

MESTRADO

MEDICINA LEGAL

MicroRNAs salivares como biomarcadores nas ciências forenses

Telma Salomé dos Santos Moreira

M

2022

MicroRNAs salivares como biomarcadores nas ciências forenses

Telma Salomé dos Santos Moreira



TELMA SALOMÉ DOS SANTOS MOREIRA

MICRORNAS SALIVARES COMO BIOMARCADORES NAS CIÊNCIAS FORENSES

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

Orientador: Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

Categoria: Investigadora Júnior

Afiliação: Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Co-orientador: Professor Doutor Rui Manuel Medeiros

Categoria: Professor Associado Convidado

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Co-orientador: Doutora Francisca Dias

Categoria: Investigadora Júnior

Afiliação: Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Informação Técnica

TÍTULO:

MicroRNAs salivares como biomarcadores nas ciências forenses

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

AUTOR: Telma Salomé dos Santos Moreira

DATA: outubro de 2022

EDITOR: Telma Salomé dos Santos Moreira

CORREIO ELETRÓNICO: telmassmoreira@gmail.com

1º EDIÇÃO: outubro de 2022

“E Jesus disse-lhe: Se tu podes crer, tudo é possível ao que crê.”

Marcos, 9:23

Bíblia Sagrada

Agradecimentos

Ao longo destes dois anos de mestrado tive a sorte de ter pessoas especiais na minha vida que me deram todo o apoio para superar vários obstáculos que passei. Embora as palavras não sejam suficientes para exprimir a minha gratidão, gostaria de deixar aqui o meu agradecimento a todas essas pessoas.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Maria José Pinto da Costa, Coordenadora do Mestrado em Medicina Legal pela oportunidade da realização deste mestrado e por todo o conhecimento transmitido. É uma honra ter aulas com alguém tão dedicado e apaixonado pela área da Medicina Legal.

À minha orientadora, Doutora Ana Luísa Teixeira, um muito obrigada por ter aceite a orientação e por me propor este tema tão desafiante para mim. Quero agradecer toda a disponibilidade, dedicação, paciência e confiança ao longo dos vários meses de orientação, a partilha do conhecimento científico e todas as sugestões e conselhos prestados.

Ao meu co-orientador, Rui Manuel Medeiros, coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto pelo privilégio da concretização deste projeto.

À minha co-orientadora, Francisca Dias por toda a disponibilidade e pelas sugestões e ideias indispensáveis para a realização deste projeto de investigação, assim como toda a simpatia e acolhimento no grupo.

Ao Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Instituto Português de Oncologia do Porto pelo fácil processo de integração, por toda a boa disposição partilhada e, especialmente, por todo o conhecimento e partilha de ideias. Em especial, agradeço à Cristina Almeida pela ajuda incansável no trabalho laboratorial e por todo esclarecimento de dúvidas e à Valéria Tavares por todo o apoio e ajuda facultado.

Não posso deixar de agradecer ao Serviço de Química Clínica do Departamento de Diagnóstico Laboratorial do IPO-Porto pela colaboração na quantificação dos níveis de cortisol, assim como a todos os voluntários, que fizeram da realização deste projeto possível.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, em especial à Marta Vale, Susana Azevedo, Catarina Godinho e Carolina Oliveira por todo o apoio e partilha nesta etapa que passamos juntas, e espero que nos continuemos a cruzar no contexto da Medicina Legal e a partilhar bons momentos.

Agradecimentos

A todos os meus amigos pelo incentivo e pela amizade ao longo deste percurso.

À minha melhor amiga, Sofia Lopes, pela confiança que deposita em mim, pelo apoio incondicional, pela amizade, paciência e conselhos nos momentos mais difíceis ao longo destes dois anos assim como sempre, desde pequeninas.

Ao meu namorado, Felipe Leão, pelo amor e companheirismo constantes, por nunca me deixar desistir ao acreditar sempre em mim e por todos os momentos de descontração e alegria. Obrigada pela preocupação e apoio em todo este processo.

À minha avó Glória, por me apoiar incondicionalmente em todos os momentos ao longo da minha vida, em especial na minha vida académica, por todo carinho e força e por sempre me guiar pelo caminho de Deus e do bem.

Aos meus padrinhos e primo por estarem sempre presentes no meu percurso sempre com alegria e por toda a preocupação demonstrada.

A toda a minha família, em especial destaque aos meus pais e irmão Tomás, que ao longo dos anos me apoiaram em todas as decisões, um agradecimento muito especial a eles. Por toda a paciência, confiança e positivismo ao longo de todo este processo. Sem vocês nada disto seria possível.

A todos, o meu sincero obrigado.

Índice

Resumo	10
Abstract.....	12
1. Introdução.....	16
1.1. Perfis de RNA	17
1.1.1. MicroRNAs	18
1.2. MicroRNAs como potenciais biomarcadores de identificação de fluídos biológicos.....	21
1.2.1. MicroRNAs como biomarcadores salivares	24
1.3. Ritmo circadiano e os seus mecanismos moleculares.....	26
1.3.1. Importância do ritmo circadiano para as ciências forenses.....	28
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo principal	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. Materiais e Métodos	34
3.1. Seleção do perfil de microRNAs alvo de estudo	34
3.2. Fase 1.....	36
Processamento das amostras.....	36
Extração de microRNAs.....	37
Síntese de cDNA e quantificação por PCR em tempo real	37
3.3. Fase 2.....	39
Processamento e análise molecular das amostras	39
3.4. Análise estatística.....	40
4. Resultados	42
4.1. Quantidade de RNA total recuperado nos diferentes suportes.....	42
4.2. Níveis de expressão dos miRNAs RNU48, RNU6b, hsa-let-7a-5p e hsa-miR-16-5p nos diferentes suportes.....	43

4.3. Frequência de detecção e nível de expressão do perfil de miRNAs salivar nos diferentes suportes.....	45
4.4. Variação circadiana da quantidade de RNA total e de cortisol	48
4.5. Níveis de expressão dos miRNAs salivares ao longo do dia	49
5. Discussão	52
6. Conclusão e Perspetivas Futuras	60
7. Referências Bibliográficas	64
8. Anexos.....	72

Índice de figuras

Figura 1. Representação esquemática da biogénese de microRNAs. (Figura criada no programa BioRender e exportada em outubro de 2022)	19
Figura 2. Mecanismo de ação dos miRNAs. (Figura criada no programa BioRender e exportada em outubro de 2022)	20
Figura 3. Representação gráfica dos níveis de cortisol ao longo do dia. (Figura criada no programa BioRender e exportada em outubro de 2022)	29
Figura 4. Desenho do estudo.....	35
Figura 5. Desenho do Procedimento Experimental da Fase 1.	37
Figura 6. Detecção da quantidade de RNA total nos diferentes suportes ao longo do tempo de exposição.	42
Figura 7. Média dos valores de Ct's dos RNU48, RNU6b, hsa-let-7a-5p e hsa-miR-16-5p no filtro de cigarro (a) e na caixa de plástico (b), nos diferentes tempos de exposição (10 minutos, 3 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas).....	44
Figura 8. Níveis de expressão relativa dos hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p nos diferentes tempos de exposição, no a) suporte filtro de cigarro e no b) suporte caixa de plástico. (média ± erro da média).....	46
Figura 9. Níveis de expressão relativa dos hsa-miR-24-3p (a), hsa-miR-142-3p (b) e hsa-miR-29a-3p (c), às 24 horas e 48 horas na caixa de plástico- exposição ambiente e protegido da exposição ambiente (média ± erro da média).....	47
Figura 10. Quantidade de RNA total nas amostras de saliva e níveis de cortisol salivar ao longo do dia (manhã, tarde e noite).	48
Figura 11. Expressão relativa (Fold-change) dos hsa-miR-24-3p (a), hsa-miR-29a-3p (b) e hsa-miR-142-3p (c) e níveis de cortisol na saliva ao longo do tempo (manhã, tarde e noite).	50

Índice de tabelas

Tabela 1. microRNAs expressos nos fluídos biológicos mais frequentemente estudados no âmbito das ciências forenses.....24
Tabela 2. MicroRNAs selecionados para o estudo.....34

Abreviaturas e símbolos

% - percentagem

µL - Microlitro

A

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica

AGO2 – Argonauta 2

B

BMAL1 – *Brain and Muscle ARNT-like protein-1*

C

CBG – Globulina de Ligação a Corticosteróides

cDNA – DNA complementar

CLOCK – *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

CRH – Hormona Libertadora de Corticotrofina

CRY – *Cryptochrome gene*

Ct – *Cycle Threshold*

D

DGRC8 – *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*

dL – Decilitro

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

H

HPA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

M

mL – Mililitro

mm – Milímetro

miR – microRNA

miRNA – microRNA

mRNA – RNA mensageiro

N

ng – Nanograma

NSQ – Núcleo Supraquiasmático

P

P – *P-value*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PER – *Period gene*

pre-miRNA – microRNA precursor

pri-miRNA – microRNA primário

Q

qPCR – PCR quantitativo

R

RISC – *RNA Induced Silencing Complex*

RNA – *Ribonucleic Acid*

ROR – *Retinoic-Related Orphan Nuclear Hormone Receptor*

RORE – *Receptor-Related Orphan Receptor Binding Elements*

rpm – Rotações por minuto

RT – Transcriptase Reversa

S

SNC – Sistema Nervoso Central

T

TRBP – *Transactivation-responsive RNA-Binding Protein*

X

XPO5 – Exportina 5

Resumo

Nas Ciências Forenses a detecção de fluídos biológicos depositados em diferentes cenários e suportes, nomeadamente fluídos de saliva, constitui um passo crucial nas investigações criminais, podendo a sua identificação e posterior análise apresentar ter importante impacto na resolução dos casos.

Contudo, em cenários de crime reais, esses fluídos encontram-se em quantidades reduzidas, misturados e expostos a diferentes fatores ambientais, o que pode provocar a sua degradação e qualidade, o que influencia a sua posterior análise pelas técnicas convencionais. Os métodos convencionais usados na detecção de fluídos biológicos baseiam-se na utilização de ensaios químicos e enzimáticos que, geralmente, são de natureza presuntiva e que apresentam várias limitações, destacando-se a baixa especificidade e sensibilidade e a necessidade de destruição de elevada quantidade da amostra, o que poderá inviabilizar qualquer análise adicional. Deste modo, torna-se relevante o desenvolvimento de testes e novos biomarcadores sensíveis e específicos associados à identificação dos diferentes fluídos humanos, passíveis de serem analisados por técnicas rápidas, sensíveis e precisas, como é o caso dos microRNAs (miRNAs).

Os miRNAs apresentam uma elevada especificidade entre tecidos e tipos de fluídos biológicos, o que os torna um alvo atrativo de estudo. Por outro lado, a sua natureza faz com que estes sejam estáveis, mesmo quando expostos a diferentes fatores ambientais, o que poderá ser uma vantagem na análise de amostras forenses. Vários miRNAs específicos têm sido aplicados não só na identificação de fluídos biológicos, mas também na determinação da causa de morte, na exposição a fármacos e drogas, na determinação do intervalo *post-mortem* ou como marcadores de ritmo circadiano.

A análise da expressão de miRNAs que regulam os relógios endógenos, envolvidos na regulação do ritmo circadiano, poderá ser uma ferramenta útil de análise para estimar determinados eventos, como por exemplo o período do dia em que determinada amostra foi depositada num local, o que representa informação imprescindível na resolução de um caso. Tal como os ritmos biológicos endógenos, como é o caso da produção hormonal de cortisol, os miRNAs podem apresentar oscilações ao longo do dia.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a expressão de um perfil de miRNAs salivares (hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-29a-3p e hsa-miR-

126-5p) e a sua estabilidade após deposição em diferentes tipos de suporte físicos (filtro de cigarro e o plástico) ao longo de vários tempos de exposição ao ambiente (10 minutos, 3 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas). Para além disso, este estudo também analisou a variação circadiana dos níveis de expressão do perfil de miRNAs selecionado (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-24-3p e hsa-miR-29a-3p) em amostras de saliva e sua associação com os níveis de cortisol salivar.

Para cada tempo de exposição, as amostras foram recolhidas, processadas e feita a extração de miRNAs. De seguida, foi realizada a síntese de DNA complementar e, posteriormente, os miRNAs foram analisados por PCR quantitativo em tempo real.

O presente estudo verificou que é possível detetar RNA a partir de todas as amostras de saliva até 48 horas após a deposição, com boa qualidade e quantidade nos dois suportes analisados. De acordo com os resultados obtidos, os hsa-miR-10a-5p e hsa-miR-126-5p apresentaram uma baixa expressão em amostras de saliva. Porém, os hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p apresentaram níveis de expressão elevados em amostras de saliva depositadas no suporte de plástico e no filtro de cigarro ao longo das 48 horas de exposição. Contudo, é de realçar que os níveis elevados dos hsa-miR-24-3p e hsa-miR-142-3p eram mais acentuados, comparativamente ao hsa-miR-29a-3p. Conforme estes resultados, é proposto a inclusão dos miRNAs hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p num perfil de miRNAs que incluem miRNAs com altos níveis de expressão e com baixos níveis de expressão para uma maior robustez e sensibilidade na identificação da amostra de saliva.

Em relação à dinâmica dos miRNAs selecionados ao longo do dia, foi possível verificar que os hsa-miR-142-3p, hsa-miR-29a-3p e hsa-miR-24-3p apresentaram oscilações dos níveis de expressão ao longo do dia, verificando-se o pico mais baixo de manhã, com um aumento ao longo do dia, atingindo o pico mais elevado pela tarde, e uma diminuição à noite, contrariamente aos níveis de cortisol que o seu pico mais elevado é pela manhã, diminuindo ao longo do dia e atingindo o valor mais baixo à noite. Com este estudo, foi possível concluir que a inclusão dos hsa-miR-142-3p, hsa-miR-24-3p e hsa-miR-29a-3p como potenciais biomarcadores de saliva a serem incluídos num perfil de miRNAs a estudar aquando da necessidade de deteção de um padrão temporal em amostras de saliva depositadas em determinados locais, seria fulcral para auxiliar em questões médico-legais.

No futuro, seria ideal a replicação do estudo num maior número de indivíduos para validação de resultados e adicionar-se mais tempos de exposição e outros suportes onde a saliva é frequentemente encontrada em cenas de crime.

Abstract

In Forensic Sciences, the detection of biological fluids deposited in different scenarios and supports, namely saliva fluids, is a crucial step in criminal investigations, and their identification and subsequent analysis may have an important impact on the resolution of cases.

However, in real crime scenarios, these fluids are found in reduced amounts, mixed and exposed to different environmental factors, which can cause their degradation and quality, which influences their subsequent analysis by conventional techniques. Conventional methods used in the detection of biological fluids are based on the use of chemical and enzymatic assays, which are generally presumptive in nature and have several limitations, highlighting the low specificity and sensitivity and the need to destroy a large amount of the sample, which may make any further analysis unfeasible. Thus, the development of tests and new sensitive and specific biomarkers associated with the identification of different human fluids, which can be analysed by fast, sensitive and precise techniques, such as microRNAs (miRNAs) becomes relevant.

MiRNAs have a high specificity between tissues and types of biological fluids, which makes them an attractive target for study. On the other hand, their nature makes them stable, even when exposed to different environmental factors, which could be an advantage in the analysis of forensic samples. Several specific miRNAs have been applied not only in the identification of biological fluids, but also in the determination of the cause of death, in the exposure to drugs and drugs, in the determination of the post-mortem interval or as circadian rhythm markers.

The analysis of the expression of miRNAs that regulate the endogenous clocks, involved in the regulation of the circadian rhythm, could be a useful analysis tool to estimate certain events, such as the time of day when a certain sample was deposited in a place, which represents essential information in solving a case. Like endogenous biological rhythms, such as the hormonal production of cortisol, miRNAs can fluctuate throughout the day.

The main objective of this study was to evaluate the expression of a profile of salivary miRNAs (hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-29a-3p and hsa-miR-126-5p) and its stability after deposition on different types of physical support (cigarette filter and plastic) over different exposure times to the environment (10 minutes, 3 hours, 6 hours, 24 hours and 48 hours). Furthermore, this study also analysed the circadian variation of the expression levels of the selected miRNAs profile (hsa-miR-142-

3p, hsa-miR-24-3p and hsa-miR-29a-3p) in saliva and its association with salivary cortisol levels.

For each exposure time, samples were collected, processed and miRNAs extracted. Then, complementary DNA synthesis was performed and, later, the miRNAs were analysed by real-time quantitative PCR.

The present study verified that it is possible to detect RNA from all saliva samples up to 48 hours after deposition, with good quality and quantity in the two analysed supports. According to the results obtained, hsa-miR-10a-5p and hsa-miR-126-5p showed low expression in saliva samples. However, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p and hsa-miR-29a-3p showed high expression levels in saliva samples deposited on the plastic support and on the cigarette filter over the 48 hours of exposure. However, it is noteworthy that the high levels of hsa-miR-24-3p and hsa-miR-142-3p were more pronounced compared to hsa-miR-29a-3p. According to these results, it is proposed to include the miRNAs hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p and hsa-miR-29a-3p in a miRNA profile that includes miRNAs with high expression levels and with low expression levels for greater robustness and sensitivity in the identification of the saliva sample.

Regarding the dynamics of the selected miRNAs throughout the day, it was possible to verify that hsa-miR-142-3p, hsa-miR-29a-3p and hsa-miR-24-3p showed oscillations in expression levels throughout the day, with the lowest peak in the morning, with an increase throughout the day, reaching the highest peak in the afternoon, and a decrease in the evening, in contrast to cortisol levels, which peak in the morning, decreasing during the day throughout the day and reaching the lowest value at night. With this study, it was possible to conclude that the inclusion of hsa-miR-142-3p, hsa-miR-24-3p and hsa-miR-29a-3p as potential saliva biomarkers to be included in a miRNA profile to be studied during the need to detect a temporal pattern in saliva samples deposited in certain locations would be crucial to assist in medico-legal issues.

In the future, it would be ideal to replicate the study in a larger number of subjects to validate the results and add more exposure times and other supports where saliva is often found at crime scenes.

1. Introdução

1. Introdução

A análise de perfis de RNA tem sido, recentemente, explorada na área das ciências forenses, apresentando-se como uma potencial ferramenta para diversas aplicações, nomeadamente identificação de fluidos biológicos, determinação de intervalo *post-mortem* (pela análise de degradação de RNA) ou mesmo para a estimativa da idade à morte (1-5).

No âmbito das ciências forenses a deteção e consequente identificação de diferentes fluídos biológicos, depositados em diferentes cenários e suportes, constitui um passo essencial numa investigação, podendo ter um impacto significativo na resolução de qualquer caso associado (6). A utilização e análise de fluídos biológicos tem diversas aplicações, desde a área da genética, em que a sua análise é essencial, por exemplo, para as investigações biológicas de parentesco, para as identificações genéticas individuais e em casos de agressões sexuais. Adicionalmente, a análise de fluidos biológicos também é importante para a deteção de consumo de substâncias ilícitas (7). Os fluídos biológicos mais comumente encontrados em cenas de crime são o sangue, a saliva e o sêmen (8). Embora não tão frequente, também é possível encontrar evidências da presença de outros fluídos biológicos de que é exemplo a urina, o suor, o sangue menstrual e fluídos vaginais (8, 9).

Em cenas de crime, os fluídos biológicos são, muitas vezes, encontrados em pequenas quantidades, misturados e expostos a diferentes fatores ambientais, como temperatura, luz solar, humidade, chuva, etc., que podem causar a sua degradação e, consequentemente, afetar a sua análise subsequente através de algumas das técnicas padrão, nomeadamente os ensaios químicos e enzimáticos (1). Por outro lado, sabemos, atualmente, que o tipo de suporte sobre o qual os fluidos biológicos estão depositados também pode afetar a sua análise (1). Por exemplo, no caso do suporte ser poroso ou liso, essas diferentes propriedades de absorção podem afetar a colheita e a análise dos fluidos biológicos (1). Isto faz com que os métodos convencionais, tais como os métodos químicos, catalíticos, imunológicos, de microscopia e espectroscópicos apresentem baixa especificidade e sensibilidade não sendo os ideais para a identificação de fluídos biológicos (2). Para além disso, vários testes preliminares usados para identificação de fluídos biológicos podem causar destruição da amostra, o que pode comprometer o uso posterior da amostra em testes confirmatórios, como por exemplo na obtenção de perfis de DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) (8).

A introdução de novos testes e novos biomarcadores, com alta sensibilidade e especificidade, associados à identificação de diferentes tipos de fluídos biológicos, passíveis de análise por técnicas rápidas, sensíveis e precisas, torna-se relevante. Deste modo, nos últimos anos, têm surgido evidências que suportam o potencial dos ácidos nucleicos, como é o caso do RNA mensageiro (mRNA) (10) e microRNAs (miRNAs) como biomarcadores com potencial de serem usados na identificação de fluídos biológicos (11). A utilização destes biomarcadores é sustentada na sua expressão tecido-específica em diferentes tecidos e fluídos biológicos, na sua estabilidade (especialmente no caso dos microRNAs por serem moléculas de pequeno tamanho) e na capacidade de serem analisados por técnicas moleculares, nomeadamente por qPCR em tempo real ou PCR digital (10, 11).

1.1. Perfis de RNA

A análise do perfil de mRNAs surgiu nas ciências forenses como uma vantagem para a identificação do fluído biológico presente na amostra, visto que assenta no conceito que cada tecido biológico tem um padrão único de expressão génica, com diferenças na composição e abundância (12). A quantificação de mRNA para a identificação de fluídos biológicos é uma técnica utilizada em vários laboratórios forenses e foi proposta como um método sensível na identificação de fluídos biológicos (13).

Zubakov e colaboradores, através da análise completa da expressão do genoma em amostras de sangue e saliva degradadas ao longo do tempo, identificaram cinco mRNAs específicos para a identificação de amostras de saliva, *SPRR3*, *SPRR1A*, *KRT4*, *KRT6A* e *KRT13*, e nove mRNAs específicos de amostras de sangue, *CASP1*, *AMICA1*, *C1QR1*, *ALOX5AP*, *AQP9*, *C5R1*, *NCF2*, *MNDA* e *ARHGAP26*, considerando-os estáveis o suficiente para a identificação de amostras de sangue e saliva até 180 dias (14). Posteriormente, Zubakov e colaboradores, avaliaram o comportamento dos mesmos cinco mRNAs na saliva e nove mRNAs em sangue, em amostras mais antigas de sangue (13 a 16 anos) e de saliva (2 a 6 anos) e concluíram que esses biomarcadores eram suficientemente estáveis e sensíveis para serem utilizados na identificação de amostras de sangue e saliva (13).

Posteriormente, um estudo realizado por Hanson e colaboradores demonstrou que os mRNAs *ALAS2*, *PRM1*, *HTN3*, *CYP2B7P1*, *MMP10* e *LCE1C* apresentam uma elevada expressão em amostras de sangue, sémen, saliva, secreções vaginais, sangue

menstrual e pele, respetivamente, sendo assim passíveis de serem utilizados como potenciais biomarcadores destes vestígios biológicos (15).

Contudo, a análise destes perfis também apresenta algumas limitações, nomeadamente a falta de reprodutibilidade dos resultados. Estas limitações, estão associadas à limitada estabilidade das moléculas de mRNA e à sua elevada suscetibilidade à degradação por fatores ambientais, como por exemplo à humidade, luz solar, temperatura, podendo também ser influenciada por fatores intrínsecos, nomeadamente a degradação enzimática (2, 4).

Nos últimos anos, têm surgido evidências que mostram que algumas destas limitações poderão ser ultrapassadas através do estudo de miRNAs. Os miRNAs apresentam-se como potenciais biomarcadores nas ciências forenses, sendo moléculas mais estáveis e resistentes à exposição a fatores ambientais do que os mRNAs, de recuperação mais fácil mesmo em amostras com baixa qualidade e quantidade de RNA, apresentando também uma expressão *tissue-specific* (2, 4).

1.1.1. MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenas moléculas de cadeia simples de RNA não codificante, com, aproximadamente 18-25 nucleotídeos de comprimento, que regulam a expressão génica através da inibição da tradução ou degradação de moléculas-alvo de mRNA (3, 4, 6, 16-18).

A biogénese dos miRNAs inicia-se no núcleo onde o miRNA é transcrito através da RNA polimerase II, dando origem a um precursor de miRNA primário (pri-miRNA) (4, 17-19). No núcleo, os pri-miRNAs são processados pelo complexo Drosha e DGRC8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8), dando origem a um precursor de miRNA (pre-miRNA) (4, 17, 18). Este é exportado para o citoplasma através da exportina-5 (XPO5) onde posteriormente será processado pela enzima Dicer, em associação com o TRBP (Transactivation-responsive RNA-Binding Protein), resultando na formação de uma cadeia dupla de RNA, um miRNA duplex. Esta cadeia de RNA é incorporada no complexo de silenciamento RISC (RNA Induced Silencing Complex) e associado à proteína argonauta 2 (AGO 2) que foi recrutada pela TRBP, no qual as duas cadeias de RNA se separam (4, 17-19). Uma das cadeias vai sofrer degradação, e a cadeia complementar vai permanecer associada ao complexo RISC, formando assim o miRNA

na sua forma madura e funcional (4, 18, 19). Na figura 1 está representado o esquema da biogênese de miRNAs.

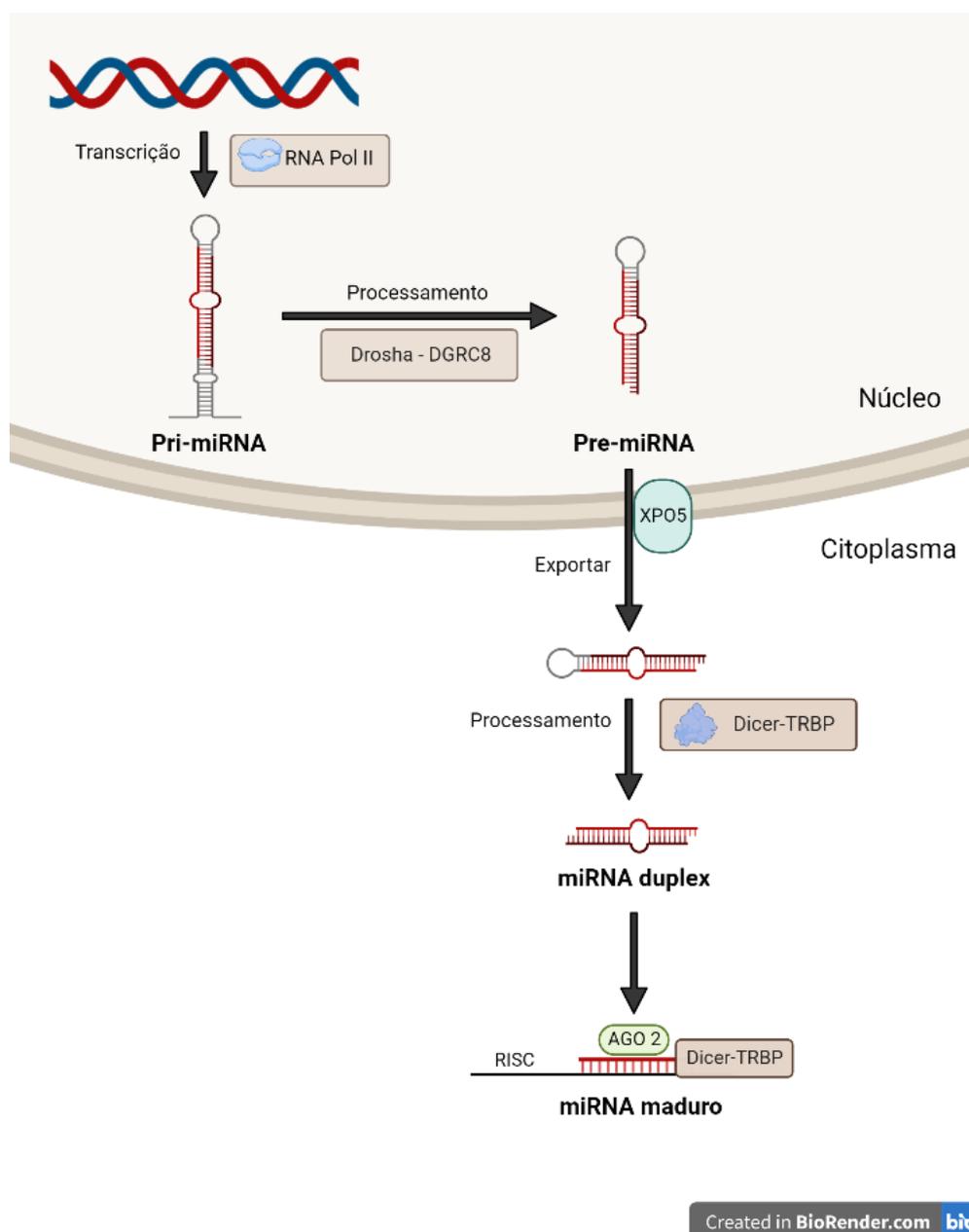


Figura 1. Representação esquemática da biogênese de microRNAs. (Figura criada no programa BioRender e exportada em outubro de 2022)

Dependendo do grau de complementaridade do miRNA com o mRNA alvo, o miRNA maduro vai originar a degradação de mRNAs alvo, se a complementaridade for total, ou bloquear a tradução proteica, se a complementaridade for parcial (4, 17, 18, 20), como observado na figura 2.

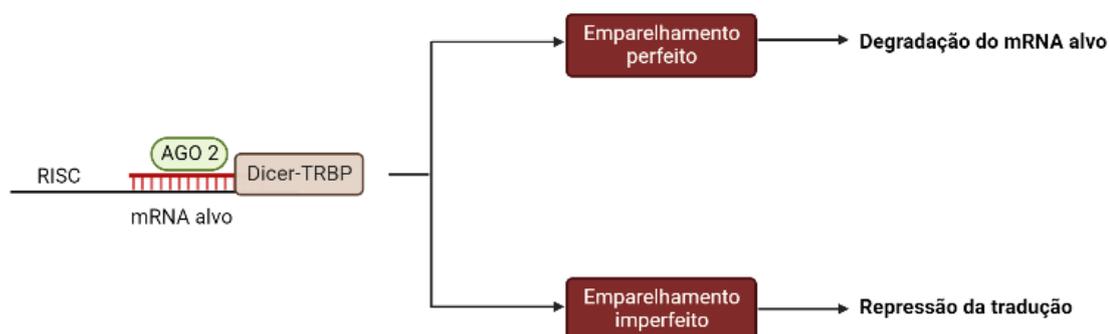
Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Figura 2. Mecanismo de ação dos miRNAs. (Figura criada no programa BioRender e exportada em outubro de 2022)

Atualmente, admite-se que os miRNAs estão envolvidos em todos os processos fisiológicos, regulando a proliferação e diferenciação celular, a apoptose, o metabolismo, o ritmo circadiano, o envelhecimento celular, o sistema imunitário e a homeostasia da glicose, entre outros (19, 20). De salientar, que os miRNAs têm uma expressão dinâmica, podendo esta ser modulada por diferentes fatores ambientais, sendo possível que cada miRNA regular mais de 100 mRNAs diferentes (17, 20).

Os primeiros miRNAs a serem descobertos foram o lin-4, em 1993 em *Caenorhabditis elegans* (21) e em 2000 o segundo, let-7, na mesma espécie (22). Desde então, muitas sequências de miRNA foram descritas em vertebrados, moscas, vermes, vírus e plantas (4, 23). Atualmente, associa-se que os miRNAs estão envolvidos numa enorme variedade de processos biológicos, apresentando um padrão tecidual específico, assim como a sua desregulação também pode estar associada a diversas patologias (19, 23-25).

1.2. MicroRNAs como potenciais biomarcadores de identificação de fluídos biológicos

Nos últimos anos, os miRNAs têm sido considerados potenciais biomarcadores úteis na identificação de fluidos biológicos, o que nas ciências forenses pode constituir uma extraordinária ferramenta útil para as investigações (2, 26). Os biomarcadores são entidades passíveis de serem experimentalmente medidas e conseguem indicar a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica de um organismo, assim como uma resposta a um agente farmacológico (27). Um biomarcador genômico é definido como uma molécula de DNA e/ou RNA característico que pode ser medido e que é indicador de um processo biológico normal, e/ou de resposta a uma terapêutica (27). A identificação de fluídos biológicos através de biomarcadores específicos para cada fluído é essencial para auxiliar na distinção de fluídos biológicos em casos de amostras de mistura que se encontram muitas vezes presentes em cenários de crime reais (28).

Os miRNAs apresentam um padrão de alta especificidade entre tecidos e tipos de fluidos biológicos, o que os torna um alvo atraente de estudo. A sua natureza pequena torna-os estáveis, mesmo quando expostos a diferentes fatores ambientais, o que pode ser uma vantagem na análise de amostras forenses degradadas e expostas a diferentes fatores (6, 26, 29).

De facto, diversos autores têm mostrado que é possível estabelecer diferentes perfis de miRNAs que podem ser ferramentas auxiliaadoras na identificação de amostras de sangue (11, 29-32). Num estudo realizado por Hanson e colaboradores em 2009, os autores demonstraram que elevados níveis dos hsa-miRNA-16 e hsa-miRNA-451 estavam presentes em amostras de sangue (11). Neste estudo, a expressão de 452 miRNAs foi analisada em amostras de sangue, sêmen, saliva, secreções vaginais e sangue menstrual. Os autores verificaram que nove miRNAs têm potencial para serem utilizados na discriminação desses fluídos biológicos, utilizando apenas 50 pg de RNA total recuperado. Esses autores propuseram o uso dos seguintes perfis hsa-miR-451/hsa-miR-16, hsa-miR-658/hsa-miR-205, hsa-miR-135b/hsa-miR-10b, hsa-miR-124a/hsa-miR-372 e hsa-miR-412 para a identificação de amostras de sangue, saliva, sêmen, secreções vaginais e sangue menstrual, respetivamente (11). Um ano depois, Zubakov e colaboradores também analisaram 718 miRNAs em amostras de saliva, sangue venoso, sangue menstrual, sêmen e secreções vaginais de seis voluntários (3 mulheres e 3 homens) e destacaram quatro miRNAs para identificação de sangue e cinco miRNAs para identificação de sêmen. Desses 9 miRNAs, eles destacaram 2 miRNAs específicos

de sangue, os hsa-miR-144 e hsa-miR-1185, e outros dois específicos de sêmen, os hsa-miR-135a e hsa-miR-891a. Tais resultados, demonstraram o potencial de aplicação destes perfis na identificação de fluídos biológicos nas ciências forenses (30).

Courts e Madea, em 2011, aumentaram o número de miRNAs analisados para 800 miRNAs, estudando os níveis destes em amostras forenses de sangue e saliva (31). Estes autores, observaram elevados níveis dos hsa-miR-126, hsa-miR-150 e hsa-miR-451 em amostras de sangue e dos hsa-miR-200c, hsa-miR-203 e hsa-miR-205 em amostras de saliva (31). Posteriormente, Wang e colaboradores, em 2015, validaram a utilização dos miRNAs previamente mencionados em amostras de saliva, verificando que os hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a e hsa-miR-205-5p apresentavam uma expressão elevada em amostras de saliva, assim como os hsa-miR-658, hsa-miR-138-2, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-206 e hsa-miR-639. Apesar da expressão elevada não eram miRNAs específicos de saliva (26).

Noutro estudo, Wang e colaboradores, analisaram 754 miRNAs em diversos fluídos biológicos e conseguiram identificar 5 miRNAs específicos com elevada sensibilidade em fluídos biológicos (33). Os hsa-miR-16 e hsa-miR-486 são úteis para a identificação de sangue venoso, os hsa-miR-888 e hsa-miR-891 para a identificação de sêmen e o hsa-miR-214 para a identificação de sangue menstrual. No entanto, não lhes foi possível identificar miRNAs específicos para identificar saliva ou secreções vaginais (33).

Nos últimos anos observamos um aumento dos miRNAs estudados como é o caso de Park e colaboradores que analisaram 1700 miRNAs, e observaram que oito dos miRNAs apresentam a capacidade de serem utilizados como potenciais biomarcadores de fluídos biológicos. De facto, os hsa-miR-484 e hsa-miR-182 são abundantemente expressos em amostras de sangue, os hsa-miR-223 e hsa-miR-145 presentes em amostras de saliva, os hsa-miR-2392 e hsa-miR-3197 presentes em amostras de sêmen e os hsa-miR-1260b e hsa-miR-654-5p em amostras de secreções vaginais (29).

Num estudo realizado por Sauer e colaboradores, foi identificado que os hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR135-5p e hsa-miR-891a-5p são altamente expressos no sêmen em comparação com outros fluídos biológicos, mas apenas o hsa-miR-891a-5p é descrito como um biomarcador específico de sêmen (28). Os autores também verificaram que os níveis de expressão dos hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p e hsa-miR-451a são promissores permitindo a distinção de amostras sanguíneas e não sanguíneas. Contudo, não foram capazes de determinar marcadores específicos de sangue menstrual e sangue

venoso. Para além disso, a identificação de saliva e secreções vaginais mostrou-se difícil, pois não foi possível detetar biomarcadores específicos para cada um (28).

Sirker e colaboradores analisaram 15 miRNAs no sangue, saliva, sémen, secreções vaginais, sangue menstrual e pele, onde usaram quatro controlos endógenos para normalizar a análise dos dados e identificaram cinco miRNAs, hsa-miR-10b, hsa-miR-203, hsa-miR-374, hsa-miR-451 e hsa-miR-943 (32). Os resultados indicaram que a especificidade de um determinado marcador depende da comparação do conjunto de amostras analisadas e dos seus procedimentos, como metodologias de deteção, procedimentos de normalização e miRNAs escolhidos, etc. (32).

No estudo de Mayes e colaboradores, os autores sugeriram utilizar os hsa-miR-891a e hsa-miR-10b como indicadores para a presença de sémen, a presença dos hsa-miR-451a e hsa-miR-141-3p e a ausência do hsa-miR-142-3p para indicar a presença de sangue menstrual, e a presença dos hsa-miR-142-3p e hsa-miR-205 e a ausência de todos os outros marcadores para indicar a presença da amostra de saliva (6). Recentemente, em 2020, He e colaboradores analisaram a expressão de 10 miRNAs em cinco fluídos biológicos: sangue periférico, sangue menstrual, sémen, saliva e secreções vaginais, num total de 350 fluídos biológicos (70 de cada fluído). Estes autores verificaram que apesar de alguns miRNAs serem descritos como específicos de determinado fluído, alguns deles apresentam níveis de expressão em diferentes fluídos sendo que os autores detetaram que nove miRNAs, hsa-miR-451a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-203-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-888-5p, hsa-miR-891a-5p, hsa-miR-124a-3p, tiveram uma elevada expressão em todos os fluídos analisados (9).

É de salientar que ainda existem poucos estudos que incidem na deteção de miRNAs específicos em amostras de saliva, pelo contrário, a grande maioria dos estudos foca-se na determinação de miRNAs específicos de sangue e sémen, como podemos observar na tabela 1 que apresenta miRNAs expressos em diferentes fluídos biológicos descritos na literatura, com importância nas ciências forenses.

Tabela 1. microRNAs expressos nos fluídos biológicos mais frequentemente estudados no âmbito das ciências forenses.

MicroRNAs expressos em Fluídos Biológicos				
Sangue	Saliva	Sémen	Secreções Vaginais	Sangue Menstrual
hsa-miR-16, hsa-miR-126, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a, hsa-miR-126; hsa-miR-484; hsa-miR-486, hsa-miR-150, hsa-miR-185, hsa-miR-451, hsa-miR-451a, hsa-miR-144, hsa-miR-182, hsa-miR-219, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-144-5p	hsa-miR-26a, hsa-miR-135b, hsa-miR-145, hsa-miR-182, hsa-miR-622, hsa-miR-639, hsa-miR-200c, hsa-miR-203, hsa-miR-205, hsa-miR-381, hsa-miR-431, hsa-miR-658, hsa-miR-223, hsa-miR-206	hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-17, hsa-miR-29b-2, hsa-miR-135a, hsa-miR-644, hsa-miR-891a, hsa-miR-888, hsa-miR-135b, hsa-miR-340, hsa-miR-380, hsa-miR-507, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-943, hsa-miR-2392, hsa-miR-3197, hsa-miR-891	hsa-miR-124a, hsa-miR-372, hsa-miR-617, hsa-miR-1260b, hsa-miR-654-5p	hsa-miR-144, hsa-miR-185, hsa-miR-412, hsa-miR-451, hsa-miR-214

Contudo, podemos ver que existe uma variação dos resultados nos diferentes estudos e isto pode derivar do facto de ainda não existir uma técnica standard para a análise das amostras, nomeadamente no que diz respeito aos métodos de recolha e processamento das amostras, o que dificulta a comparação de resultados entre estudos. Deste modo, a criação de uma técnica standard para utilização universal, assim como uma uniformização dos métodos de recolha e do processamento das amostras é essencial para que seja possível a replicação e comparação de resultados entre estudos e para que haja uma maior contribuição na área das ciências forenses.

De facto, a aplicação da análise de miRNAs constitui um crescente interesse na área das ciências forenses. Vários miRNAs têm sido aplicados não apenas na identificação de fluídos biológicos, mas também na determinação de causa da morte, na exposição a drogas e fármacos, na determinação do intervalo *post-mortem* ou como marcadores do ritmo circadiano (3).

1.2.1. MicroRNAs como biomarcadores salivares

Recentemente, os investigadores começaram a focar-se na análise de amostras de saliva em comparação com outros fluídos biológicos como sangue e urina, uma vez que estes são encontrados com muita frequência em diferentes cenários criminais e civis (7, 34, 35).

As amostras de saliva apresentam, também, um enorme potencial de serem utilizadas como fonte de material genético, permitindo a análise de perfis de DNA, com a vantagem de serem colhidas por método não invasivo, fácil, rápido, sem risco de

contaminação para o operador envolvido no procedimento de colheita, através de métodos mais económicos (7, 34, 35).

A saliva é um fluido biológico frequentemente encontrado em mordeduras, impressões labiais, pontas de cigarro, copos, garrafas, latas de refrigerantes, pastilhas elásticas e selos ou envelopes (7). Os adultos saudáveis produzem aproximadamente 500-1500 mL de saliva por dia ou entre 0-6 mL por minuto (36). Constituindo uma importante fonte de diverso tipo de informação no âmbito das ciências forenses. Um exemplo da aplicação do seu potencial é nos casos de mordeduras de animais, pois a sua análise permite através da determinação do perfil genético específico do causador da mordedura, identificar a espécie a que pertence. Por outro lado, a análise da saliva também é útil em casos de envenenamentos e/ou intoxicações por metais pesados, bem como para determinar o consumo e abuso de drogas e álcool pois algumas das técnicas analíticas toxicológicas atualmente usadas baseiam-se na análise de pequenas quantidades de saliva (7, 37).

Um dos principais problemas associados à análise de saliva são as amostras secas presentes em pele, roupas ou outros objetos físicos (35, 37). Na realidade, os métodos tradicionais utilizados para identificação de manchas de saliva secas envolvem técnicas químicas e enzimáticas, com taxas de sensibilidade dependentes do tempo e da quantidade após a deposição da amostra (35). Outras técnicas incluem a luz ultravioleta e espectroscopia de laser e fluorescência que são amplamente utilizadas na deteção de manchas de saliva na pele (35).

De acordo com a literatura, existem miRNAs identificados com potencial para serem utilizados como biomarcadores de amostras de saliva. No estudo realizado por Wang e colaboradores, nenhum dos oito miRNAs analisados podem ser usados como específicos de saliva, mas os hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a e hsa-miR-205-5p apresentam níveis mais elevados na saliva do que nos outros fluidos (26). Posteriormente, Wang e colaboradores analisaram a expressão de 2588 miRNAs em cinco amostras de sangue e cinco amostras de saliva e identificaram seis miRNAs de sangue e dezanove miRNAs específicos de amostras de saliva (38).

Concordantemente, Courts e Madea em 2011 e Wang e colaboradores em 2015, verificaram que os hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-203a e hsa-miR-205-5p apresentavam uma expressão elevada em amostras de saliva comparativamente a outros miRNAs analisados (26, 31).

Em vários outros estudos que se centram na deteção de miRNAs como biomarcadores de fluidos biológicos, verificam que o hsa-miR-205 e o hsa-miR-203a são

altamente expressos em amostras de saliva comparativamente a outros fluídos biológicos (6, 9, 11, 26, 28, 31).

De salientar, que de acordo com a literatura, existem miRNAs com alta expressão em amostras de saliva, mas muitos deles não são exclusivamente específicos de saliva. Contudo, há necessidade de ter em conta que para se considerar um biomarcador específico, este deve apresentar uma expressão mais elevada num determinado fluído em comparação com os restantes fluídos biológicos (39). Por esses miRNAs possuírem uma alta expressão faz com que ajude em algumas questões legais, como a variação temporal de uma determinada amostra depositada em diferentes locais.

É importante realçar através da análise da literatura, que não é conveniente considerar a análise dos miRNAs de modo isolado, mas sim devem ser estabelecidos perfis combinados de expressão que permitam melhorar a sensibilidade e especificidade destes como biomarcadores na área das ciências forenses.

1.3. Ritmo circadiano e os seus mecanismos moleculares

Tal como foi previamente mencionado, os miRNAs regulam processos fisiológicos chave, sendo a sua expressão influenciada por diferentes fatores de que é exemplo a exposição ambiental. Deste modo, é plausível assumir que os níveis destes podem ser associados a diferentes exposições. Um exemplo é a ingestão de licopeno que está associada a uma diminuição do hsa-miR-20a ou do hsa-miR-126 ou a ingestão de selénio associada a um aumento do hsa-miR-645 (40). Num estudo de Marçola e colaboradores, identificaram os hsa-miR-1249 e hsa-miR-129-2-3p como altamente expressos em células diurnas, e os hsa-miR-182, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-146a-3p, hsa-miR-146a-5p e hsa-miR-223-3p foram altamente expressos em celas noturnas de rato (41).

A cronobiologia estuda o funcionamento e regulação dos relógios biológicos, isto é, faz uma relação entre o tempo cronológico (rotação da Terra em torno do seu próprio eixo) e o ritmo biológico dos organismos, assim como os efeitos que resultam da desregulação entre ambos, de que é exemplo a desregulação do sono (42).

O ser humano apresenta diferentes ritmos biológicos endógenos, os ritmos ultradianos, os ritmos infradianos e os ritmos circadianos (43), sendo que estes últimos são ritmos que ocorrem durante 24h, de acordo com o tempo de rotação da Terra em torno do seu próprio eixo (44). Estes ritmos biológicos controlam várias características fisiológicas, cognitivas, emocionais e comportamentais e o desajuste desses ritmos

circadianos leva a efeitos prejudiciais na saúde (44, 45). São exemplo desses ritmos circadianos: o ciclo claro/escuro, a produção hormonal, a regulação da temperatura corporal e a pressão arterial. A produção hormonal é considerada um dos marcadores biológicos de ritmo circadiano mais estudados, como é o caso das hormonas melatonina e cortisol (46).

Os organismos vivos são caracterizados por mudanças cíclicas de vários processos no metabolismo, fisiologia e atividade comportamental, tendo o ritmo circadiano um papel crucial na adaptação a estímulos ambientais em constante mudança (47). As suas alterações rítmicas ou aleatórias possuem a capacidade de redefinir ou ativar os relógios centrais e periféricos internos, e por isso, fatores do estilo de vida, como dieta rica em gorduras, baixa atividade física, sono curto, hábitos tabágicos ou alcoólicos, e também fatores ocupacionais como trabalho em turnos noturnos, podem resultar na interrupção da ritmicidade do relógio circadiano (47).

Nos mamíferos, o sistema do relógio circadiano depende de múltiplos osciladores. A maioria dos ritmos circadianos são regulados pelo sistema nervoso central (SNC), contudo existem os chamados osciladores circadianos periféricos que são vários órgãos e tecidos corporais que geram ritmos circadianos independentes (48). Esse sistema é liderado por um relógio principal, que coordena todos os relógios biológicos do organismo e encontra-se numa estrutura designada de núcleo supraquiasmático (NSQ) (45, 49). O NSQ situa-se no hipotálamo anterior, está estrategicamente posicionado para ter conexões neuronais com a retina (42, 50).

O ritmo circadiano é baseado em mecanismos celulares, regulados por vários genes relógio, como os que codificam ativadores transcricionais, repressores e enzimas de modificação, e em mecanismos moleculares, formando *loops de feedback* de transcrição-tradução interligados que produzem ritmos cíclicos envolvendo vários genes e as suas proteínas com um período intrínseco próximo a 24h (47, 49, 51).

Os principais genes envolvidos nos mecanismos do relógio são o CLOCK e o BMAL1 que são caracterizados como reguladores positivos, e os PER e CRY, caracterizados como reguladores negativos (42, 47, 49, 51).

No primeiro *feedback loop*, os genes CLOCK e BMAL1 ligam-se, formando um heterodímero que tem como principal função a ativação da transcrição de genes alvo. No núcleo ligam-se a elementos E-box que vão aumentar e controlar a transcrição dos genes que codificam os CRY e PER. As proteínas CRY e PER acumulam-se a um nível crítico e formam complexos com heterodímeros CLOCK/BMAL1 onde vão ter a função de inibir ativadores de transcrição desses genes. Antes de ser iniciado um novo ciclo, o

heterodímero CLOCK/BMAL1 é reativado ao diminuir os níveis de produção das proteínas CRY e PER até se tornarem insuficientes para reprimir a atividade de CLOCK/BMAL1 (51, 52). Por outro lado, no segundo *feedback loop*, os ROR e os REV-ERB, através da ligação competitiva ao RORE na região do promotor do BMAL1, têm capacidade de ativar ou reprimir, respetivamente, a expressão proteica e a atividade do fator de transcrição BMAL1 (51).

1.3.1. Importância do ritmo circadiano para as ciências forenses

O cortisol é extremamente importante no ritmo circadiano pois é capaz de afetar quase todos os tecidos e órgãos do corpo humano, e controla determinadas funções cíclicas biológicas (53). Após o despertar, o pico de cortisol pode desempenhar um papel específico na sincronização do corpo numa série de processos biológicos para os ciclos sono-vigília e claro-escuro. Para além disso, os ritmos circadianos transcrevem a mensagem da hora do dia para o sistema imunológico, principalmente a via do cortisol, sendo que a variação dos níveis de cortisol durante o dia e a noite pode auxiliar na explicação da função do cortisol na saúde e nas doenças (53).

O cortisol é um produto final do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Quando o hipotálamo é estimulado há libertação da hormona libertadora de corticotrofina (CRH), desencadeando a glândula pituitária a libertar a hormona adrenocorticotrófica (ACTH), que estimula a secreção de cortisol pelo córtex da glândula adrenal (54). O eixo HPA autorregula-se por meio de *feedback* negativo, o que significa que níveis circulantes elevados de cortisol suprimem a secreção de CRH e ACTH, diminuindo assim a libertação de cortisol. O cortisol circula no sangue nas formas ligada e livre; a forma ligada é na sua maioria ligada à globulina de ligação a corticosteroides (CBG), contudo uma pequena quantidade é fracamente ligada à albumina, sendo o restante livre (54).

O cortisol é uma hormona corticosteroide produzida pela glândula suprarrenal e está diretamente envolvido na resposta ao stress e ao controlo da via do eixo neuro endócrino do hipotálamo-hipófise-adrenal (ritmo circadiano). É uma hormona essencial para a manutenção da homeostase (55). A hormona apresenta uma oscilação circadiana característica, aumentando a sua atividade no organismo logo no despertar (46, 54).

Segundo a literatura, num indivíduo saudável, os níveis de cortisol apresentam concentrações mais elevadas pela manhã, logo ao acordar, e ao longo do dia vão diminuindo, atingindo um valor mínimo durante a noite, independentemente do sexo (46,

54). O pico mais elevado é por volta das 8 horas, sendo verificada uma diminuição por volta das 15 horas e atinge o valor mais baixo por volta da meia-noite (46, 54) (Figura 3).

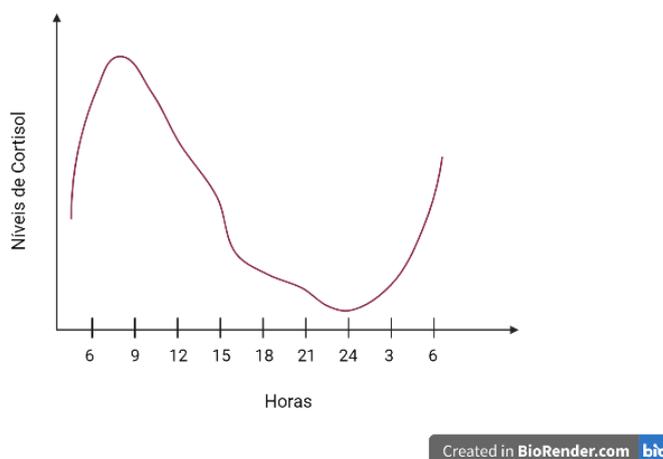


Figura 3. Representação gráfica dos níveis de cortisol ao longo do dia. (Figura criada no programa BioRender e exportada em outubro de 2022)

Contudo, é necessário estar ciente da existência de patologias, como é o caso da Síndrome de Cushing onde há uma elevada concentração de cortisol no sangue, que fazem com que não seja possível observar a variação circadiana (56), assim como indivíduos com trabalhos noturnos que também apresentam uma variação dos níveis de cortisol diferente do normal (57).

Atualmente, sabemos que diversos miRNAs se encontram envolvidos na via de produção do cortisol (55). Assim, a análise da expressão de miRNAs que regulam os relógios endógenos, envolvidos na regulação do ritmo circadiano, pode ser uma ferramenta de análise útil para estimar determinados eventos, como a hora do dia em que determinada amostra foi depositada num local, o que representa informações essenciais na resolução de um caso, ou por exemplo na estimativa do intervalo *post-mortem*. Assim como os ritmos biológicos endógenos, de exemplo a produção hormonal de cortisol, os miRNAs também podem apresentar oscilações ao longo do dia e, portanto, estudar a sua expressão ao longo do tempo é muito útil para estabelecer um padrão temporal e com isso é possível associar o momento em que um determinado evento ocorreu com um momento do dia. Até ao momento, existem alguns estudos que analisam os miRNAs no humor vítreo humano (58), mas nenhum na análise de tecidos sólidos humanos para a identificação de microRNAs circadianos.

Odriozola e colaboradores realizaram um estudo em 7 amostras onde foram detetadas diferenças significativas na expressão de alguns miRNAs entre indivíduos que morreram durante o dia e indivíduos que morreram durante a noite (59). Estes replicaram o estudo em 34 amostras de humor vítreo e as diferenças entre mortes ocorridas durante o dia e as ocorridas durante a noite foram confirmadas nos hsa-miR-142-5p e hsa-miR-541, sugerindo assim que os níveis de expressão podem estar relacionados à luz e ao ritmo circadiano, sendo que esses miRNAs obtiveram níveis de expressão mais elevados em mortes durante a noite do que em mortes durante o dia (59).

Posteriormente, Lech e colaboradores estudaram esses mesmos miRNAs (hsa-miR-142-5p e hsa-miR-541) em amostras de sangue por ser um fluido biológico muito relevante em casos forenses, mas não obtiveram um bom resultado, não sendo possível estimar o tempo de deposição desse fluido biológico (60).

No estudo de Corradini e colaboradores foram utilizadas 12 amostras de humor vítreo e 12 amostras de sangue de indivíduos que morreram durante o dia ou durante a noite, e analisaram 10 microRNAs descritos na literatura com papel no ritmo circadiano (incluindo os hsa-miR-142-5p e hsa-miR-541) (61). Foi observada uma diferença significativa na expressão entre indivíduos que morreram durante o dia e indivíduos que morreram durante a noite em quatro microRNAs, sendo os hsa-miR-106b e hsa-miR-96 no humor vítreo e os hsa-miR-142-5p e hsa-miR-219 no sangue (61).

Deste modo, o estudo da variação circadiana dos níveis de expressão de miRNAs salivares associado aos níveis de cortisol salivar, ao longo das 3 fases do ciclo (manhã, tarde e noite), parece ser uma abordagem promissora para encontrar um padrão de oscilação desses miRNAs ao longo do dia e, conseqüentemente, auxiliar na resolução de casos criminais que incluam a análise de saliva.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

Análise da dinâmica da expressão de um perfil de miRNAs salivares ao longo do dia e a sua estabilidade após deposição em diferentes tipos de suporte físicos.

2.2. Objetivos específicos

- Definição do perfil de miRNAs expressos na saliva por revisão da literatura científica;
- Preparação de cenários experimentais, através da deposição de amostras de saliva em diferentes suportes físicos, nomeadamente pontas de cigarro e plástico;
- Recuperação de amostras de saliva dos diferentes suportes, previamente mencionados e análise da expressão do perfil de miRNAs definido e dos controlos endógenos hsa-let-7a-5p, hsa-miR-16-5p, RNU48 e RNU6b em diferentes intervalos de tempo;
- **Avaliação da dinâmica da expressão do perfil de miRNAs salivares definido ao longo do dia (período de 24 horas) e sua associação com os níveis de cortisol como marcador do ritmo circadiano.**

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Seleção do perfil de microRNAs alvo de estudo

Os miRNAs a serem englobados no perfil de estudo foram selecionados após uma revisão de literatura com recurso às plataformas Pubmed, Web of Science e Google Scholar. Como palavras-chave foram utilizados os termos: “microRNA in forensic science”, “microRNA biomarkers in forensic body fluids”, “saliva identification with microRNA”, “salivary microRNA in forensic science”. Como critério de inclusão no perfil de miRNAs salivares definidos foram selecionados os miRNAs caracterizados como específicos de saliva e/ou miRNAs com uma elevada expressão em amostras de saliva (Tabela 2) e como critério de exclusão foram descartados os miRNAs que não foram detetados anteriormente em amostras de saliva.

Tabela 2. MicroRNAs selecionados para o estudo.

Perfil de microRNAs salivares alvo de estudo
hsa-miR-10a-5p
hsa-miR-16-5p
hsa-miR-24-3p
hsa-miR-126-5p
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-29a-3p
hsa-let-7a-5p
RNU6b
RNU48

De acordo com os objetivos definidos, o estudo foi dividido em 2 Fases: Fase 1, onde se recriou cenários reais através da deposição de amostras de saliva, em diferentes tempos, em pontas de cigarro e plástico, seguido da recuperação e extração de miRNAs; e a Fase 2 em que se avaliou a dinâmica dos níveis de expressão dos miRNAs ao longo do dia e sua associação com os níveis de cortisol (figura 4). Na fase 2 optou-se por não se estudar todos os miRNAs analisados na fase anterior, tendo em conta os resultados obtidos na fase 1.

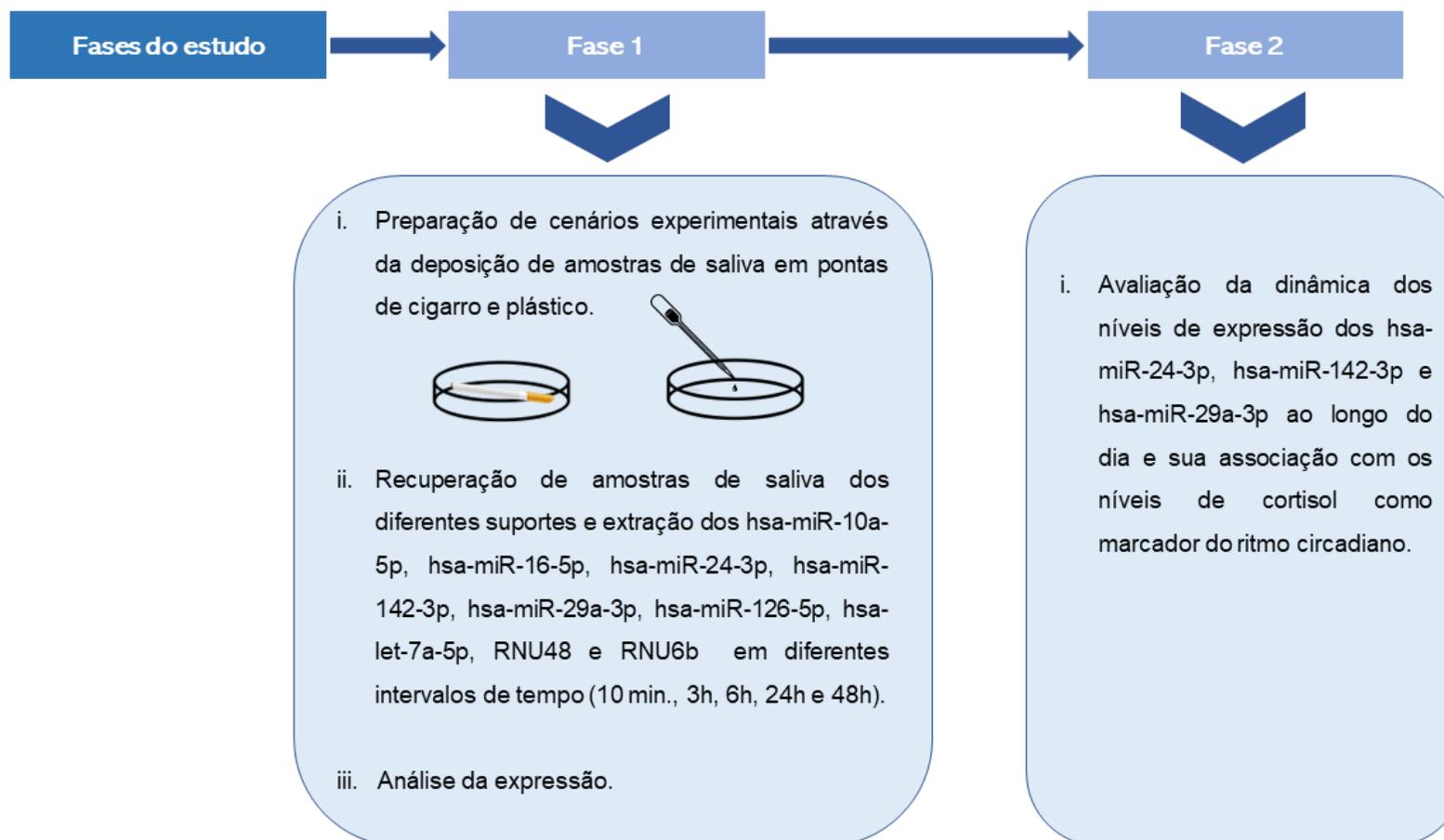


Figura 4. Desenho do estudo.

3.2. Fase 1

De forma a recriar cenários reais onde possam estar depositadas amostras de saliva, procedeu-se à recriação dos mesmos através da deposição de amostras de saliva obtidas de voluntários saudáveis, em pontas de cigarro e em plásticos, a partir das quais foram recuperados microRNAs.

Foram recrutados 4 indivíduos saudáveis (2 homens e 2 mulheres, com média de idade 29,3 anos) aos quais foi solicitada a dádiva voluntária de uma amostra de saliva no período da manhã. As amostras de saliva foram obtidas após consentimento informado escrito, de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia, tendo sido recolhido aproximadamente 5mL de saliva para um tubo de colheita. As amostras foram registadas e para cada uma atribui-se um código de forma que fossem aleatorizadas.

Processamento das amostras

Após a obtenção das amostras de saliva, estas foram depositadas nos dois suportes físicos, nomeadamente, o filtro de cigarro e a caixa de plástico. Foram utilizados um total de 4 suportes de plástico e 4 filtros de cigarro, sendo a amostra recolhida de cada um dos indivíduos distribuída por um suporte de plástico e um filtro de cigarro. Em cada suporte, depositou-se 200 µL de cada amostra 5 vezes para posterior extração de miRNAs após 10 minutos, 3 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas. Foi usado como plástico uma placa de petri, devidamente identificada e fechada sendo as amostras posteriormente identificadas como “Plástico- Protegido exposição ambiente”. Mais tarde, foram incluídas mais 4 caixas de petri sem tampa para as amostras de saliva depositadas no plástico expostas ao ambiente, tendo sido realizada a extração de miRNA após 24 horas e 48 horas, posteriormente designadas “Plástico – Exposição ambiente”. Adicionalmente, também foram extraídos de imediato os miRNAs das amostras de saliva de cada indivíduo. Na fase 1 foram analisadas um total de 52 amostras. Na figura 5 encontra-se representado o desenho do procedimento experimental da Fase 1.

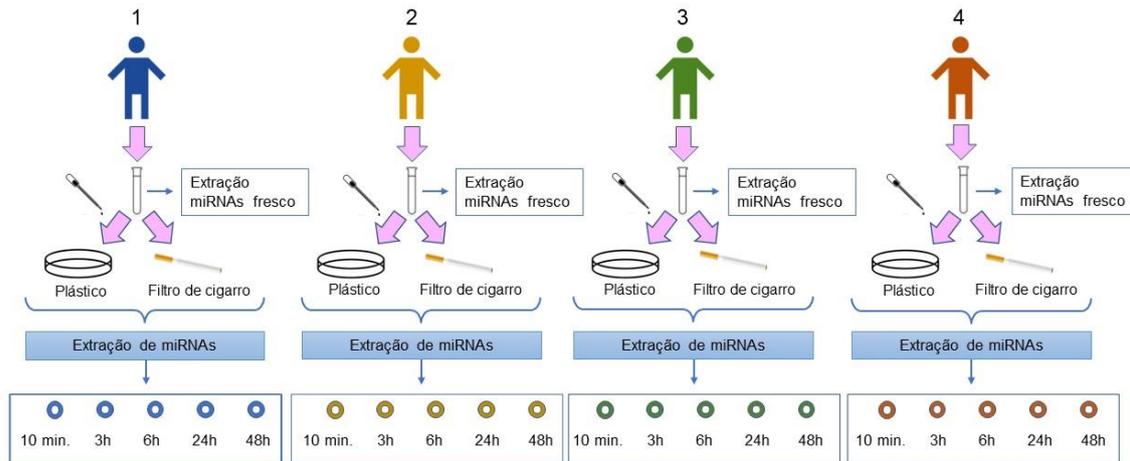


Figura 5. Desenho do Procedimento Experimental da Fase 1.

Para a extração de miRNAs, a partir de cada amostra depositada no suporte físico de plástico foi usada uma zaragatoa humedecida com um reagente de lise (disponível no *kit* usado para o procedimento) para recuperação da amostra representativa da saliva. Relativamente às amostras depositadas no filtro do cigarro, o filtro foi cortado em pequenos círculos de aproximadamente 2 mm com recurso a um bisturi, a partir dos quais se iniciou o procedimento de extração de miRNAs.

Extração de microRNAs

A extração de miRNAs das amostras de saliva foi realizada com recurso ao *kit* comercial *GRS microRNA Purification Kit (Grisp® Research Solutions)* de acordo com as recomendações do fabricante. Este *kit* fornece um método eficiente e rápido para a purificação de miRNAs, com uma contaminação mínima de grandes moléculas de RNA e DNA genómico. Após a extração, a avaliação da qualidade e quantidade do RNA recuperado foi avaliada pela medição da concentração e da pureza do RNA, a 260 nm e 280 nm através da utilização do espectrofotómetro *Nanodrop™ Lite* (Thermo Scientific®).

Síntese de cDNA e quantificação por PCR em tempo real

De seguida, procedeu-se à síntese de DNA complementar (cDNA) de interesse. A síntese de cDNA dos RNU6b e RNU48 foi realizada com recurso ao *Kit* comercial

TaqMan[®] *MicroRNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*[®]) utilizando as seguintes condições de amplificação adaptadas: 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 1 hora e 85°C durante 10 minutos. A síntese de cDNA dos restantes miRNAs foi realizada através do *Kit* comercial *TaqMan*[®] *Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (*Applied Biosystems*[®]). O *kit* comercial *TaqMan*[®] *Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (*Applied Biosystems*[®]) permite: a quantificação de miRNAs de baixa expressão, usar uma pequena quantidade de amostra inicial de RNA, contendo uma etapa em que uma *Reverse Transcriptase* universal sintetiza uma molécula de cDNA universal, simplificando assim o processo de síntese de cDNA.

A expressão do perfil de miRNAs selecionado foi analisada por PCR quantitativo em tempo real com recurso a sondas específicas para amplificar os miRNAs alvo. O PCR quantitativo em tempo real é um método quantitativo preciso, rápido e é altamente sensível na deteção da fluorescência. O PCR quantitativo em tempo real vai associar a metodologia de PCR a um sistema de deteção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. A reação é seguida em tempo real, permitindo a análise ciclo a ciclo devido à alteração do sinal de fluorescência em resultado da amplificação da sequência alvo, determinando para cada amostra utilizada o número de ciclos no qual a fluorescência acumulada cruza o limiar: o Ct (*Cycle Threshold*). Foram utilizadas as sondas *TaqMan*[®], as quais detetam sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Estas sondas apresentam um fluoróforo numa das extremidades e um *quencher* (molécula que absorve energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor) na outra e à medida que ocorre a extensão da DNA polimerase há uma quebra separando o *quencher* da molécula fluorescente o que faz com que haja um aumento da intensidade de fluorescência (62).

As reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas no aparelho *StepOne*[™] *qPCR Real-Time*, e foi utilizada uma mistura de reação com os seguintes componentes: H₂O, 1X *TaqMan*[®] *Fast Advanced Master Mix* (*Applied Biosystems*[®]), 1X sondas específicas para amplificar os miRNA alvo (*Taqman*[®] *microRNA Expression Assays*[®] e *Taqman*[®] *Advanced microRNA Assays*[®], hsa-miR-10a-5p (479241_miR, *Applied Biosystems*[®]), hsa-miR-16-5p (477860_miR, *Applied Biosystems*[®]), hsa-miR-24-3p (477992_miR, *Applied Biosystems*[®]), hsa-miR-142-3p (477910_miR, *Applied Biosystems*[®]), hsa-miR-29a-3p (478587_miR, *Applied Biosystems*[®]), hsa-miR-126-5p (477888_miR, *Applied Biosystems*[®]) e hsa-let-7a-5p (478575_miR, *Applied Biosystems*[®]) e os controlos endógenos RNU48 (TM: 001006, *Applied Biosystems*[®]), RNU6b (TM: 001093, *Applied Biosystems*[®]) e 5µL de amostra de cDNA. As

quantificações de miRNAs foram realizadas em duplicado e incluiu-se um controlo negativo em todas as reações.

3.3. Fase 2

Nesta fase foi analisado os níveis de expressão dos hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p ao longo do dia na saliva, juntamente com os níveis de cortisol a partir de amostras de saliva. A seleção destes microRNAs teve em conta os resultados da fase anterior. Os miRNAs hsa-miR-10a-5p e hsa-miR-126-5p não foram estudados, pois na fase 1 o primeiro apresentou uma fraca taxa de deteção, e o segundo não foi detetado em amostras de saliva.

Nesta fase do estudo, foram recrutados 20 indivíduos saudáveis, caucasianos (9 indivíduos do sexo masculino e 11 indivíduos do sexo feminino) oriundos do Norte de Portugal, com uma média de idades de 30,8 anos. Conforme a fase anterior, as amostras de saliva foram obtidas após consentimento voluntário e informado escrito e esclarecido, de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia.

Aos indivíduos englobados no estudo foi solicitada a recolha de 3 amostras de saliva ao longo do dia, ao início da manhã (\approx 8 horas), à tarde (\approx 15 horas) e à noite (\approx 24 horas), tendo sido a recolha realizada usando-se um *kit salivette*, dando um total de 60 amostras para análise. Adicionalmente, foi também entregue a cada participante uma nota informativa com a explicação do procedimento de colheita, assim como um pequeno questionário sobre hábitos e estilos de vida.

Processamento e análise molecular das amostras

As amostras de saliva foram centrifugadas durante 3 minutos a 2500 rpm. Após a centrifugação, recolheu-se de cada tubo 200 μ L de saliva para posterior extração de miRNAs e a restante amostra foi utilizada para quantificar os níveis de cortisol.

A extração de miRNAs foi realizada através do procedimento explicitado na fase anterior.

A síntese de cDNA de interesse foi realizada através do Kit comercial *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems®)* conforme explicitado na fase anterior.

A expressão do perfil de miRNAs selecionado foi analisada por PCR quantitativo em tempo real com recurso a sondas específicas para amplificar os miRNAs alvo. As reações foram realizadas da mesma forma que na fase anterior.

As quantificações de miRNAs foram realizadas em duplicado e incluiu-se um controlo negativo em todas as reações.

A quantificação dos níveis de cortisol salivar foi realizada no Serviço de Química Clínica do Departamento de Diagnóstico Laboratorial do IPO-Porto, de acordo com os procedimentos de rotina do mesmo. O teste utilizado foi o *ElecsysCortisol II® (Cobas®)*.

3.4. Análise estatística

A análise das curvas de amplificação foi realizada através do *StepOne™ Software v2.2 (Applied Biosystems®)* com a mesma linha de base e limite definido para cada placa, de forma a gerar valores de Ct para todos os miRNAs presentes em cada amostra.

Para a quantificação da expressão relativa de miRNAs, utilizou-se todos os valores de Ct para obter valores de ΔCt para cada um dos miRNAs analisados, utilizando o Método de *Livak* e *Schmittgen* com a fórmula (63):

$$\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA alvo}} - Ct_{\text{endógeno}}$$

De forma a avaliar a diferença dos níveis de expressão de miRNAs dos vários grupos analisados, calculou-se o *fold-change*, ou Método de *Livak* e *Schmittgen* através da fórmula (63):

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \Leftrightarrow \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_x - \Delta Ct_y$$

Por fim, a análise estatística foi realizada utilizando o software *IBM®SPSS®Statistics* para Windows (Version 27.0).

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Quantidade de RNA total recuperado nos diferentes suportes

A figura 6 mostra a quantificação de RNA total a partir das amostras de saliva, nos dois suportes testados, nos diferentes tempos analisados. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que no filtro de cigarro e no plástico protegido da exposição ambiente foi recuperada uma maior quantidade de RNA total às 24 horas, obtendo-se uma concentração de, aproximadamente, 169 ng/ μ L no filtro de cigarro e 184 ng/ μ L no plástico protegido da exposição ambiente. Nos restantes tempos de exposição podemos verificar que as concentrações são mais baixas e semelhantes entre si. No plástico exposto ao ambiente foi recuperado uma quantidade de RNA semelhante às 24 horas e às 48 horas, sendo muito menor do que as quantidades recuperadas a partir do plástico protegido da exposição ambiente.

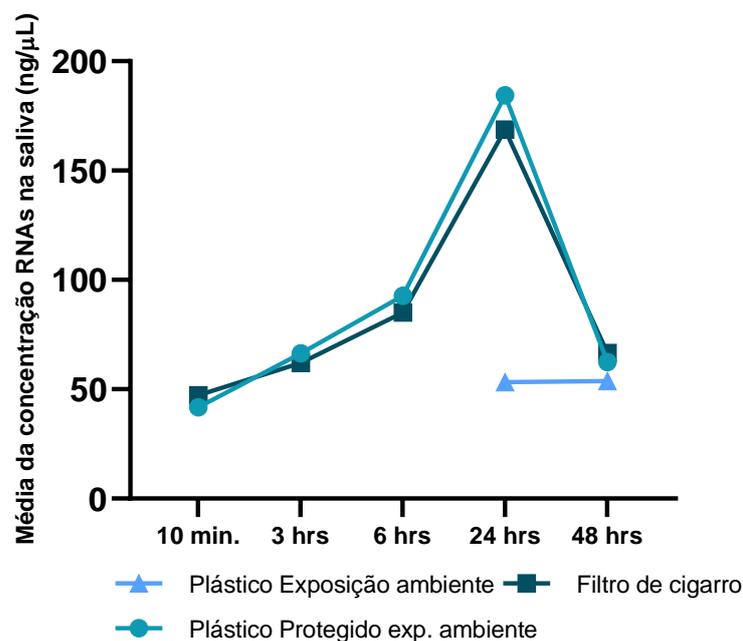


Figura 6. Detecção da quantidade de RNA total nos diferentes suportes ao longo do tempo de exposição.

4.2. Níveis de expressão dos miRNAs RNU48, RNU6b, hsa-let-7a-5p e hsa-miR-16-5p nos diferentes suportes

A figura 7 representa a média dos valores de Ct's dos RNU48, RNU6b, hsa-let-7a-5p e hsa-miR-16-5p, tendo sido quantificados de modo a se testar o seu potencial uso como controlos endógenos. O Ct é o número do ciclo em que o sinal fluorescente da reação cruza o limiar. O valor de Ct está inversamente correlacionado com a quantidade de ácidos nucleicos presentes na amostra: um Ct baixo corresponde a uma maior quantidade de ácidos nucleicos na amostra, enquanto que um Ct elevado é sinal de baixa quantidade de ácidos nucleicos presentes na amostra.

É possível observar, que foi possível amplificar todos os miRNAs nos dois suportes testados e nos vários tempos de exposição. Isto demonstra, também, a estabilidade das amostras ao longo do tempo de exposição e nos dois suportes, observando-se resultados mais semelhantes no plástico do que no filtro de cigarro.

É possível observar que existe diferenças da média dos valores de Ct's entre os miRNAs nos dois suportes, e todos os miRNAs apresentam valores diferentes nos diferentes tempos. Na caixa de plástico é possível observar resultados mais semelhantes comparativamente ao filtro de cigarro. O miRNA selecionado para ser utilizado como controlo endógeno e conseqüente usado na normalização dos resultados foi o hsa-miR-16-5p visto que apresenta uma menor variação entre os valores quando se analisa os dois suportes e os diferentes tempos.

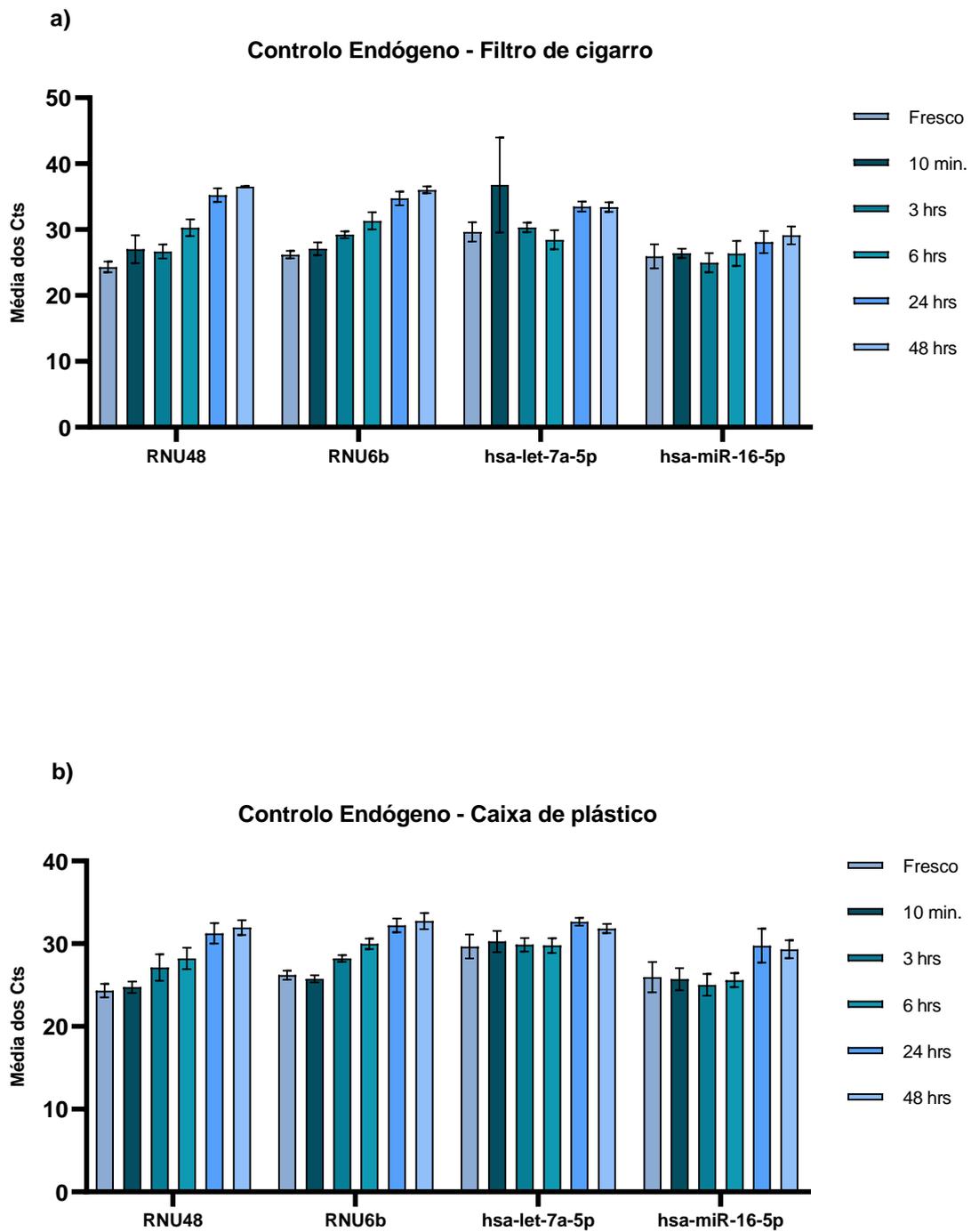


Figura 7. Média dos valores de Ct's dos RNU48, RNU6b, hsa-let-7a-5p e hsa-miR-16-5p no filtro de cigarro (a) e na caixa de plástico (b), nos diferentes tempos de exposição (10 minutos, 3 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas).

4.3. Frequência de detecção e nível de expressão do perfil de miRNAs salivar nos diferentes suportes

Ao analisar a frequência de detecção dos vários miRNAs, verificou-se que os hsa-miR-24-3p, hsa-miR-29a-3p e o hsa-miR-142-3p com uma maior frequência, comparativamente aos miRNAs hsa-miR-10a-5p e hsa-miR-126-5p. De facto, o hsa-miR-10a-5p teve uma baixa taxa de detecção e o hsa-miR-126-5p não foi detetado na saliva, o que fez com que a sua análise fosse excluída na fase 2.

A frequência de detecção do hsa-miR-24-3p foi de 100% em todos os tempos de exposição. O hsa-miR-142-3p apresentou uma taxa de detecção de 100% nas amostras de saliva a fresco, aos 10 minutos, 3 horas e 6 horas, havendo uma diminuição dessa taxa às 24 horas e 48 horas (91,6% e 83,(3)%, respetivamente). O hsa-miR-29a-3p também apresenta uma taxa de detecção de 100% em quase todos os tempos de exposição à exceção das 48 horas que diminuiu para 83,(3)%. O hsa-miR-10a-5p apenas foi detetado aos 10 minutos e às 3 horas apresentando uma taxa de detecção de 12,5% em ambos os casos.

Na figura 8 está representado os níveis de expressão relativa dos hsa-miR-24-3p, hsa-miR-29a-3p e hsa-miR-142-3p em amostras de saliva analisadas em diferentes tempos de exposição, nos dois suportes testados. Observou-se maior variação do nível dos miRNAs estudados no filtro de cigarro (Figura 8a), comparativamente ao observado no plástico (Figura 8b). Verificamos também, no filtro de cigarro, que todos os miRNAs apresentam uma variação ao longo do tempo de exposição ambiental, sendo o hsa-miR-142-3p que apresenta maiores níveis de expressão relativa e o hsa-29a-3p que apresenta os menores níveis de expressão relativa (Figura 8a).

No suporte plástico, o hsa-miR-24-3p é o miRNA que apresenta um nível de expressão mais estável e constante durante todos os tempos de exposição onde foi possível recuperar uma maior quantidade do miRNA às 48 horas comparativamente com as 24 horas e assim sucessivamente até à amostra a fresco, com exceção dos 10 minutos que a quantidade de miRNA recuperada é superior à quantidade recuperada às 3 horas (Figura 8b). O hsa-miR-29a-3p é o que apresenta menores níveis de expressão relativa.

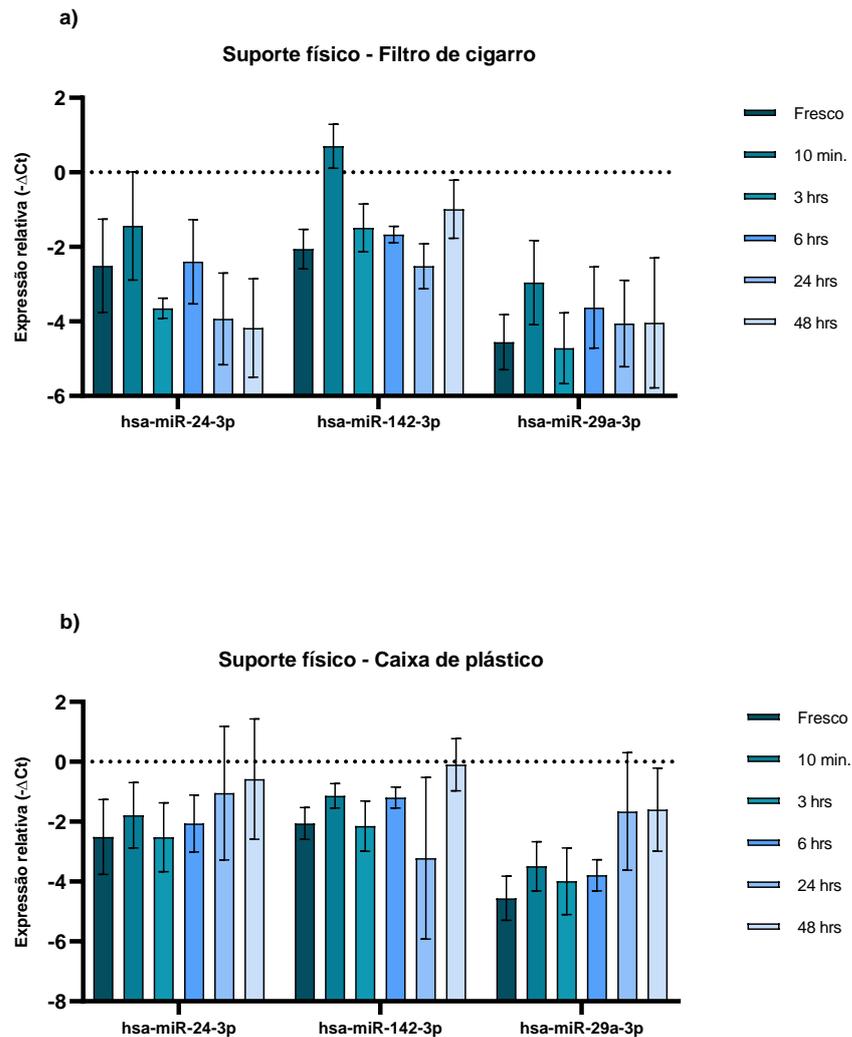


Figura 8. Níveis de expressão relativa dos hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p nos diferentes tempos de exposição, no a) suporte filtro de cigarro e no b) suporte caixa de plástico. (média \pm erro da média).

A figura 9 apresenta os níveis de expressão dos hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p no suporte plástico sem proteção ambiental e protegido às 24 horas e às 48 horas de exposição. Observamos que em ambas as condições, ao final de 48 horas é recuperado maior quantidade dos miRNAs em estudo.

Na figura 9 a) e c), que dizem respeito ao hsa-miR-24-3p e hsa-miR-29a-3p, respectivamente, apesar da expressão relativa às 48 horas ser superior às 24 horas nas duas condições, na exposição ambiente existe uma grande diferença entre os dois tempos de exposição (24h e 48h), comparativamente ao protegido da exposição ambiente. Na figura 9 b), hsa-miR-142-3p, a expressão relativa nos dois tempos de exposição da exposição ambiente é superior aos do protegido da exposição ambiente.

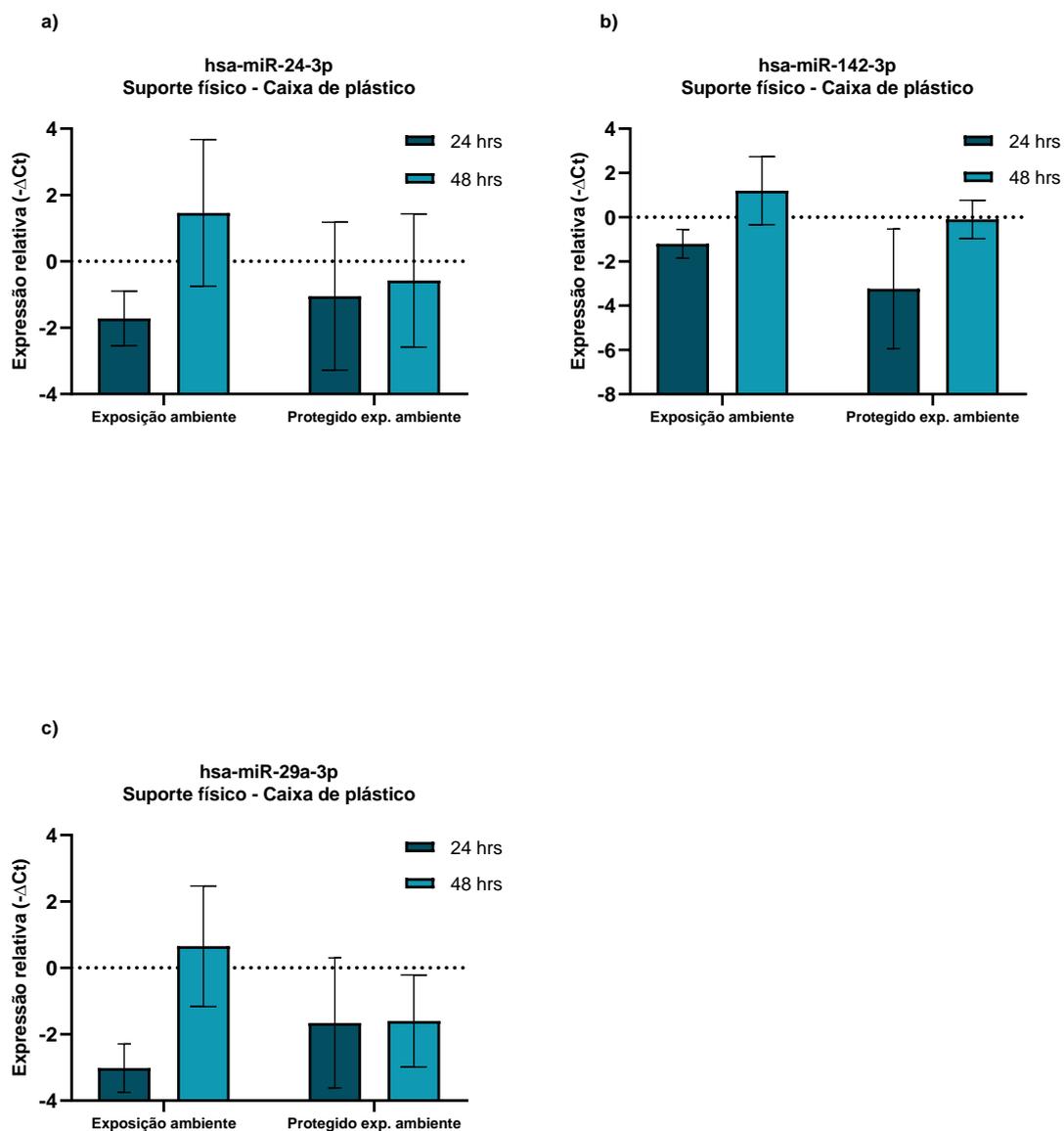


Figura 9. Níveis de expressão relativa dos hsa-miR-24-3p (a), hsa-miR-142-3p (b) e hsa-miR-29a-3p (c), às 24 horas e 48 horas na caixa de plástico- exposição ambiente e protegido da exposição ambiente (média \pm erro da média).

4.4. Variação circadiana da quantidade de RNA total e de cortisol

A figura 10 apresenta a quantidade de RNA total na saliva e os níveis de cortisol salivar ao longo do dia (manhã, tarde e noite). Observou-se que a concentração de RNAs na saliva no início da manhã é a mais baixa (86 ng/ μ L) aumentando ao longo da manhã até atingir o pico máximo à tarde (96 ng/ μ L) e diminui ligeiramente à noite (94 ng/ μ L). Os níveis de cortisol são mais elevados ao início da manhã (0,909 μ g/dL) e vão diminuindo durante a tarde (0,223 μ g/dL) até atingirem valores mínimos à noite (0,102 μ g/dL).

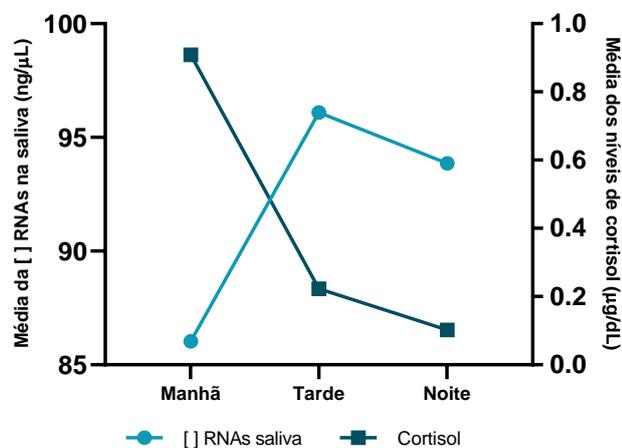


Figura 10. Quantidade de RNA total nas amostras de saliva e níveis de cortisol salivar ao longo do dia (manhã, tarde e noite).

4.5. Níveis de expressão dos miRNAs salivares ao longo do dia

A frequência de detecção dos hsa-miR-24-3p e hsa-miR-29a-3p foi igual ou superior a 85% em todos os momentos do dia (manhã, tarde e noite), enquanto a frequência de detecção do hsa-miR-142-3p foi mais baixa, variando de 65-75% ao longo do dia.

A frequência de detecção de todos os microRNAs foi mais elevada à noite e mais baixa ao início da manhã.

Verificamos que os níveis de expressão dos miRNAs incluídos no estudo apresentam a mesma tendência, apresentando os níveis mais baixos ao início da manhã, aumentando ao longo da manhã, ocorrendo um pico de expressão à tarde, seguida de uma diminuição à noite (Figura 11).

Quanto ao hsa-miR-24-3p, observamos um aumento dos níveis de expressão relativa na saliva à tarde (*Fold-change* 6,19 vezes, $P<0,001$), comparativamente ao início da manhã e à noite há um aumento de 2,28 vezes deste mesmo miRNA comparativamente à amostra colhida no período da manhã ($P=0,014$).

No hsa-miR-29a-3p, é possível observar um aumento dos níveis de expressão relativa à tarde de 16,45 vezes comparativamente ao início da manhã ($P<0,001$) e à noite tem um aumento de 6,02 vezes do miRNA na saliva em comparação com o início da manhã ($P<0,001$).

No que respeita ao hsa-miR-142-3p, verificamos, também, um aumento à tarde dos níveis de expressão relativa na saliva (*Fold-change* 50,21 vezes, $P<0,001$) em comparação com o início da manhã e um aumento de 23,59 vezes do miRNA na saliva à noite comparativamente ao início da manhã ($P<0,001$).

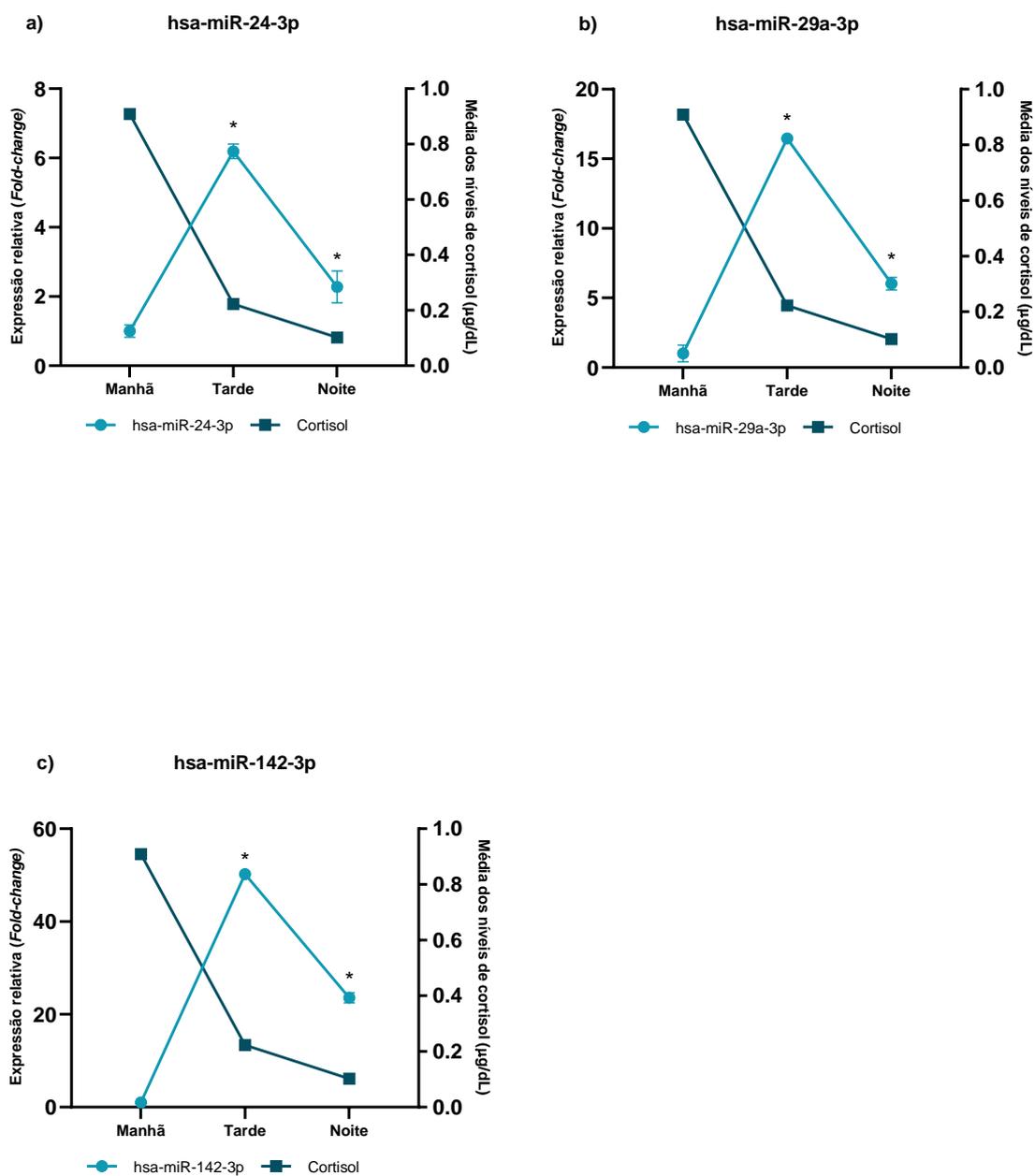


Figura 11. Expressão relativa (*Fold-change*) dos hsa-miR-24-3p (a), hsa-miR-29a-3p (b) e hsa-miR-142-3p (c) e níveis de cortisol na saliva ao longo do tempo (manhã, tarde e noite).

5. Discussão

5. Discussão

Na área das ciências forenses, a identificação de biomarcadores moleculares estáveis, precisos e resistentes que consigam auxiliar na identificação de fluídos biológicos, pode representar uma ferramenta útil, auxiliando já algumas das técnicas atualmente disponíveis. Atualmente, as técnicas convencionais, apresentam várias limitações, nomeadamente uma baixa especificidade e sensibilidade, apresentando assim limitações importantes que podem limitar a identificação de fluídos biológicos em contexto forense, aliada também à dificuldade que muitos dos fluídos não são encontrados nas melhores condições de conservação (2).

Atualmente, os miRNAs têm-se tornado fortes candidatos a biomarcadores de identificação de fluídos biológicos relevantes nas ciências forenses, tendo em conta a sua elevada estabilidade e resistência a fatores ambientais. Estas características, representam vantagens da sua aplicação nestes contextos, podendo permitir a análise de amostras degradadas ou amostras que contenham alguns inibidores, possibilitando assim a obtenção de informação útil no âmbito de investigações forenses, mesmo quando expostas a condições adversas (26, 28). Bamberg e colaboradores realizaram um estudo para demonstrar a vantagem da realização de um ensaio combinado de mRNA/miRNA, para a identificação de diferentes fluídos biológicos, diluídos e misturados (64). Os autores analisaram amostras antigas e degradadas e compararam com um ensaio de mRNA de referência e verificaram que os miRNAs tecido-específicos foram detetados em 93% das amostras degradadas em comparação com os mRNAs que só foram detetados em 25% (64). Tal realçou, que a análise de miRNAs em amostras degradadas está associada a elevadas taxas de deteção, conseguindo ultrapassar algumas das limitações associadas à utilização de perfis de mRNAs.

Dado o potencial de aplicação de análise destas moléculas, torna-se relevante estudar a sua utilização em diferentes contextos das ciências forenses, tendo-se assim realizado a análise de um perfil de miRNAs a partir de cenários simulados de condições reais onde é frequente ocorrer a deposição de amostras de saliva. De acordo com os resultados obtidos, verificamos que a quantidade e qualidade de RNA total recuperada a partir das amostras de saliva depositadas nos diferentes suportes é adequada para análise, sendo possível a sua deteção e quantificação por PCR quantitativo em tempo real. Contudo, verificou-se uma maior quantidade de RNA total recuperada às 24 horas relativamente aos outros tempos de exposição no filtro do cigarro e no plástico protegido da exposição ambiente, contrariamente ao plástico exposto ao ambiente que foi

recuperado uma quantidade de RNA total semelhante às 24 horas e às 48 horas. Esta diferença de resultados entre os suportes pode estar relacionado com o método de recolha da amostra dos suportes, levantando a questão da necessidade de uma maior padronização das técnicas de recuperação de fluídos biológicos em cenas de crime. De facto, Carvalho e coautores, ao analisarem o potencial de miRNAs como potenciais biomarcadores de amostras de sangue periférico assim como o padrão de expressão desses miRNAs em amostras depositas em diferentes suportes, também observaram que a diferença de resultados em RNA total recuperado ao fim de 2 meses era superior, comparativamente ao recuperado em tempos de exposição mais curtos e que isso poderia estar relacionado com o método de recolha não uniforme ou com a passagem da zaragatoa numa zona com maior disponibilidade de RNA no momento da recolha (65). De acordo com Williams e colaboradores, o método mais utilizado na recolha de vestígios biológicos é a utilização de uma zaragatoa através de movimentos circulares, girando-a, em vez de raspar, de forma que toda a zaragatoa seja colocada em contacto com o vestígio, com o objetivo de recolher o máximo possível de material genético (66). No caso da recuperação de amostra a partir do filtro de cigarro, esta não era possível através da utilização de uma zaragatoa, tendo-se optado por cortar diretamente este em várias porções, tal como descrito por outros autores quando quantificaram DNA através de saliva em filtros de cigarro (67, 68). Hochmeister e colaboradores utilizaram um método de recolha que consistiu em 3 cortes transversais na ponta do cigarro que estaria em contacto com a boca, cada um com 3-5 mm de largura utilizando um bisturi (67). No estudo de Kallassy e colaboradores, para fazer a recolha da amostra dos cigarros para posterior testagem de 4 métodos de extração de DNA, eles fizeram 4 cortes transversais no cigarro, com 4 mm de largura, com recurso de um bisturi (68). As diferenças na quantidade de RNA total recuperada pode, então, estar relacionada com as diferenças do método de recolha e pela capacidade de absorção diferente entre suportes, ocorrendo assim alguma variabilidade entre operadores e procedimentos.

O estudo da quantificação relativa por PCR em tempo real, envolve a amplificação do alvo do estudo e de um controlo endógeno, devendo este último ser escolhido por apresentar uma expressão homogénea e constante entre amostras e tecidos, sendo usados na normalização dos níveis de expressão quando se realiza uma quantificação relativa em tempo real. Para a normalização dos dados do PCR quantitativo em tempo real, foram selecionados diferentes miRNAs, tendo-se avaliado a sua estabilidade de expressão nos fluídos biológicos, de modo a ser selecionado o mais adequado para o presente estudo (30). De acordo com estudos anteriores em que analisaram miRNAs em amostras de saliva, os autores selecionaram como controlo endógeno o RNU6b por ser

um RNA altamente conservado e sempre presente e, portanto, adequado para normalização (9, 29, 31). He e colaboradores analisaram os U6, RNU6b, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-92a-3p e hsa-miR-484 e de acordo com os resultados selecionaram o RNU6b como normalizador por ter alta estabilidade e poder ser usado como um gene de referência endógeno na identificação de fluidos biológicos forenses com base na tecnologia de PCR quantitativo em tempo real (9). Neste estudo, o RNU6b não foi o miRNA selecionado, pois contrariamente ao descrito na literatura, o hsa-miR-16-5p foi o miRNA que apresentou uma menor variação entre as diferentes amostras e nos diferentes suportes comparativamente com os outros miRNAs estudados, e por isso foi utilizado para a normalização dos nossos resultados.

De acordo com o presente estudo, foi considerado que taxas de detecção dos miRNAs em estudo superiores a 80%, eram indicadoras das moléculas em estudos serem associadas a amostras de saliva. Sendo que os hsa-miR-24-3p, hsa-miR-29a-3p e o hsa-miR-142-3p estavam presentes frequentemente na saliva, enquanto o hsa-miR-10a-5p apresentou uma fraca detecção, e o hsa-miR-126-5p estava totalmente ausente.

De acordo com os resultados, sugere-se que os miRNAs hsa-miR-10a-5p e hsa-miR-126-5p não sejam utilizados na identificação de amostras de saliva de forma individualizada por terem apresentado uma fraca detecção e uma total ausência, respectivamente. Contudo, seria vantajoso a inclusão dos miRNAs hsa-miR-10a-5p e hsa-miR-126-5p num perfil de miRNAs com baixa expressão em amostras de saliva e combinar com um outro perfil de miRNAs de elevada expressão em amostras de saliva, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-29a-3p e hsa-miR-142-3p, para que seja garantido uma maior robustez e sensibilidade na identificação das amostras de saliva.

Ao analisar a expressão relativa do perfil de miRNAs (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-29a-3p e hsa-miR-142-3p) nos dois suportes, verificou-se que no filtro de cigarro o miRNA que apresentava um nível de expressão mais estável foi o hsa-miR-142-3p, seguido do hsa-miR-24-3p que também apresentava níveis de expressão elevados. O hsa-miR-29a-3p foi o miRNA que apresentou os menores níveis de expressão relativa neste suporte e conseqüente menor estabilidade quando comparado com os outros dois miRNAs. O filtro de cigarro é frequentemente encontrado em cenas de crime, mas a sua constituição irregular e capacidade de absorção constituem entraves que podem estar relacionado com a presença de inibidores que comprometem as reações de PCR, usadas para a análise de DNA, RNA e miRNAs (69). Hochmeister e colaboradores isolaram DNA de 200 filtros de cigarro fumados por 10 indivíduos e de 3 pontas de cigarro recuperadas de duas cenas de crime através de extração *Chelex 100*, para avaliar a aplicação de

métodos de tipagem de DNA baseados em PCR como uma abordagem potencial para tipagem de marcadores genéticos na saliva (67). Os resultados desse estudo sugeriram que a tipagem de DNA baseada em PCR oferece um método potencial para caracterizar geneticamente amostras de saliva em pontas de cigarro (67). Tal como no filtro de cigarro, na caixa de plástico o hsa-miR-29a-3p foi o que apresentou menores níveis de expressão relativa e conseqüentemente uma menor estabilidade. Contudo o hsa-miR-24-3p, na caixa de plástico, apresentou uma maior expressão relativa, sendo estável e contante ao longo dos tempos de exposição. Este resultado traduz a facilidade de detetar e quantificar este miRNA, hsa-miR-24-3p depositado no suporte de plástico, assim como o hsa-miR-142-3p visto que apresentam níveis de expressão mais elevados ao longo de 48 horas, o que revela uma importância para as ciências forenses.

De facto, os resultados da análise da expressão nos dois suportes, demonstram uma mais-valia em análises de amostras de saliva nas ciências forenses pelo facto de ser possível a detecção de miRNAs presentes em amostras de saliva, em suportes de plástico e em filtros de cigarro que são encontrados muito frequentemente em cenários de crime reais. Utilizando estes miRNAs será possível comprovar a natureza de uma amostra de saliva, mesmo em quantidade muito reduzida.

Ao comparar os níveis de expressão dos miRNAs às 24 horas e 48 horas, no suporte plástico protegido da exposição ambiente e no exposto à exposição ambiente verificou-se que em ambos os casos foi recuperado uma maior quantidade dos miRNAs às 48 horas. Para além disso, verificou-se que os hsa-miR-24-3p e hsa-miR-29a-3p são mais estáveis no plástico protegido da exposição ambiente do que no exposto ambiente. Relativamente ao hsa-miR-142-3p, a exposição ambiente apresentou níveis de expressão relativa mais elevados comparativamente ao protegido da exposição ambiente, o que faz esses mais estáveis. O espectável seria o plástico protegido da exposição ambiente apresentar resultados melhores, nomeadamente níveis de expressão relativa mais elevados em comparação com o plástico exposição ao ambiente, devido aos diversos fatores inclusos nessa exposição ambiental, contudo os resultados obtidos demonstraram a possibilidade de, tal como referido anteriormente, um método de recolha não uniforme.

Até ao momento não foi descrito na literatura qualquer estudo relativo à avaliação da condição de miRNAs de saliva, em vários tipos de suportes e em diversos tempos de exposição, mas já foram realizados alguns estudos utilizando a amostra de sangue. Estudos realizados por Ribeiro e co-autores, analisaram o potencial dos hsa-miR-16, hsa-miR-223 e hsa-miR-451 como biomarcadores de identificação de amostras de sangue

periférico, onde avaliou o padrão de expressão desses miRNAs a partir de amostras de sangue periférico depositadas em suportes de tecido de algodão, de pedra e de madeira, em diferentes tempos de exposição (fresco, 24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas e 1 mês) (70). De acordo com os resultados, concluíram que os hsa-miR-16 e hsa-miR-451 apresentam características que os tornam potenciais biomarcadores de identificação de amostras de sangue, nomeadamente o miR-16 que se apresentou como um biomarcador estável na identificação de amostras de sangue periférico, e ambos apresentaram níveis de expressão elevados nos vários suportes analisados (70). Contudo, excluíram o hsa-miR-223 como potencial biomarcador de amostras de sangue, devido aos baixos níveis de expressão em todos os suportes (70). Já no estudo realizado por Carvalho e co-autores, analisou-se o potencial dos hsa-miR-16, hsa-miR-25, hsa-miR-142 e hsa-miR-451b como potenciais biomarcadores de amostras de sangue periférico assim como o padrão de expressão desses miRNAs através de amostras depositas no suporte pedra e algodão, como no estudo anterior, e no suporte plástico e a exposição foi prolongada (2 meses) e a diferentes condições de temperatura (temperatura ambiente e 37°C) (65). Os autores concluíram que o hsa-miR-25 e o hsa-miR-142 são potenciais biomarcadores para a identificação de amostras de sangue com aplicabilidade nas ciências forenses, no entanto o hsa-miR-16 e o hsa-miR-451b não foram considerados bons biomarcadores para identificação de amostras de sangue periférico (65). A diferença de resultados destes 2 autores em relação aos miRNAs hsa-miR-16 e hsa-miR-451 pode estar na origem, novamente, de no estudo de Carvalho e coautores ter apresentado alguns vieses como a técnica de recolha e a distribuição das manchas de sangue pelos suportes não terem sido uniformes levando a que a quantidade de RNA total variasse entre as amostras. Tal como Carvalho e coautores consideram o hsa-miR-142 como potencial biomarcador de sangue, de acordo com os resultados deste estudo, o hsa-miR-142-3p também apresentou taxas de deteção elevadas nas amostras de saliva nos dois suportes e nos diferentes tempos de exposição. Assim, o hsa-miR-142-3p pode ser detetado tanto em amostras de sangue como em amostras de saliva o que nos leva, novamente, ao pressuposto de que não é ideal considerar a análise dos miRNAs de modo isolado, mas sim passar por implementar o uso de perfis de miRNAs de forma a que seja possível uma individualização das amostras. Para além da utilização de perfis de miRNAs, seria ideal combinar perfis de miRNAs de elevada expressão com perfis de miRNAs baixa expressão em amostras de saliva para aumentar a especificidade dos perfis.

Ao avaliar os níveis de cortisol ao longo do dia obtiveram-se os resultados esperados, ou seja, verificou-se que os níveis de cortisol eram mais elevados durante a manhã, por volta das 8 horas, diminuindo ao longo da tarde, atingindo o pico mais baixo à

noite, por volta das 24 horas. Estes resultados vão ao encontro com os já descritos na literatura (54). Corradini e colaboradores, analisaram 10 miRNAs com papel no ritmo circadiano em 12 amostras de sangue *post-mortem* e 12 amostras de humor vítreo de indivíduos mortos durante o dia ou durante a noite, com objetivo de encontrar um padrão oscilatório de variação para auxílio da determinação do intervalo *post-mortem* e verificou que quatro miRNAs apresentaram uma expressão diferencial significativa entre os hsa-miR-106b e hsa-miR-96 em amostras de humor vítreo e hsa-miR-142-5p e hsa-miR-219 em amostras de sangue em indivíduos mortos durante o dia ou à noite, (61).

De acordo com os resultados do estudo, ao avaliar a quantidade de RNA total nas amostras de saliva ao longo do dia, observou-se que a concentração de RNAs na saliva no início da manhã é a mais baixa, atingindo o maior pico pela tarde e diminuindo ligeiramente à noite, podendo assim traçar uma dinâmica diferente da anterior, por outro lado, a frequência de detecção de todos os miRNAs estudados, foi mais elevada à noite e mais baixa ao início da manhã e isso vai ao encontro com a concentração de RNAs na saliva referido. Verificou-se que todos os miRNAs incluídos nesta fase, apresentam a mesma tendência, tendo os níveis de expressão mais baixos ao início da manhã, ocorrendo um pico de expressão à tarde, seguido de uma diminuição à noite, apresentando assim oscilações ao longo do dia tal como esperado. De facto, existem várias evidências recentes que mostram que os componentes do relógio circadiano também são regulados por miRNAs (51). Os genes PER, que são regulados em mamíferos por miRNAs comuns, como é o caso do hsa-miR-24 e o hsa-miR-29a, estão envolvidos em mecanismos do relógio na maioria dos tecidos, uma vez que são amplamente expressos em vários tipos de células ou tecidos. Os pré-miRNA de miR-142-3p mostram o ritmo circadiano no soro e reduzem a transcrição de BMAL1 nas células do SCN (51). Robertson e colaboradores, confirmaram a capacidade do hsa-miR-24 modular a expressão pós-transcricional da CYP11B1, que produz as enzimas responsáveis pelos estágios finais da biossíntese de cortisol, bem como a produção de cortisol (71). O autor observou que o aumento da expressão do hsa-miR-24 se traduz na inibição da atividade da enzima CYP11B1, ou seja, se há um aumento dos níveis de expressão do hsa-miR-24, vai haver uma diminuição dos níveis de cortisol, o que vai de encontro com os resultados deste estudo, admitindo assim que o hsa-miR-24 poderá ser um útil indicador do período do dia em que determinada amostra foi depositada num local. Num estudo de Riestler e colaboradores, foi analisado o padrão de expressão de miRNAs nas glândulas adrenais de ratos após a estimulação da ACTH e essa estimulação deu origem a um aumento da expressão da glândula adrenal de vários miRNAs, incluindo miR-142-3p (72). A estimulação da ACTH pode ser demonstrada para influenciar agudamente o padrão de

expressão de miRNA adrenal in vivo (72). Também o hsa-miR-29a é importante na regulação de processos fisiológicos chave, nomeadamente, o tratamento prolongado de ratos com glucocorticoides, analisado no estudo de Wang e colaboradores, fez diminuir a expressão óssea desse miRNA sendo sugerido que o hsa-miR-29a poderia ser utilizado para prevenir patologias ósseas associadas ao uso de glucocorticoides a longo prazo (73). Tal como o hsa-miR-24-3p, os miRNAs hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p quando apresentaram uma elevada expressão, os níveis de cortisol apresentaram valores baixos. Estas oscilações apresentadas pelo perfil de miRNAs analisado ao longo do tempo, juntamente com a variação dos níveis de cortisol ao longo do dia, poderão ter muita utilidade para uma estimativa de um período de tempo.

Em conclusão, é de realçar que essas oscilações poderão auxiliar em casos em que se pretende saber o momento em que uma amostra de saliva foi depositada em determinado local. Para além disso, também poderão ajudar numa tentativa de se relacionar a hora da colheita de um fluido biológico ao intervalo *post-mortem* e mesmo não sendo possível determinar a hora exata da morte, poderá ajudar a estabelecer o período do dia (dia ou noite) que ocorreu uma morte, auxiliando assim em questões médico-legais.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

A deteção de fluídos biológicos depositados em diferentes cenários e suportes, nomeadamente fluídos de saliva, constitui um passo crucial nas investigações criminais, podendo ter um impacto significativo na resolução das mesmas. Contudo, em cenários reais, esses fluídos encontram-se em quantidades reduzidas, misturados e expostos a diferentes fatores ambientais, o que pode provocar a sua degradação, influenciando a sua posterior análise pelas técnicas convencionais. Como tal, recentemente, introduziram-se os miRNAs como potenciais biomarcadores de identificação de fluídos biológicos, devido à sua especificidade, resistência e estabilidade. Apesar de já existirem estudos de vários miRNAs como potenciais biomarcadores de amostras de saliva, é necessário identificar um perfil de miRNAs que apresente uma elevada estabilidade quer entre diferentes tipos de suportes físicos, quer ao longo do tempo.

O presente estudo analisou a expressão de um perfil de miRNAs (hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-29a-3p e hsa-miR-126-5p) a partir de amostras de saliva depositadas em diferentes suportes (filtro de cigarro e o plástico) ao longo de um intervalo de tempo, de modo a determinar a capacidade de recuperação destas moléculas quando expostas ao ambiente. Adicionalmente foi analisada a variação circadiana dos níveis de expressão do perfil de miRNAs selecionado (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-24-3p e hsa-miR-29a-3p) em amostras de saliva e sua associação com os níveis de cortisol salivar. De acordo com os resultados é possível concluir que os hsa-miR-10a-5p e hsa-miR-126-5p não apresentam uma boa expressão em amostras de saliva. Contudo, os hsa-miR-24-3p e hsa-miR-142-3p foram os que apresentaram maior expressão em amostras de saliva depositadas no suporte de plástico e no filtro de cigarro ao longo das 48 horas de exposição, por isso, é proposto a inclusão dos miRNAs hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-142-3p e hsa-miR-29a-3p num perfil de miRNAs que incluem miRNAs com altos níveis de expressão e com baixos níveis de expressão para uma maior robustez e sensibilidade na identificação da amostra de saliva.

Apesar desses resultados, é importante referir que existem alguns vieses relativamente à técnica de recolha nos dois suportes visto que no filtro de cigarro teve de ser recortada uma parte, que foi usada posteriormente para a extração dos miRNAs, e no plástico foi através da aplicação de uma zaragatoa que se procedeu à recolha da amostra de saliva, o que poderá ter contribuído para que a quantidade de RNA total variasse entre as amostras.

Em relação à dinâmica dos miRNAs selecionados ao longo do dia (período de 24 horas), os hsa-miR-142-3p, hsa-miR-29a-3p e hsa-miR-24-3p apresentaram variações dos níveis de expressão nos três períodos do dia, verificando-se o pico mais baixo de manhã, com um aumento ao longo do dia, atingindo o pico mais elevado pela tarde, e uma diminuição à noite, contrariamente aos níveis de cortisol que o seu pico mais elevado é pela manhã, diminuindo ao longo do dia e atingindo o valor mais baixo à noite. Esta variação de valores ao longo do dia deste perfil de miRNAs, poderá ser muito útil em casos em que se pretende saber o momento em que uma amostra de saliva foi depositada naquele local, mas também para tentar relacionar com o intervalo *post-mortem* e mesmo não sendo possível determinar a hora exata, poderá ajudar a estabelecer o período do dia (dia ou noite) que ocorreu uma morte. Propomos assim, a inclusão dos hsa-miR-142-3p, hsa-miR-24-3p e hsa-miR-29a-3p como potenciais biomarcadores de saliva a serem incluídos num perfil de miRNAs a estudar aquando da necessidade de deteção de um padrão temporal em amostras de saliva depositadas em determinados locais e assim auxiliar em questões médico-legais.

Futuramente, o presente estudo deveria ser replicado num maior número de indivíduos para validação de resultados, assim como numa maior amplitude de tempo de exposição de amostras. Também seria interessante estudar o perfil de miRNAs escolhido em outros tipos de suportes, como por exemplo envelopes de papel ou selos ou vidro, onde a saliva é frequentemente encontrada nas cenas de crime, assim como estudar o mesmo perfil de miRNAs em amostras de mistura.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

1. Harbison S, Fleming R. Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*. 2016.
2. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Carneiro de Sousa MJ, Medeiros R. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet*. 2015;14:1-10.
3. Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I. MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics (Basel)*. 2020;11(1).
4. Courts C, Madea B. Micro-RNA - A potential for forensic science? *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):106-11.
5. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1(1):69-74.
6. Mayes C, Seashols-Williams S, Hughes-Stamm S. A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Leg Med (Tokyo)*. 2018;30:1-4.
7. Saxena S, Kumar S. Saliva in forensic odontology: A comprehensive update. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2015;19(2):263-5.
8. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int*. 2009;188(1-3):1-17.
9. He H, Han N, Ji C, Zhao Y, Hu S, Kong Q, et al. Identification of five types of forensic body fluids based on stepwise discriminant analysis. *Forensic Sci Int Genet*. 2020;48:102337.
10. Haas C, Klessner B, Maake C, Bar W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci Int Genet*. 2009;3(2):80-8.
11. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem*. 2009;387(2):303-14.
12. Moldovan L, Batte K, Wang Y, Wisler J, Piper M. Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2013;1024:129-45.
13. Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med*. 2009;123(1):71-4.

7. Referências Bibliográficas

14. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med.* 2008;122(2):135-42.
15. Hanson E, Ingold S, Haas C, Ballantyne J. Messenger RNA biomarker signatures for forensic body fluid identification revealed by targeted RNA sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 2018;34:206-21.
16. Mehta N, Cheng HY. Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping. *J Mol Biol.* 2013;425(19):3609-24.
17. MacFarlane L, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* 2010;11(7):537-61.
18. Dias F, Teixeira AL, Santos JI, Gomes M, Nogueira A, Assis J, et al. Renal cell carcinoma development and miRNAs: a possible link to the EGFR pathway. *Pharmacogenomics.* 2013;14(14):1793–803.
19. Liang H, Gong F, Zhang S, Zhang CY, Zen K, Chen X. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014;5(2):285-300.
20. Teixeira AL, Dias F, Gomes M, Fernandes M, Medeiros R. Circulating biomarkers in renal cell carcinoma: the link between microRNAs and extracellular vesicles, where are we now? *J Kidney Cancer VHL.* 2014;1(8):84-98.
21. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
22. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6.
23. Glynn CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA.* 2020;26(1):1-9.
24. Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kamińska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(5):865-74.
25. Cifuentes-Bernal AM, Pham VV, Li X, Liu L, Li J, Le TD. A pseudotemporal causality approach to identifying miRNA-mRNA interactions during biological processes. *Bioinformatics.* 2021;37(6):807-14.
26. Wang Z, Zhang J, Wei W, Zhou D, Luo H, Chen X, et al. Identification of Saliva Using MicroRNA Biomarkers for Forensic Purpose. *J Forensic Sci.* 2015;60(3):702-6.
27. Roche. O que são Biomarcadores? Roche Farmacêutica Química, Lda.2020 [Available from: <https://www.corporate.roche.pt/pt/inovacao-e-desenvolvimento0/ensaios-clinicos/ensaios-clinicos-para-profissionais-de-saude/o-que-sao-biomarcadores-.html>].

28. Sauer E, Reinke AK, Courts C. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;22:89-99.
29. Park JL, Park SM, Kwon OH, Lee HC, Kim JY, Seok HH, et al. Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Electrophoresis.* 2014;35(21-22):3062-8.
30. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med.* 2010;124(3):217-26.
31. Courts C, Madea B. Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *J Forensic Sci.* 2011;56(6):1464-70.
32. Sirker M, Fimmers R, Schneider PM, Gomes I. Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2017;27:41-9.
33. Wang Z, Zhang J, Luo H, Ye Y, Yan J, Hou Y. Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(1):116-23.
34. Nilendu D, Kundu A, Chand A, Johnson A. Forensic Implications of Saliva: An Overview. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology.* 2020;14.
35. Palmela Pereira C. A importância médico-legal e criminalística da saliva: sistematização da sua aplicação nas ciências forenses. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial.* 2014;55(1):3-6.
36. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005;150(2-3):119-31.
37. John SJ, Rajaji D, Jaleel D, Mohan A, Kadar N, Venugopal V. Application of Saliva in Forensics. *Oral Maxillofac Pathol J.* 2018;9(2):85-7.
38. Wang Z, Zhou D, Cao Y, Hu Z, Zhang S, Bian Y, et al. Characterization of microRNA expression profiles in blood and saliva using the Ion Personal Genome Machine((R)) System (Ion PGM System). *Forensic Sci Int Genet.* 2016;20:140-6.
39. Ozkan SA, Bakirhan NK, Mollarasouli F. *The Detection of Biomarkers: Past, Present, and the Future Prospects: Elsevier Science; 2021.*
40. Kura B, Parikh M, Slezak J, Pierce GN. The Influence of Diet on MicroRNAs that Impact Cardiovascular Disease. *Molecules.* 2019;24(8).
41. Marçola M, Lopes-Ramos CM, Pereira EP, Cecon E, Fernandes PA, Tamura EK, et al. Light/Dark Environmental Cycle Imposes a Daily Profile in the Expression of microRNAs in Rat CD133(+) Cells. *J Cell Physiol.* 2016;231(9):1953-63.

42. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-41.
43. Halberg F. Chronobiology. *Annu Rev Physiol*. 1969;31:675-725.
44. Huang G, Ma H, Gan X, Li S, Ma X, Chen S, et al. Circadian misalignment leads to changes in cortisol rhythms, blood biochemical variables and serum miRNA profiles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;567:9-16.
45. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol*. 2007;195(2):187-98.
46. Ackermann K, Ballantyne KN, Kayser M. Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *Int J Legal Med*. 2010;124(5):387-95.
47. Reszka E, Zienolddiny S. Epigenetic Basis of Circadian Rhythm Disruption in Cancer. *Methods Mol Biol*. 2018;1856:173-201.
48. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*. 1995;14(4):697-706.
49. Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays*. 2008;30(7):624-33.
50. Herzog ED. Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(10):790-802.
51. Kinoshita C, Okamoto Y, Aoyama K, Nakaki T. MicroRNA: A Key Player for the Interplay of Circadian Rhythm Abnormalities, Sleep Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Clocks Sleep*. 2020;2(3):282-307.
52. Torres M, Becquet D, Franc JL, François-Bellan AM. Circadian processes in the RNA life cycle. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9(3):e1467.
53. Mohd Azmi NAS, Juliana N, Azmani S, Mohd Effendy N, Abu IF, Mohd Fahmi Teng NI, et al. Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(2):676.
54. Clements AD. Salivary cortisol measurement in developmental research: where do we go from here? *Dev Psychobiol*. 2013;55(3):205-20.
55. Kanikowska D, Roszak M, Rutkowski R, Sato M, Sikorska D, Orzechowska Z, et al. Seasonal differences in rhythmicity of salivary cortisol in healthy adults. *J Appl Physiol (1985)*. 2019;126(3):764-70.
56. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1526-40.

57. Baba M, Ohkura M, Koga K, Nishiuchi K, Herrera LR, Matsuse R, et al. Analysis of salivary cortisol levels to determine the association between depression level and differences in circadian rhythms of shift-working nurses. *J Occup Health*. 2015;57(3):237-44.
58. Montanari E, Giorgetti R, Busardò FP, Giorgetti A, Tagliabracci A, Alessandrini F. Suitability of miRNA assessment in postmortem interval estimation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(4):1774-87.
59. Odriozola A, Riancho JA, de la Vega R, Agudo G, Garcia-Blanco A, de Cos E, et al. miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: a proof-of-concept pilot study. *Int J Legal Med*. 2013;127(3):573-8.
60. Lech K, Ackermann K, Wollstein A, Revell VL, Skene DJ, Kayser M. Assessing the suitability of miRNA-142-5p and miRNA-541 for bloodstain deposition timing. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;12:181-4.
61. Corradini B, Alù M, Radheshi E, Gabbolini V, Ferrari F, Santunione AL, et al. Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2015;5:e204-e6.
62. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(20):e179.
63. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
64. Bamberg M, Bruder M, Dierig L, Kunz SN, Schwender M, Wiegand P. Best of both: A simultaneous analysis of mRNA and miRNA markers for body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2022;59:102707.
65. Carvalho A. Perfil de MicroRNAs: Potenciais Biomarcadores de Amostras de Sangue: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; 2020.
66. Williams S, Panacek E, Green W, Kanthaswamy S, Hopkins C, Calloway C. Recovery of salivary DNA from the skin after showering. *Forensic Sci Med Pathol*. 2015;11(1):29-34.
67. Hochmeister MN, Budowle B, Jung J, Borer UV, Comey CT, Dirnhofer R. PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *Int J Legal Med*. 1991;104(4):229-33.
68. Kallassy H, El Khoury LY, Eid M, Chalhoub M, Mansour I. Comparison of four DNA extraction methods to extract DNA from cigarette butts collected in Lebanon. *Sci Justice*. 2019;59(2):162-5.
69. Watanabe Y, Takayama T, Hirata K, Yamada S, Nagai A, Nakamura I, et al. DNA typing from cigarette butts. *Leg Med (Tokyo)*. 2003;5 Suppl 1:S177-9.

7. Referências Bibliográficas

70. Ribeiro A. Perfil de microRNAs: Potenciais Biomarcadores de Identificação de Amostras Biológica: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; 2018.
71. Robertson S, MacKenzie SM, Alvarez-Madrazo S, Diver LA, Lin J, Stewart PM, et al. MicroRNA-24 is a novel regulator of aldosterone and cortisol production in the human adrenal cortex. *Hypertension*. 2013;62(3):572-8.
72. Riester A, Issler O, Spyroglou A, Rodrig SH, Chen A, Beuschlein F. ACTH-dependent regulation of microRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland. *Endocrinology*. 2012;153(1):212-22.
73. Wang FS, Chuang PC, Lin CL, Chen MW, Ke HJ, Chang YH, et al. MicroRNA-29a protects against glucocorticoid-induced bone loss and fragility in rats by orchestrating bone acquisition and resorption. *Arthritis Rheum*. 2013;65(6):1530-40.

8. Anexos

8. Anexos

Anexo 1. Parecer da Comissão de Ética.

Exma. Senhora
Drª Telma Salomé Moreira

SCE/HCC/009

2022-07-05

2022/CE/P11/(P389/CETI/ICBAS)

Informa-se que o projeto de Investigação com o título "**MicroRNAs Salivares como Biomarcadores nas Ciências Forenses**", com a referência 2022/CE/P11(P389/CETI/ICBAS), submetido à Comissão de Ética conjunta CHUP/ICBAS, foi apreciado em reunião plenária de 1 de junho de 2022, tendo obtido parecer favorável.

Com os nossos cumprimentos,

O Diretor,



(Prof. Doutor Henrique Cyrne Carvalho)