.5365
$\Delta\Delta C_T$	2.4607	
$2^{-\Delta\Delta C_T}$	≈ 0.1817	
miR-185-5p		
Média de	A	15.6611
ΔC_T	PT.P	≈ 23.3926
$\Delta\Delta C_T$	7.7315	
$2^{-\Delta\Delta C_T}$	≈ 0.0047	

De acordo com o que está descrito no capítulo 3.5 em relação ao método de Livak, podemos concluir que na fase I deste trabalho ambos os miRNA's estudados

apresentaram diminuição da sua expressão com o PMI – o que está em concordância com as conclusões retiradas a partir da análise da variação dos valores de C_T .

Os resultados obtidos com este método foram sujeitos a uma análise estatística no programa “*IBM® SPSS Statistics 24*”, com execução de um teste de *t-student* (uma vez que seguem uma distribuição normal). A partir desta análise conclui-se que nem o decréscimo da expressão de miR-106a-5p nem o decréscimo da expressão de miR-185a-5p apresentam significância estatística nas amostras estudadas ($p = 0.0720 > 0.05$ e $p = 0.1750 > 0.05$, respetivamente – ver no anexo VI).

Sendo assim, embora a diminuição da expressão dos miRNA’s estudados na fase I não seja estatisticamente significativa com o decurso do PMI, com este estudo não é possível tirar conclusões definitivas sobre se esta diminuição da expressão poderá servir para determinar o PMI.

4.2. FASE II – Utilização do *kit “miScript®II RT” (Qiagen)*

Em segundo lugar, procedeu-se à extração de miRNA’s a partir das manchas de sangue com o *kit “RNeasy® Micro Kit”*. Tal como referido anteriormente, todas as amostras foram sujeitas a este procedimento, com exceção da amostra 12.

O passo seguinte consistiu na conversão dos miRNA’s extraídos das manchas em cDNA e, posteriormente, na quantificação relativa dos miRNA’s por PCR em tempo-real, segundo o protocolo fornecido pelo *kit “miScript SYBR® Green PCR”*.

Foi utilizada a mesma diluição do cDNA da fase I, 1.5 μ L de cDNA e 2.5 μ L de água livre de nucleases.

4.2.1. RESULTADOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA POR PCR EM TEMPO-REAL

Na quantificação efetuada procedeu-se ao estudo da expressão dos seguintes miRNA's: miR-144-5p e miR-185-5p.

O método utilizado para esta quantificação foi o mesmo que se utilizou na fase I, com a utilização de um *kit* diferente.

Devido ao elevado custo associado a este tipo de estudos, não foi possível dispor de um controlo endógeno usando este *kit*. Assim, não foi possível efetuar a normalização dos valores de C_T obtidos nesta quantificação.

Os valores de C_T obtidos nesta fase encontram-se registados na tabela 7.

Tabela 7. Resumo dos resultados dos C_T 's obtidos na segunda quantificação relativa realizada por PCR em tempo-real.

miR-144-5p			
<u>Amostras</u>	<u>Valor de C_T</u>		
	A	PT. P	Controlo
1	46.4887	49.3848	---
2	39.5742	37.4720	
3	38.4993	39.0735	
4	40.8946	39.0093	
5	38.5668	37.4704	
6	40.4420	40.5852	
7	40.9105	40.3409	
8	38.4406	38.5139	
9	39.6167	40.4647	
10	35.8000	38.6819	
11	---	---	38.8314
13	---	---	39.9458
14	---	---	44.5957
15	---	---	41.8674
miR-185-5p			
<u>Amostras</u>	<u>Valor de C_T</u>		

	A	PT. P	Controlo
1	37.6470	38.7275	---
2	37.9194	35.1225	
3	36.5958	36.7385	
4	37.7007	37.3262	
5	37.6411	36.6139	
6	37.5601	38.0567	
7	37.5710	37.5773	
8	36.9847	38.5988	
9	36.7048	36.6552	
10	34.9334	36.7658	
11	---	---	37.3820
13	---	---	38.7620
14	---	---	37.8253
15	---	---	37.5956

Foram quantificadas todas as amostras extraídas na fase II do trabalho.

Uma vez que não é possível a normalização dos valores obtidos com este *kit*, apenas podemos estimar o comportamento dos miRNA's com o PMI através da análise da variação dos valores de C_T entre a amostra A e a amostra PT.P

Assim, analisando os a variação dos valores de C_T obtidos verifica-se que:

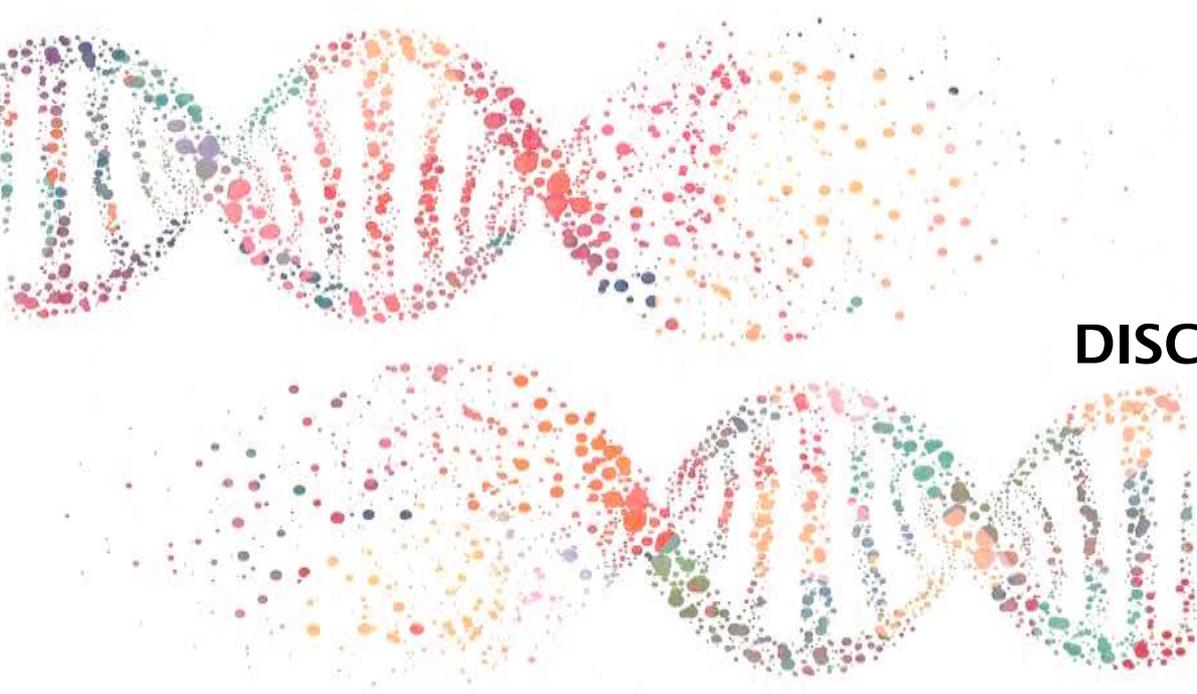
- ✓ O miR-144-5p apresenta diminuição da sua expressão com o decurso do PMI, exceto nas amostras 5 e 7;
- ✓ Por sua vez, o miR-185-5p também apresenta diminuição da sua expressão com o decurso do PMI, exceto nas amostras 5 e 9.

Os valores de C_T obtidos nas amostras do grupo de controlo (amostras 11, 13, 14 e 15) permitem confirmar que os miRNA's estudados sofrem alterações na sua expressão com o processo da morte.

Como não foi possível a normalização dos dados, também não foi possível a análise estatística dos mesmos.

Sendo assim, a fase II deste trabalho apenas permitiu observar uma diminuição da expressão dos miRNA's estudados, à semelhança do que se observou na fase I. Para retirar outras conclusões seria necessária a quantificação dos miRNA's estudados em conjunto com um controlo endógeno.

¹ **Outlier:** valor aberrante.



DISCUSSÃO

Tal como referido anteriormente, estudaram-se manchas de sangue no decurso deste trabalho. Destas, as manchas de sangue com diferentes intensidades de cor, apresentaram resultados díspares relativamente aos restantes. Por análise das manchas verificamos que estas últimas apresentavam diferentes intensidades de cor por comparação da amostra colhida logo após a morte com a colhida no momento da autópsia; a mancha referente ao momento da autópsia apresentava maior intensidade. Este facto poderá constituir a causa de se obter um menor valor de C_T nestas manchas e, conseqüentemente, de levar a concluir de forma errónea que há um aumento de expressão com o PMI. Esta discrepância nos resultados poderá ser sinónimo de má colheita ou de maior degradação das amostras, pelo que estas foram consideradas *outliers*. Também poderá estar relacionada com diferentes concentrações de miRNA extraído a partir das várias amostras.

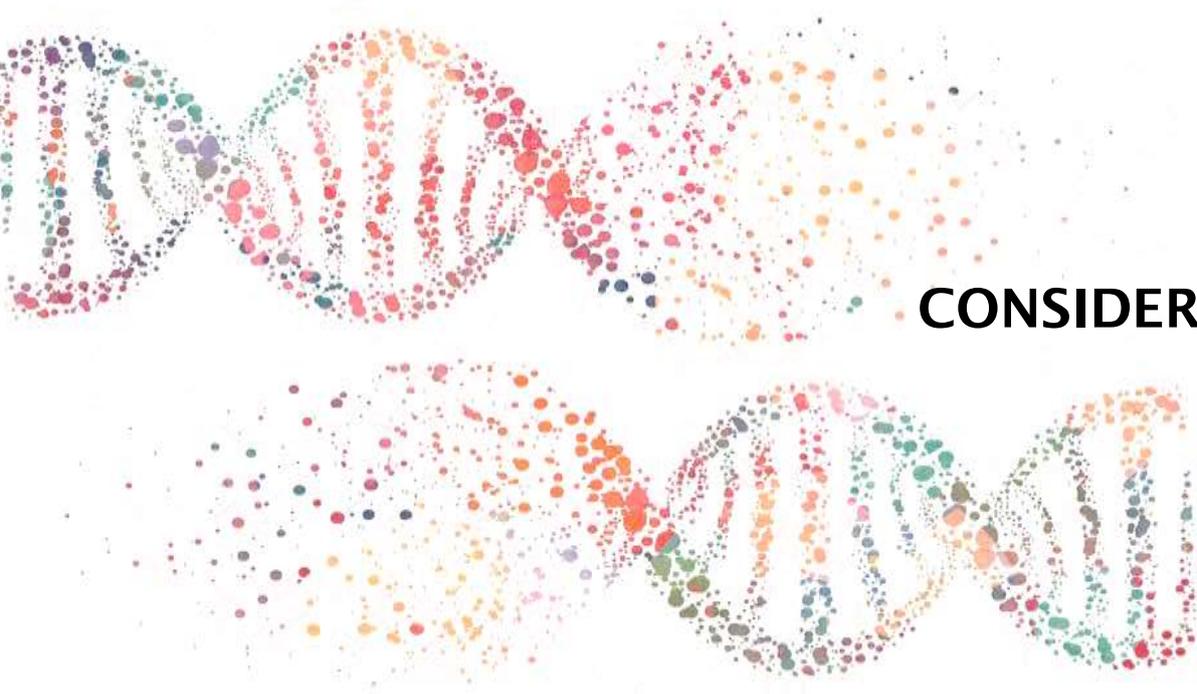
Por outro lado, o facto do tempo que mediou a primeira colheita (A) relativamente ao momento da morte ser variável (entre 1 a 11 horas), também poderá ter influência na diferente expressão dos miRNA's estudados.

Após a extração dos miRNA's tentou-se a sua quantificação com o *kit* Qubit. No entanto, como o limite de deteção do fluorímetro disponível no instituto não permitiu a obtenção da concentração de miRNA, este procedimento foi excluído.

Sendo assim, como as amostras apresentavam quantidades ínfimas de miRNA decidiu-se adaptar o número de ciclos de PCR (realizando 80 ciclos em vez dos 40). Este efeito também se poderia ter conseguido por utilização de uma técnica otimizada com recurso à amplificação dos miRNA's extraídos que não foi possível realizar.

Observou-se uma diminuição da expressão dos miRNA's estudados, quer na fase I quer na fase II, embora os resultados obtidos não sejam significativamente estatísticos. Apesar disso, seleccionamos o método utilizado na fase II como o melhor para este tipo de estudo, embora não tenha sido efetuada a normalização dos dados (por falta da quantificação de um controlo endógeno). Esta escolha foi realizada tendo em conta o facto dos valores de C_T obtidos nesta segunda quantificação terem sido mais constantes em todas as amostras (ao comparar com a fase I) e, também, devido à obtenção de melhores curvas de amplificação. O não ter sido possível a utilização de um controlo endógeno nesta fase do trabalho, não

permitiu perceber completamente o significado dos resultados obtidos com este método.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer deste estudo surgiram algumas dificuldades, uma vez que na revisão bibliográfica inicial não foi encontrada informação relativa à quantificação de miRNA's extraídos a partir de manchas de sangue colhidas a cadáveres. Os estudos desenvolvidos até ao momento na bibliografia consultada foram realizados com miRNA's extraídos a partir de fluídos biológicos líquidos e em tecidos cadavéricos.

6.1 CONCLUSÕES

As manchas de sangue poderão ser uma nova e útil abordagem para a obtenção e quantificação relativa de miRNA's e conseqüentemente para a determinação do PMI.

Esta abordagem teria muita utilidade, uma vez que as manchas de sangue são utilizadas de forma rotineira no SGBF com o objetivo de preservar as amostras colhidas por longos períodos de tempo.

Este estudo foi realizado em duas fases distintas, recorrendo a dois *kits* diferentes. Este incidiu na quantificação relativa de três miRNA's selecionados a partir de bibliografia consultada, em especial relacionada com a área médico legal e forense, onde são referidos como sendo expressos e característicos do fluído biológico sangue. Utilizou-se ainda um outro miRNA como referência para fins de normalização da quantificação relativa.

Para todos os miRNA's foi possível verificar alterações na sua expressão com o decurso do PMI, o que permite concluir que a metodologia que envolve o estudo de amostras preservadas em mancha pode ser realizada neste tipo de estudos.

Dos miRNA's estudados, nenhum apresentou diminuição da sua expressão com significância estatística.

Por essa mesma razão, este estudo apenas permite concluir que nenhum dos miRNA's estudados poderá ser um meio para determinar o PMI.

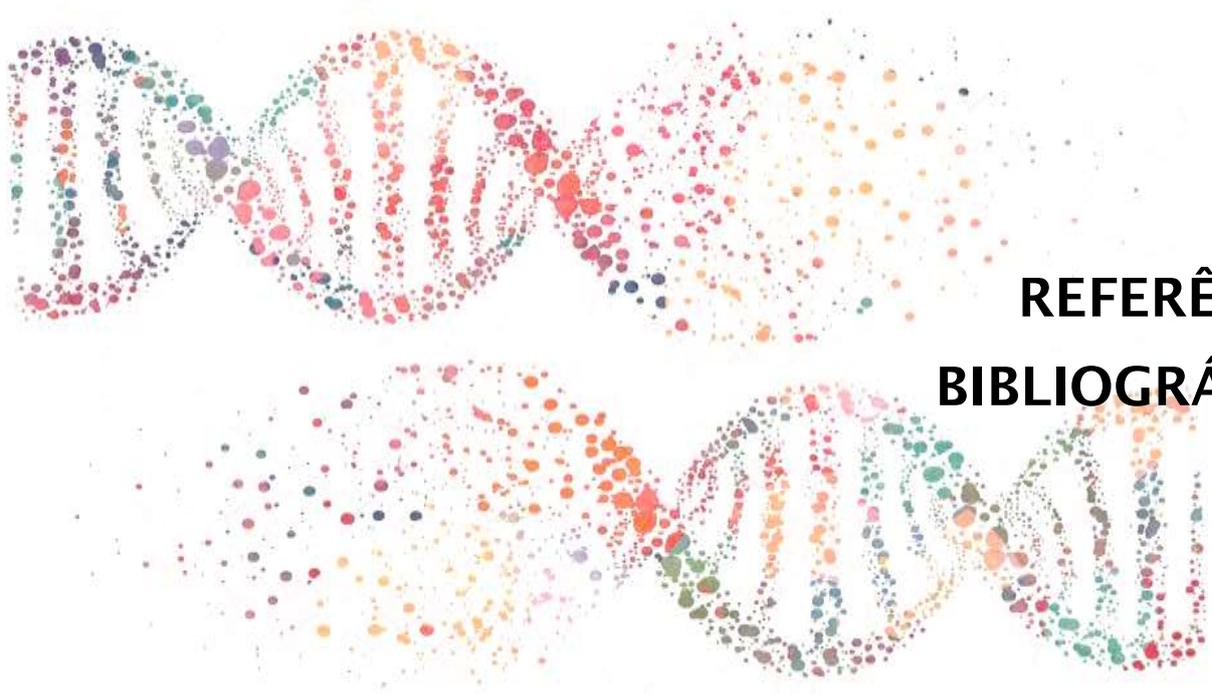
6.2 PERSPETIVAS FUTURAS

Para que as conclusões obtidas com este trabalho possam ser mais fiáveis e ilativas, será necessária a replicação deste estudo metodológico num número superior de amostras.

Também deverá ser avaliada a diferente expressão dos miRNA's estudados tendo em conta o género e a idade dos cadáveres, apesar de se ter tido o cuidado de escolher amostras de sexo feminino e de sexo masculino.

Idealmente, deverá também ser avaliada a concentração de miRNA's extraídos das manchas de sangue ou, então, deverá proceder-se à amplificação dos mesmos. Este parâmetro será útil para a otimização dos procedimentos necessários à síntese de cDNA e, também, à quantificação por PCR em tempo-real e, conseqüentemente, à obtenção de melhores resultados.

Também deverá repetir-se o método utilizado na fase II deste trabalho, com a quantificação de um controlo endógeno - miR-103a-3p. Apenas com a execução desta quantificação será possível uma melhor comparação entre os dois métodos utilizados e, conseqüentemente, a seleção do melhor método para estudos com esta finalidade.



**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] A. E. Donaldson and I. L. Lamont, "Biochemistry Changes That Occur after Death: Potential Markers for Determining Post-Mortem Interval," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, pp. 1-10, 2013.
- [2] C. Zhou and R. W. Byard, "Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers - An overview," *J. Forensic Leg. Med.*, vol. 18, pp. 6-9, 2011.
- [3] S. Pittner *et al.*, "Postmortem muscle protein degradation in humans as a tool for PMI delimitation," *Int. J. Legal Med.*, vol. 130, no. 6, pp. 1547-1555, 2016.
- [4] J. L. Metcalf *et al.*, "A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system," *Elife*, pp. 1-19, 2013.
- [5] L. Wen-Can *et al.*, "Postmortem interval determination using 18S- rRNA and microRNA," *Sci. Justice*, vol. 54, pp. 307-310, 2014.
- [6] F. Sampaio-Silva, T. Magalhães, F. Carvalho, R. J. Dinis-Oliveira, and R. Silvestre, "Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem Interval," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013.
- [7] I. Costa, F. Carvalho, T. Magalhães, P. G. De Pinho, R. Silvestre, and R. J. Dinis-oliveira, "Promising blood-derived biomarkers for estimation of the postmortem interval," *Toxicol. Res. (Camb)*, vol. 4, pp. 1443-1452, 2015.
- [8] Y. Lv *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.*, vol. 59, no. 5, pp. 1286-1294, Sep. 2014.
- [9] B. Corradini *et al.*, "Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor," *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, vol. 5, pp. e204-e206, 2015.
- [10] M. L. Goff, "Chapter 1 - Early postmortem changes and stages of decomposition," *Curr. Concepts Forensic Entomol.*, pp. 1-24, 2010.
- [11] M. L. Goff, "Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers," *Curr. Concepts Forensic Entomol.*, pp. 21-36, 2009.
- [12] F. P. Sampaio Silva, "RNA and microRNA profiling for the determination of post mortem interval," 2012.
- [13] M. Bohnert, K. Schulz, L. Belenki, and A. W. Liehr, "Re-oxygenation of

- haemoglobin in livores after post-mortem exposure to a cold environment,” *Int. J. Appl. Basic Med. Res.*, vol. 122, no. 1, pp. 91–96, 2008.
- [14] W. M. D. Cox, “Early Postmortem changes and Time of Death,” *Forensic Pathol.*, p. 69, 2009.
- [15] D. D’Souza, M. Rajesh, S. Harish, and J. Kiran, “Rigor mortis in an unusual position: Forensic considerations,” *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, vol. 1, no. 2. pp. 120–122, 2011.
- [16] L. Zhou *et al.*, “Image analysis on corneal opacity: A novel method to estimate postmortem interval in rabbits,” *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.*, vol. 30, no. 2, pp. 235–239, 2010.
- [17] F. Bévalot, N. Cartiser, C. Bottinelli, L. Fanton, and J. Guitton, “Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review,” *Forensic Toxicol.*, vol. 34, pp. 12–40, 2016.
- [18] S. Komura and S. Oshiro, “Potassium Levels in the Aqueous and Vitreous Humor after Death,” *Tohoku J. exp. Med.*, vol. 122, pp. 65–68, 1977.
- [19] E. J. Finehout, Z. Franck, N. Relkin, and K. H. Lee, “Proteomic analysis of cerebrospinal fluid changes related to postmortem interval,” *Clin. Chem.*, vol. 52, no. 10, pp. 1906–1913, 2006.
- [20] D. Querido, “Linearization of the relationship between postmortem plasma chloride concentration and postmortem interval in rats,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 45, no. 1–2, pp. 117–128, Mar. 1990.
- [21] D. Singh, R. Prashad, C. Parkash, Y. S. Bansal, S. K. Sharma, and A. N. Pandey, “Linearization of the relationship between serum sodium, potassium concentration, their ratio and time since death in Chandigarh zone of north-west India,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 130, no. 1, pp. 1–7, Nov. 2002.
- [22] D. Singh, R. Prashad, C. Parkash, S. K. Sharma, and A. N. Pandey, “Double logarithmic, linear relationship between plasma chloride concentration and time since death in humans in Chandigarh Zone of North-West India,” *Leg. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 49–54, 2003.
- [23] T. Gos and S. Raszeja, “Postmortem activity of lactate and malate dehydrogenase in human liver in relation to time after death,” *Int. J. Legal Med.*, vol. 106, no. 1, pp. 25–29, 1993.

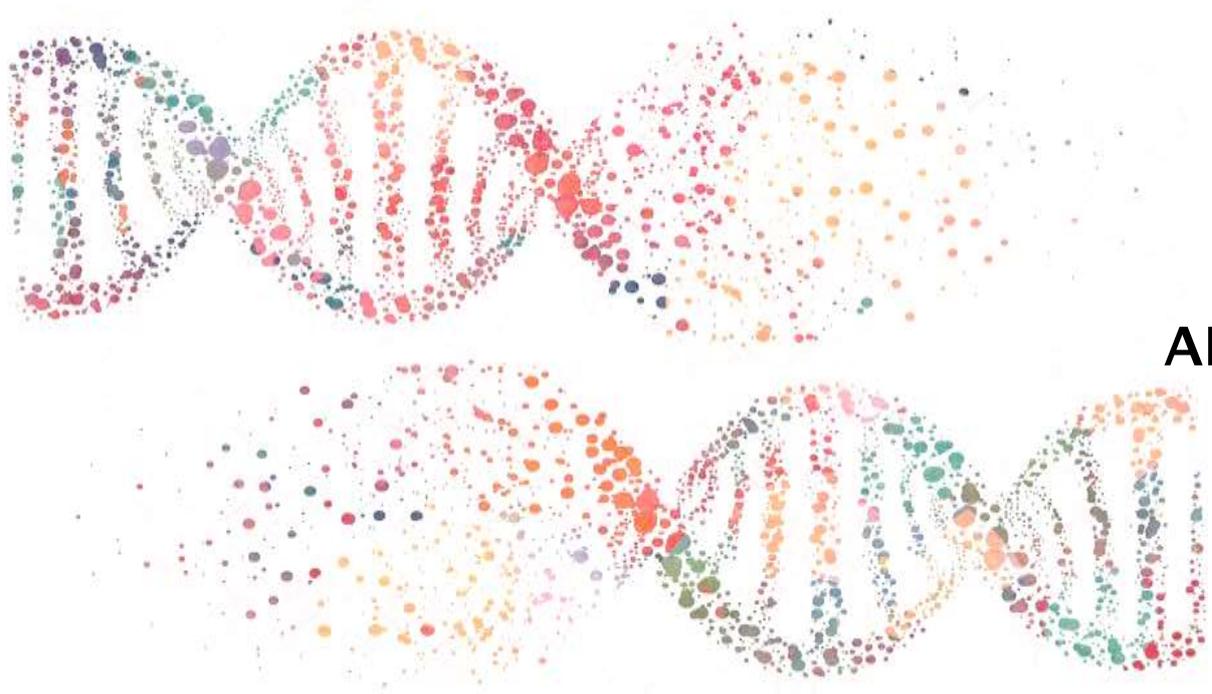
- [24] C. Hauteo, S. P. Amir Hamzah, K. Osman, a. a. Abdul Ghani, and N. Hazfalinda Hamzah, "Post mortem changes in relation to different types of clothing," *Malays. J. Pathol.*, vol. 35, no. 1, pp. 77-85, 2013.
- [25] J. W. Brooks, "Postmortem Changes in Animal Carcasses and Estimation of the Postmortem Interval," *Vet. Pathol.*, vol. 53, no. 5, pp. 929-940, 2016.
- [26] A. Moon, N. Bhale, G. B. Shinde, P. Sahare, and K. Talreja, "Protein Biomarkers : In Life and After Life," *J. Adv. Med. Life Sci.*, vol. 1, no. 3, pp. 1-6, 2014.
- [27] S. Matuszewski, "A general approach for postmortem interval based on uniformly distributed and interconnected qualitative indicators," *Int. J. Legal Med.*, vol. 131, pp. 877-884, 2017.
- [28] G. Martins, W. E. dos Santos, A. J. Creão-Duarte, L. B. G. da Silva, and A. A. F. Oliveira, "Estimativa do intervalo pós-morte em um canino (*Canis lupus familiaris* Linnaeus 1758) pela entomologia forense em Cabedelo-PB, Brasil: Relato de caso," *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, vol. 65, no. 4, pp. 1107-1110, 2013.
- [29] J. Amendt, R. Krettek, and R. Zehner, "Forensic entomology," *Naturwissenschaften*, vol. 91, pp. 51-65, 2004.
- [30] H. F. V Cardoso *et al.*, "Establishing a minimum postmortem interval of human remains in an advanced state of skeletonization using the growth rate of bryophytes and plant roots," *Int. J. Legal Med.*, vol. 124, no. 5, pp. 451-456, 2010.
- [31] H. Miller Coyle, C.-L. Lee, W.-Y. Lin, H. C. Lee, and T. M. Palmbach, "Forensic botany: using plant evidence to aid in forensic death investigation.," *Croat. Med. J.*, vol. 46, no. 4, pp. 606-612, 2005.
- [32] N. Di Nunno, F. M. D. Costantinides, P. M. D. Bernasconi, C. Bottin, and M. M. D. Melato, "Is Flow Cytometric Evaluation of DNA Degradation a Reliable Method to Investigate the Early Postmortem Period?," *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, vol. 19, no. 1, pp. 50-53, 1998.
- [33] M. Vennemann and A. Koppelkamm, "mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations," *Forensic Sci. Int.*, vol. 203, pp. 71-75, 2010.
- [34] M. Sidova, S. Tomankova, P. Abaffy, M. Kubista, and R. Sindelka, "Effects of

- post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality," *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 5, pp. 3–9, 2015.
- [35] J. C. Brase, D. Wuttig, R. Kuner, and H. Sültmann, "Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer," *Mol. Cancer*, vol. 9, no. 306, pp. 1–9, 2010.
- [36] M. P. Moreau, S. E. Bruse, R. David-rus, S. Buyske, and L. M. Brzustowicz, "Altered microRNA expression profiles in post-mortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder," vol. 69, no. 2, pp. 188–193, 2012.
- [37] P. Verma, R. K. Pandey, P. Prajapati, and V. K. Prajapati, "Circulating microRNAs: Potential and emerging biomarkers for diagnosis of human infectious diseases," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. 1274, pp. 1–7, 2016.
- [38] L. Pacheco-Lugo, Y. Díaz-Olmos, and G. Aroca-Martinez, "Biomarcadores en fluidos biológicos y su potencial uso como indicadores de nefritis lúpica en individuos con lupus eritematoso sistémico," *Rev. Colomb. Nefrol.*, vol. 1, no. 1, pp. 39–47, 2014.
- [39] J. Hyun An, K.-J. Shin, W. Ick Yang, and H. Young Lee, "Body fluid identification in forensics," *BMB Rep.*, pp. 545–553, 2012.
- [40] M. Orlicka-plotcka, D. Gurda, A. Fedoruk-wyszomirska, I. Smolarek, and E. Wyszko, "Circulating microRNAs in Cardiovascular Diseases," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 63, 2016.
- [41] S. A. Da Rocha Navega, "EXTRACELLULAR MICRORNAS IN FORENSIC SCIENCES: potential biomarkers for body fluid identification," 2015.
- [42] Y. Kakimoto, H. Kamiguchi, E. Ochiai, F. Satoh, and M. Osawa, "MicroRNA stability in postmortem FFPE tissues: Quantitative analysis using autoptic samples from acute myocardial infarction patients," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–17, 2015.
- [43] A. Etheridge, I. Lee, L. Hood, D. Galas, and K. Wang, "Extracellular microRNA: a new source of biomarkers," *Natl. Institutes Heal.*, vol. 717, no. 1–2, pp. 85–90, 2011.
- [44] M. J. Kacperska, J. Walenczak, and B. Tomasik, "Plasmatic microRNA as Potential Biomarkers of Multiple Sclerosis : Literature Review *," *Adv Clin Exp Med*, vol. 25, no. 4, pp. 775–779, 2016.

- [45] A. Brunet and X. Calvet, "Variability in microRNA recovery from plasma : Comparison of five commercial kits," no. November, 2015.
- [46] Q. Zhao *et al.*, "A direct quantification method for measuring plasma MicroRNAs identified potential biomarkers for detecting metastatic breast cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 16, 2016.
- [47] O. Faruq and A. Vecchione, "microRNA: diagnostic perspective," *Front. Med.*, vol. 2, no. 51, pp. 1–10, 2015.
- [48] S. Harbison and R. Fleming, "Forensic body fluid identification: state of the art," *Res. Reports Forensic Med. Sci.*, vol. 6, pp. 11–23, 2016.
- [49] L. Wang, J. Lv, C. Guo, H. Li, and C. Xiong, "Recovery of cell-free mRNA and microRNA from human semen based on their physical nature," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, pp. 342–348, 2013.
- [50] P. Jolly *et al.*, "Highly sensitive dual mode electrochemical platform for microRNA detection," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 36719, pp. 1–9, 2016.
- [51] Z. Wang *et al.*, "Characterization of microRNA expression profiles in blood and saliva using the Ion Personal Genome Machine® System (Ion PGM™ System)," *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 20, pp. 140–146, 2016.
- [52] D. Zubakov, A. W. M. Boersma, Y. Choi, P. F. Van Kuijk, E. A. C. Wiemer, and M. Kayser, "MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation," *Int. J. Legal Med.*, vol. 124, pp. 217–226, 2010.
- [53] C. Courts and B. Madea, "Specific Micro-RNA Signatures for the Detection of Saliva and Blood in Forensic Body-fluid Identification," *J. Forensic Sci.*, vol. 56, no. 6, pp. 1464–1470, 2011.
- [54] X. Y. Luo, Z. L. Li, D. Peng, L. Wang, L. Zhang, and W. B. Liang, "MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from miRCURY LNA array," *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, vol. 5, pp. e630–e632, 2015.
- [55] X. Liu *et al.*, "MicroRNAs in biofluids are novel tools for bladder cancer screening," *Oncotarget*, vol. 8, no. 19, pp. 32370–32379, 2017.
- [56] S. Nagaraj *et al.*, "Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects,"

Oncotarget, vol. 8, no. 10, pp. 16122–16143, 2017.

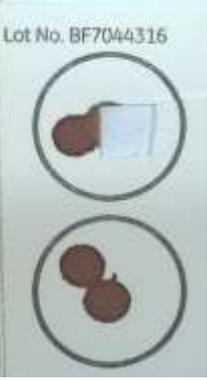
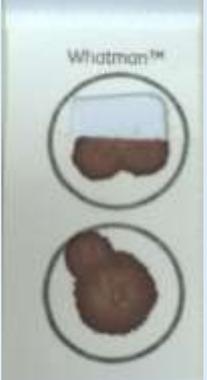
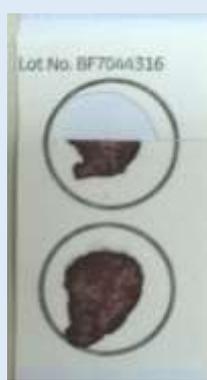
- [57] J. L. Prieto, C. Magaña, and D. H. Ubelaker, “Interpretation of Postmortem Change in Cadavers in Spain,” vol. 49, no. 5, pp. 1–6, 2004.
- [58] M. T. Viana Machado, “MICRORNA BIOMARKERS FOR PERIPHERAL BLOOD FRACTIONS IDENTIFICATION: possible forensic applications,” 2015.
- [59] T. Blondal *et al.*, “Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids,” *Methods*, vol. 59, pp. 164–169, 2013.
- [60] S. Pilakka-kanthikeel and M. P. N. Nair, “Interaction of drugs of abuse and microRNA with HIV : a brief review,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. 967, pp. 1–10, 2015.
- [61] R. Dumache *et al.*, “Use of miRNAs as Biomarkers in Sepsis,” *Hindawi Publ. Corp.*, pp. 1–9, 2015.
- [62] A. Homami and F. Ghazi, “MicroRNAs as biomarkers associated with bladder cancer,” *Med. J. Islam. Repub. Iran*, vol. 30, no. 475, pp. 1–8, 2016.
- [63] J. Camila *et al.*, “Marcadores Moleculares da Via da Apoptose Celular Relacionados com o Efeito da Terapia Fotodinâmica em Carcinomas Mamários.”

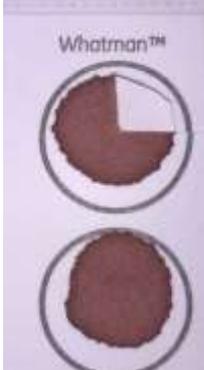
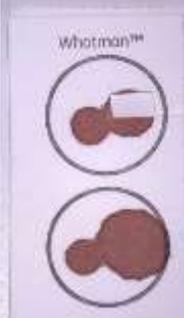
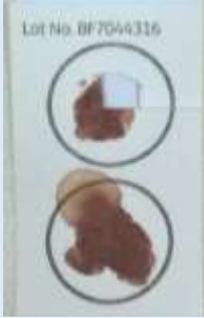
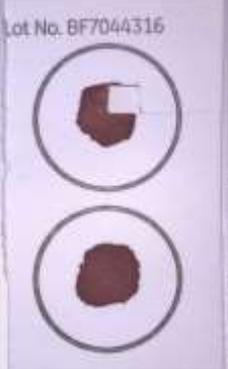


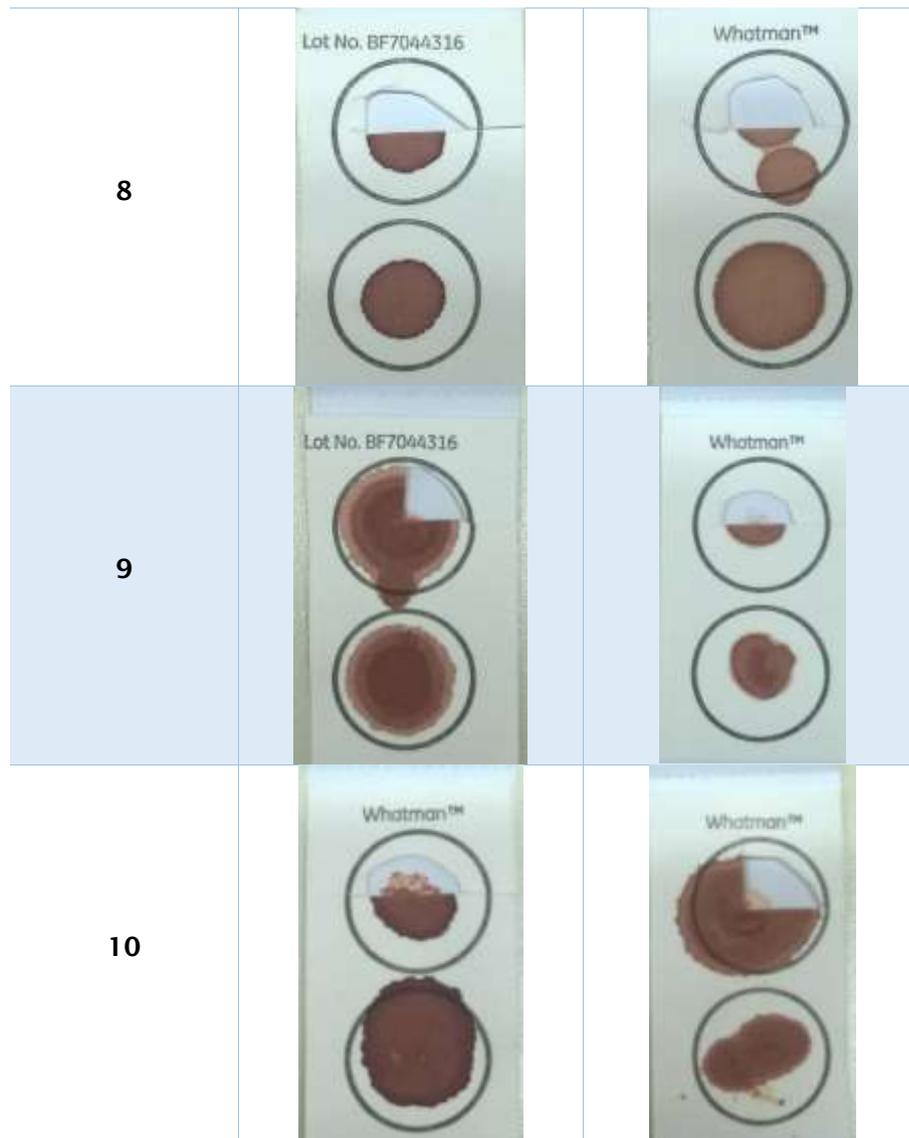
ANEXOS

ANEXO I – Registo fotográfico das manchas de sangue colhidas, após a sua utilização na a extração de miRNA's

➤ Grupo problema:

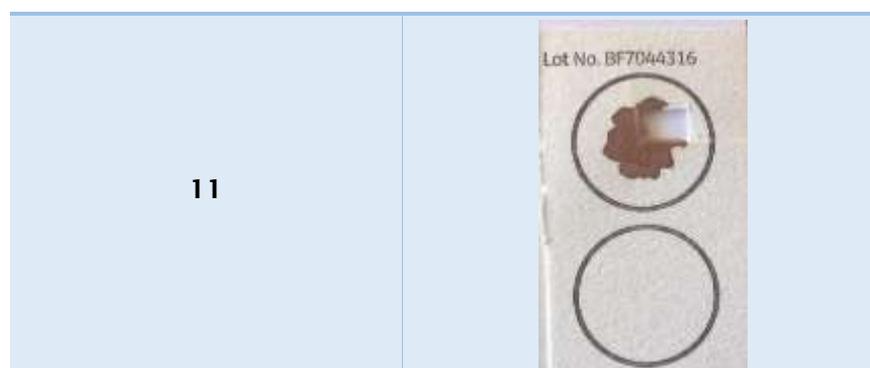
Referência da mancha	Logo após a morte (A)	No momento da autópsia (PT. P)
1		
2		
3		

4		
5		
6		
7		



➤ Grupo de referência:

Referência da mancha



12	
13	
14	
15	

ANEXO II – Formulário de consentimento informado para a colheita de manchas de sangue a voluntários

AUTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS PARA INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA

Data da colheita ____/____/____

NOME: _____

Data de Nascimento ____/____/____

Naturalidade _____

Naturalidade do Pai _____

Naturalidade da Mãe _____

Declaro que sou a pessoa identificada e que dou o meu consentimento para a colheita de amostras após informação abaixo resumida

Assinatura

- 1- As amostras colhidas destinam-se a investigação científica, carecendo apenas de consentimento informado, conforme Lei nº 12/2005, de 26 de Janeiro.
- 2- As amostras não serão identificadas durante o percurso laboratorial, não sendo possível fazer o cruzamento entre o nome do participante, a respetiva amostra e os resultados.
- 3- Este estudo pode ser objeto de publicação em revista de reconhecido valor científico da especialidade, não sendo publicados quaisquer dados pessoais relativos aos participantes.

NOTAS: _____

Responsável pela colheita

ANEXO III – Protocolos seguidos na fase I deste trabalho

Na fase I deste trabalho foram executados os procedimentos indicados pelos fabricantes dos diferentes *kits*:

➤ “mirPremier® microRNA Isolation” para a extração de miRNA’s:

II. Small RNA Isolation - Mammalian Tissues

1. **Prepare Lysis Mix.** According to Table 3 below, add microRNA Lysis Buffer and Binding Solution to a clean tube and mix briefly, and then add 100% ethanol and mix briefly. Supplement the solution with 10 μL of 2-mercaptoethanol per 1 ml of the solution. Prepare a volume of the Lysis Mix sufficient for that day's use. Each standard preparation requires 700 μL of the Lysis Mix. It is best to prepare the Lysis Mix just prior to the start of the purification procedure. Keep the Lysis Mix at room temperature before use.

Table 3. Lysis Mix for Mammalian Tissues

Component	Amount/ml Lysis Mix
microRNA Lysis Buffer (M1070)	630 μL
Binding Solution (L8042)	320 μL
100% ethanol	50 μL

2. **Lyse Tissue Samples.** Add 700 μL (for 20-40 mg tissue) or 350 μL (for < 20 mg tissue) of the Lysis Mix to the tissue sample and homogenize the tissue with a rotor-stator homogenizer for 45-50 seconds in moderate speed. Let the sample sit at room temperature for 3-5 minutes. Do not vortex the crude lysate.
Note: Do not exceed 60 seconds of homogenization. Excessive shearing of DNA might cause DNA contamination in final prep.
3. **Pellet Cellular Debris.** Centrifuge the sample at maximum speed (14,000 –16,000 x g) in a standard microcentrifuge for 5 minutes to remove cellular debris, genomic DNA, and large RNA.
4. **Filter Lysate.** Pipet the lysate supernatant into a Filtration Column (blue retainer ring). Avoid the pellet. Centrifuge at maximum speed (14,000 – 16,000 x g) for 30 seconds. Save the clarified flow-through lysate.
5. **Add Ethanol for RNA Binding.** Measure the volume of the clarified lysate with a pipette. Add 1.1 volumes of 100% ethanol to the clarified lysate (For example, add 748 μL of 100% ethanol to 680 μL of the clarified lysate). Mix immediately and thoroughly by vortex or inversion. **Do not centrifuge the tube.**
Note: Increase the amount of 100% ethanol to 1.5 volumes if process liver tissue or other tissues that may contain a high level of glycogen.
6. **Bind RNA to Column.** Pipet 700 μL of the mixture into a Binding Column (red retainer ring).

Centrifuge at maximum speed (14,000 –16,000 x g) for 30 seconds. Decant the flow-through liquid. Repeat the binding step with the remaining mixture.

Note: Liver tissues are rich in glycogen, and a small amount of glycogen may be retained on the top of the red retainer at the centrifugal side after each binding step. If this occurs, switch the tube centrifugation orientation in the following wash steps to facilitate the removal of the glycogen.

7. **First Column Wash.** Add 700 μL of 100% ethanol into the column. Centrifuge at maximum speed (14,000 –16,000 x g) for 30 seconds. Discard the flow-through liquid and return the column to the Collection Tube.
8. **Second Column Wash.** Add 500 μL of Binding Solution into the column. Centrifuge at maximum speed (14,000 –16,000 x g) for 30 seconds.
Note: Repeat the Binding Solution wash step if processing pancreatic tissue or any tissue rich in ribonucleases.
9. **Third Column Wash.** Transfer the Binding Column into a fresh Collection Tube (provided). Add 500 μL of the Ethanol-diluted Wash Solution 2 into the column. Centrifuge at maximum speed (14,000 –16,000 x g) for 30 seconds. Discard the flow-through liquid and return the column to the Collection Tube.
10. **Fourth Column Wash.** Add another 500 μL of the Ethanol-diluted Wash Solution 2 into the column, and centrifuge at maximum speed (14,000 –16,000 x g) for 30 seconds. Discard the flow-through liquid and return the column to the Collection Tube.
11. **Dry Column.** Centrifuge the column at maximum speed (14,000 –16,000 x g) for 1 minute to dry. Carefully remove the column-tube assembly from the centrifuge to avoid splashing the residual flow-through liquid to the dried column.
12. **Elute RNA.** Transfer the column to a new 2 ml Collection Tube (provided). Add 50 μL of Elution Solution directly onto the center of the filter inside the column. Reduce the volume of Elution Solution to 20-30 μL if the starting material is small or if a more concentrated RNA sample is desired. Close the cap and let the tube sit for 1 minute. Centrifuge at maximum speed (14,000 –16,000 x g) for 1 minute to elute. Repeat the elution step by collecting the eluate in a pipette tip and reload the solution directly onto the center of the filter inside the column. Close the cap and let the tube sit for 1 minute. Centrifuge at maximum speed for 1 minute to elute. Purified RNA is now in the flow-through eluate and ready for immediate use or storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (short term) or $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (long term).

➤ “Qubit® RNA Assay” para a determinação da concentração de miRNA’s:

Prepare samples and standards

The protocol below assumes you are preparing standards for calibrating the Qubit® Fluorometer. If you plan to use the last calibration performed on the instrument (see “Calibrate the Qubit® Fluorometer” on page 4), you need fewer tubes (step 2.1) and less working solution (step 2.3). For sample purity determinations, it is possible to use the Qubit® Fluorometer to calculate the amount of dsDNA and RNA in the same sample — simply perform each assay for your sample.

- 2.1** Set up the required number of 0.5-mL tubes you need for standards and samples. The Qubit® microRNA assay requires 2 standards.

Note: Use only thin-wall, clear 0.5-mL, optical-grade real-time PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit® assay tubes (500 tubes, Cat. no. Q32856) or Axygen® PCR-05-C tubes (VWR, part number 10011-830).

- 2.2** Label the tube lids.

Note: Label the lid of each standard tube correctly, as calibration of the Qubit® Fluorometer requires that the standards be introduced to the instrument in the right order.

- 2.3** Prepare the Qubit® working solution by diluting the Qubit® microRNA reagent 1:200 in Qubit® microRNA buffer. Use a clean plastic tube each time you make Qubit® working solution. **Do not mix the working solution in a glass container.**

Note: The final volume in each tube must be 200 µL. Each standard tube requires 190 µL of Qubit® working solution, and each sample tube requires anywhere from 180 µL to 199 µL. Prepare sufficient Qubit® working solution to accommodate all standards and samples.

For example, for 8 samples, prepare enough working solution for the samples and 2 standards: ~200 µL per tube in 10 tubes yields 2 mL of working solution (10 µL of Qubit® microRNA reagent plus 1,990 µL of Qubit® microRNA buffer).

- 2.4** Load 190 µL of Qubit® working solution into each of the tubes used for standards.

- 2.5** Add 10 µL of each Qubit® microRNA standard to the appropriate tube and mix by vortexing 2–3 seconds, being careful not to create bubbles.

Note: Careful pipetting is critical to ensure that exactly 10 µL of each Qubit® microRNA standard is added to 190 µL of Qubit® working solution.

- 2.6** Load Qubit® working solution into individual assay tubes so that the final volume in each tube after adding sample is 200 µL.

Note: Your sample can be anywhere between 1 µL and 20 µL, therefore, load each assay tube with a volume of Qubit® working solution anywhere between 180 µL and 199 µL.

- 2.7** Add each of your samples to assay tubes containing the correct volume of Qubit® working solution (prepared in step 2.6) and mix by vortexing 2–3 seconds. The final volume in each tube should be 200 µL.

- 2.8** Allow all tubes to incubate at room temperature for 2 minutes.

Proceed to “Read standards and samples”; follow the procedure appropriate for your instrument:

- “Qubit® 3.0 Fluorometer” on page 7
- “Qubit® 2.0 Fluorometer” on page 8

➤ “miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR” para a conversão em cDNA e quantificação por PCR em tempo-real:

Protocol

The miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR protocol is a two-part protocol consisting of:

1. First-strand cDNA synthesis (Step 1-5)
2. Real-time PCR amplification (Step 6-11)

Important: Keep reagents and reactions on ice (or at 4 °C) at all times.

First strand synthesis:

Step 1

RNA input volume

Since the RNA concentration in extractions from serum and plasma cannot be determined with accuracy we recommend using the amount of starting material as a measure for input amount.

Step 2

Prepare reagents

Gently thaw the 5x Reaction buffer and nuclease-free water, and immediately place on ice. Mix by vortexing. Re-suspend the RNA spike-in(s) according to the appropriate RNA Spike-in protocol (see page 15), leave on ice for 15-20 minutes. Immediately before use, remove the Enzyme mix from the freezer, mix by flicking the tubes and place on ice. Spin down all reagents.

Step 3

Combine reagents according to Table 14

Note: remember to calculate necessary excess volume for pipetting and robotic dead volume

If performing first-strand cDNA synthesis on multiple RNA samples, it is recommended to prepare an RT working solution of the 5x Reaction buffer, water, Enzyme mix and RNA spike ins (in the proportion indicated in the first four lines of Table 14).

The following procedure is recommended:

1. Prepare the required amount of RT working solution and place it on ice.
2. Dispense RT working solution into nuclease free tubes.
3. Dispense template RNA in each tube.

Reagent	Volume (µL), RT reaction
5x Reaction buffer	2
Nuclease-free water	4.5
Enzyme mix	1
Synthetic RNA spike ins, optional replace with H ₂ O if omitted	0.5
Template total RNA ¹⁾	2
Total volume	10

Table 14. Reverse transcription reaction setup

Step 4

Mix and spin reagents

Mix the reaction by very gentle vortexing or pipetting to ensure that all reagents are thoroughly mixed. After mixing, spin down.

Step 5

Incubate and heat inactivate²⁾

- Incubate for 60 min at 42 °C.
- Heat-inactivate the reverse transcriptase for 5 min at 95 °C.
- Immediately cool to 4 °C.
- Store at 4 °C or freeze.

A. Individual assays
in plasma samples

qPCR protocol:

Step 6 Prepare reagents for real-time PCR

Place cDNA (from Step 5), nuclease free water and PCR Master mix on ice and thaw for 15-20 min. Protect the PCR Master mix vials from light. Immediately before use, mix the PCR Master mix by pipetting up and down. The rest of the reagents are mixed by vortexing and spun down.

Step 7 Dilute cDNA template 40x in nuclease free water³

Immediately before use, dilute only the amount of cDNA template needed for the planned real-time PCR reactions 40x in nuclease free water (e.g. add 390 μ l nuclease free water to each 10 μ l of reaction). It is recommended to use "low-nucleic acid binding" tubes or plates. It is not recommended to store the 1:40 dilution of cDNA.

Recommendation: include a passive reference dye in the cDNA dilution if advised by instrument manufacturer. Please note that the PCR Master mix does not include ROX. The amount of ROX required is instrument dependent and it is important to refer to the manufacturer's recommendations when deciding how much ROX to use.

See Tip 8

Step 8 Combine PCR Master mix, PCR primer set and cDNA according to Table 15

Mix thoroughly

Note: remember to calculate necessary excess volume for pipetting and robotic dead volume

When multiple real-time PCR reactions are performed with the same microRNA primer set, it is recommended to prepare a primer:master mix working-solution of the PCR primers and the PCR Master mix (in the proportion indicated in Table 15).

The following procedure is recommended:

1. Prepare the required amount of PCR primer:master mix working-solution (see Table 3) and place it on ice. It is recommended to include 10% excess of all reagents in the master mix to compensate for pipetting excess material.
2. Place the relevant volume of primer:master mix working-solution in PCR tubes/wells (see Table 3) and spin tubes/plate briefly in a centrifuge (1500g for 1 minute), to avoid air bubbles.
3. Add cDNA template to each tube/well.

Reagent	Volume (μ L), 96/384-well plate, tubes or strips
PCR Master mix	5
PCR primer set ³	1
Diluted cDNA template	4
Total volume	10

Table 15. Real-time PCR reaction, pr. 10 μ L reaction⁴

Step 9 Mix and spin reagents

Mix the reaction by gentle pipetting to ensure that all reagents are mixed thoroughly. After mixing cap tubes or strips or seal the plate with optical sealing as recommended by the manufacturer. Spin down in a centrifuge (1500g for 1 minute). The experiment can be paused at this point. Store the reactions protected from light at 4°C for up to 24 hours.

ABI instrument user?

Apply manual baseline and threshold settings! Go to www.exiqon.com/sds to download settings file

Step 10
Real-time PCR
amplification

Perform real-time PCR amplification followed by melting curve analysis according to Table 16.

Process step	Settings, LC480 instrument [®]	Settings, other instruments [®]
Polymerase Activation/ Denaturation	95 °C, 10 min	95 °C, 10 min
Amplification	45 amplification cycles at 95 °C, 10 s 60 °C, 1 min, ramp-rate 1.6 °C/s ²⁾ Optical read	40 amplification cycles at 95 °C, 10 s 60 °C, 1 min, ramp-rate 1.6 °C/s ²⁾ Optical read
Melting curve analysis [®]	Yes	Yes

Table 16. Real-time PCR cycle conditions.

Step 11
Analyze data

Perform initial data analysis using the software supplied with the real-time PCR instrument to obtain raw Cq values (Cp or Ct, depending on PCR instrument). If you are using an ABI instrument, please note that it is not recommended to use auto Ct settings. For a guide on how to set manual baseline and threshold, refer to Tip 10, page 61 in the Tips section. Furthermore, if the data is to be analyzed using Exiqon GenEx, the experiment must be set up as an AQ experiment, not RQ. If you are using a Roche LC480 instrument, we recommend analysis using the 2nd derivative method.

For tips on normalization, please see Tip 11, page 63. We recommend performing normalization and further data analysis with the Exiqon GenEx qPCR analysis software (www.exiqon.com/mirna-pcr-analysis). Please refer to our data analysis guide for recommendations.

See Tip 11

ANEXO IV – Protocolos seguidos na fase II deste trabalho

Na fase II deste trabalho foram executados os procedimentos indicados pelos fabricantes dos diferentes *kits*:

➤ “RNeasy® Micro Kit” para a extração de miRNA’s:

Things to do before starting

- Buffers RWT and RPE are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the required volumes of ethanol (96–100%), as indicated on the bottle, to obtain a working solution.
- If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix B (page 35).

Procedure

1. **Excise the tissue sample from the animal or remove it from storage. Determine the amount of tissue. Do not use more than 5 mg tissue, or 10 mg adipose tissue.**

Unless you are working with RNAlater or AllProtect stabilized tissue, do not allow the tissue to thaw before placing in QIAzol Lysis Reagent.

2. **If the entire piece of tissue can be used for RNA purification, place it directly into 700 µl QIAzol Lysis Reagent in a suitably sized vessel for disruption and homogenization.**

If only a portion of the tissue is to be used, determine the weight of the piece to be used and place it into 700 µl QIAzol Lysis Reagent in a suitably sized vessel for disruption and homogenization.

RNA in tissues is not protected after harvesting until the sample is stabilized in RNAlater or AllProtect Reagent, flash-frozen, or disrupted and homogenized in step 3. Unstabilized, frozen animal tissue should not be allowed to thaw during handling.

Note: Use a suitably sized vessel with sufficient headspace to accommodate foaming, which may occur during homogenization.

3. **Homogenize immediately using the TissueLyser system, the TissueRuptor, or another method until the sample is uniformly homogeneous (usually 20–40 s).**

See pages 15–17 for a more detailed description of disruption and homogenization methods.

Note: Homogenization with the TissueRuptor or the TissueLyser system (see page 16) generally results in higher total RNA yields than with other homogenization methods.

Foaming may occur during homogenization, especially of brain tissue. If this occurs, let the homogenate stand at room temperature for 2–3 min until the foam subsides before continuing with the protocol.

Note: Homogenized tissue lysates can be stored at –70°C for several months.

- 4. Place the tube containing the homogenate on the benchtop at room temperature (15–25°C) for 5 min.**

This step promotes dissociation of nucleoprotein complexes.

- 5. Add 140 µl chloroform to the tube containing the homogenate and cap it securely. Shake the tube vigorously for 15 s.**

Thorough mixing is important for subsequent phase separation.

- 6. Place the tube containing the homogenate on the benchtop at room temperature for 2–3 min.**

- 7. Centrifuge for 15 min at 12,000 x g at 4°C. After centrifugation, heat the centrifuge up to room temperature (15–25°C) if the same centrifuge will be used for the next centrifugation steps.**

After centrifugation, the sample separates into 3 phases: an upper, colorless, aqueous phase containing RNA; a white interphase; and a lower, red, organic phase. The volume of the aqueous phase should be approximately 350 µl.

Note: If you want to purify a separate miRNA-enriched fraction, follow the steps in Appendix A (page 32) after performing this step.

- 8. Transfer the upper aqueous phase to a new collection tube (not supplied). Add 1.5 volumes (usually 525 µl) of 100% ethanol and mix thoroughly by pipetting up and down several times. Do not centrifuge. Continue without delay with step 9.**

A precipitate may form after addition of ethanol, but this will not affect the procedure.

- 9. Pipet up to 700 µl of the sample, including any precipitate that may have formed, into an RNeasy MinElute spin column in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently and centrifuge at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) for 15 s at room temperature (15–25°C). Discard the flow-through.***

Reuse the collection tube in step 10.

- 10. Repeat step 9 using the remainder of the sample. Discard the flow-through.***

Reuse the collection tube in step 11.

Optional: If performing optional on-column DNase digestion (see "Important points before starting"), follow steps B1–B4 (page 35) after performing this step.

- 11. Add 700 µl Buffer RWT to the RNeasy MinElute spin column. Close the lid gently and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the column. Discard the flow-through.***

Skip this step if performing the optional on-column DNase digestion (page 35).

Reuse the collection tube in step 12.

- 12. Pipet 500 µl Buffer RPE onto the RNeasy MinElute spin column. Close the lid gently and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the column. Discard the flow-through.**

Reuse the collection tube in step 13.

13. Pipet 500 μ l of 80% ethanol onto the RNeasy MinElute spin column. Close the lid gently and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane. Discard the collection tube with the flow-through.

Note: 80% ethanol should be prepared with ethanol (96–100%) and RNase-free water.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy MinElute spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

14. Place the RNeasy MinElute spin column into a new 2 ml collection tube (supplied). Open the lid of the spin column, and centrifuge at full speed for 5 min to dry the membrane. Discard the collection tube with the flow-through.

To avoid damage to their lids, place the spin columns into the centrifuge with at least one empty position between columns. Orient the lids so that they point in a direction opposite to the rotation of the rotor (e.g., if the rotor rotates clockwise, orient the lids counterclockwise).

It is important to dry the spin column membrane, since residual ethanol may interfere with downstream reactions. Centrifugation with the lids open ensures that no ethanol is carried over during RNA elution.

15. Place the RNeasy MinElute spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 14 μ l RNase-free water directly to the center of the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at full speed to elute the RNA.

As little as 10 μ l RNase-free water can be used for elution if a higher RNA concentration is required, but the yield will be reduced by approximately 20%. Do not elute with less than 10 μ l RNase-free water, as the spin column membrane will not be sufficiently hydrated.

The dead volume of the RNeasy MinElute spin column is 2 μ l: elution with 14 μ l RNase-free water results in a 12 μ l eluate.

➤ miScript[®]II RT Kit para a conversão em cDNA:

1. Thaw template RNA on ice. Thaw 10x Nucleics Mix and either 5x miScript HiSpec Buffer or 5x miScript HiFlex Buffer (depending on the application, see "Notes before starting" and Table 1) at room temperature (15–25°C). Mix each solution by flicking the tubes. Centrifuge briefly to collect residual liquid from the sides of the tubes and then store on ice.
2. Prepare the reverse-transcription master mix on ice according to Table 2. Mix and then store on ice. The reverse-transcription master mix contains all components required for first-strand cDNA synthesis except template RNA.

Note: miScript Reverse Transcriptase Mix should be removed from the -20°C freezer just before preparation of the master mix and placed on ice. It should be returned to the freezer immediately after use.

Table 2. Reverse-transcription reaction components*

Component	Volume/reaction
5x miScript HiSpec Buffer or 5x miScript HiFlex Buffer [†]	4 μl
10x Nucleics Mix	2 μl
RNase-free water	Variable
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μl
Template RNA (added in step 3)	Variable (see Table 1 for recommendations)
Total volume	20 μl

* If setting up more than one reaction, prepare a volume of master mix 10% greater than that required for the total number of reactions to be performed.

[†] The correct buffer to use depends on the subsequent PCR application, see "Notes before starting" and Table 1.

3. Add template RNA to each tube containing reverse-transcription master mix. Mix gently, briefly centrifuge, and then place on ice.
4. Incubate for 60 min at 37°C .
5. Incubate for 5 min at 95°C to inactivate miScript Reverse Transcriptase Mix and place on ice.

If you wish to proceed with real-time PCR immediately, dilute the reverse-transcription reactions as described in Table 3, mix gently, briefly centrifuge, and continue with real-time PCR. Alternatively, to store the reverse-transcription reactions prior to real-time PCR, transfer undiluted to a -20°C freezer, or dispense the diluted reactions into 110 μl aliquots and transfer to a -20°C freezer.

➤ "miScript SYBR® Green PCR" para a quantificação por PCR em tempo-real:

Procedure

1. Thaw 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10x miScript Precursor Assay, template cDNA, and RNase-free water at room temperature ($15-25^{\circ}\text{C}$). Mix the individual solutions.
2. Prepare a reaction mix according to Table 7 for either a 10 μl per well reaction volume (used in 384-well plates), a 25 μl per well reaction volume (used in 96-well plates), or a 20 μl per well reaction volume (used in 100-well Rotor-Discs).

Reaction mix contains everything except the template cDNA. Due to the hot start, it is not necessary to keep samples on ice during reaction setup or while programming the real-time cycler.

Table 7. Reaction setup for real-time PCR

Component	Volume/reaction (384-well)	Volume/reaction (96-well)	Volume/reaction (Rotor-Disc 100)*
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [†]	5 μ l	12.5 μ l	10 μ l
10x miScript Precursor Assay [‡]	1 μ l	2.5 μ l	2 μ l
RNase-free water	Variable	Variable	Variable
Template cDNA (added at step 3) [§]	\leq 1 μ l	\leq 2.5 μ l	\leq 2 μ l
Total volume	10 μl	25 μl	20 μl

* These volumes can also be used for reactions set up in Strip Tubes for use with the Rotor-Gene Q 72-Well Rotor.

[†] No optimization of the Mg²⁺ concentration is required. The final Mg²⁺ concentration provided by 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix gives optimal results.

[‡] The miScript Precursor Assay contains both a forward and a reverse primer. Do not add miScript Universal Primer.

[§] The volume of diluted cDNA should not exceed 10% of the final reaction volume. Volumes refer to cDNA prepared using the miScript II RT Kit with miScript HiFlex Buffer. The final concentration of cDNA should be 10–20 ng per reaction.

3. Dispense template cDNA into the individual plate/Rotor-Disc wells.
4. Mix the reaction mix thoroughly but gently and dispense appropriate volumes into the plate/Rotor-Disc wells containing template cDNA.

5. Carefully, tightly seal the plate/Rotor-Disc with caps, film, or Rotor-Disc Heat-Sealing Film.
6. Centrifuge for 1 min at 1000 g at room temperature (15–25°C) to remove bubbles.
Note: This step is not necessary for reactions set up in Rotor-Discs.
7. Program the real-time cycler according to Table 8.

Table 8. Cycling conditions for real-time PCR

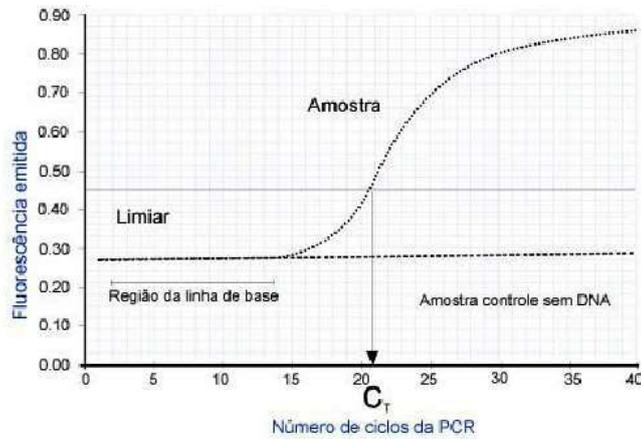
Step	Time	Temperature	Additional comments
PCR Initial activation step	15 min	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase is activated by this heating step.
3-step cycling:^{*†}			
Denaturation	15 s	94°C	
Annealing	30 s	55°C	
Extension [§]	30 s	70°C	Perform fluorescence data collection.
Cycle number	40 cycles [¶]		

8. Place the plate/Rotor-Disc in the real-time cycler and start the cycling program.

Note: Perform dissociation curve analysis of the PCR product(s) to verify their specificity and identity. Dissociation curve analysis is an analysis step built into the software of real-time cyclers. Follow the instructions provided by the supplier.

ANEXO V - Curva de amplificação e respetivo valor de C_T (exemplo)

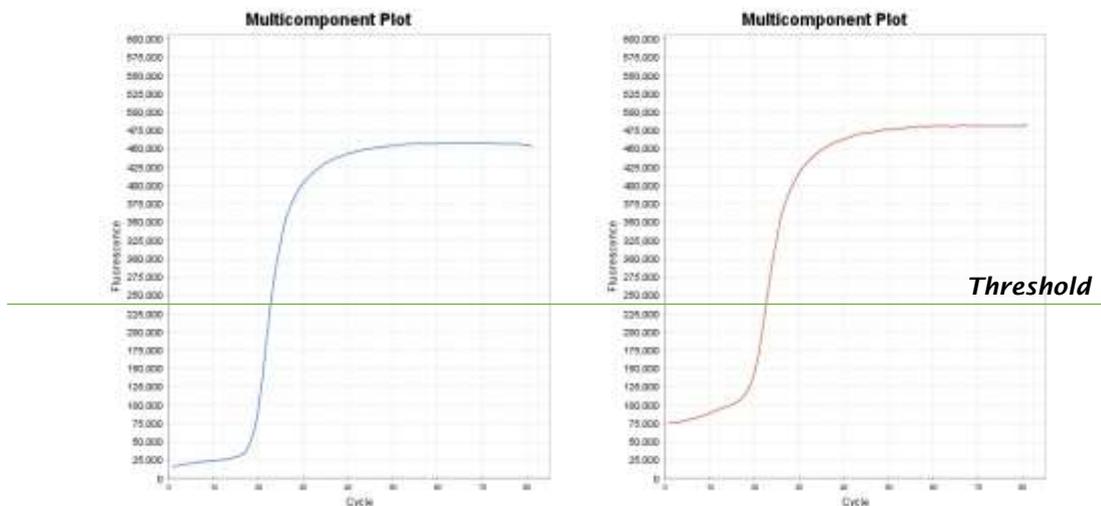
- Curva de amplificação com representação do valor de C_T :



- Curvas de amplificação obtidas para a amostra 5 (A e PT.P), nos 3 miRNA's estudados (na fluorescência de 270000):

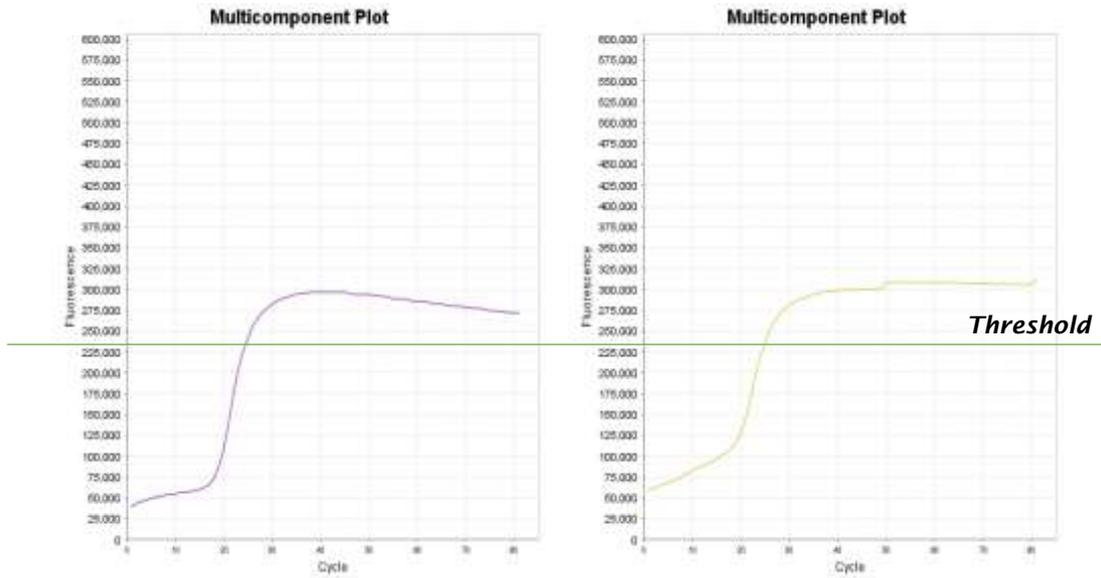
O valor de C_T corresponde ao ponto de interseção da curva de amplificação com o *threshold*.

miR-103a-3p:



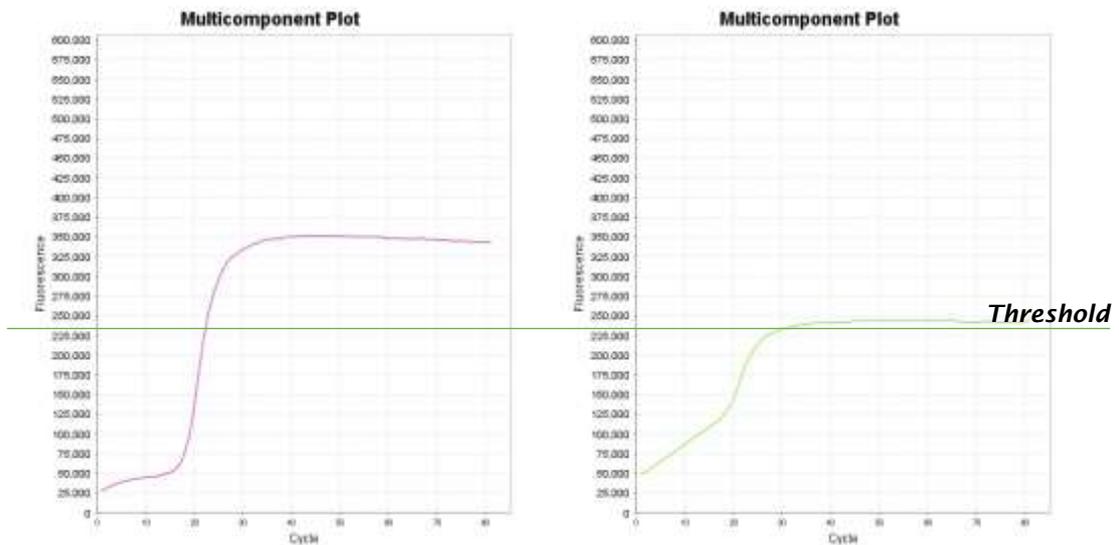
Observa-se um aumento no valor de C_T , sendo este mais elevado na amostra colhida no momento da autópsia médico-legal. O que nos permite concluir que o miR-103a-3p sofre um decréscimo na sua expressão com o PMI, para a amostra 5.

miR-106a-5p:



Observa-se um aumento no valor de C_T , sendo este mais elevado na amostra colhida no momento da autópsia médico-legal. O que nos permite concluir que o miR-106a-5p sofre um decréscimo na sua expressão com o PMI, para a amostra 5.

miR-185a-5p:



Observa-se igualmente um aumento no valor de C_T , sendo este mais elevado na amostra colhida no momento da autópsia médico-legal. O que nos permite concluir que o miR-106a-5p sofre um decréscimo na sua expressão com o PMI, para a amostra 5.

ANEXO VI – Resultados obtidos após análise estatística dos valores de C_T resultantes das quantificações relativas realizadas neste trabalho (teste de *t-student*)

➤ Fase I (quantificação relativa por PCR em tempo-real com o kit “*miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR*”):

Na fase I deste estudo quantificaram-se as amostras 2 a 6. Os resultados obtidos com a aplicação do método de Livak em todas as amostras foram sujeitos a uma análise estatística, com execução de um teste de *t-student*. O nível de confiança adotado foi de 95%.

Os resultados obtidos encontram-se registados na tabela seguinte.

miR-106a-5p	
Média	11.3685
Desvio padrão	1.8281
Erro padrão da média	1.2927
Intervalo de confiança	-5.0562; 27.7931
t	8.7950
p-value	0.0720 > 0.05
miR-185-5p	
Média	18.2365
Desvio padrão	7.2918
Erro padrão da média	5.1561
Intervalo de confiança	-47.2781; 83.7511
T	3.5370
p-value	0.1750 > 0.05

Como o nível de confiança adotado foi de 95%, podemos concluir que apenas os resultados com *p-value* < 0.05 apresentam significância estatística.

Assim, na fase I deste estudo, nem o decréscimo da expressão de miR-106a-5p nem o decréscimo da expressão de miR-185-5p com o PMI apresentam significado estatístico.

